



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE L.*) DOKU
KÜLTÜRLERİNDE *NIKİTA* RETROTRANSPOZONUNUN
HAREKETLERİ**

Emre BAYRAM

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Temmuz, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE L.*) DOKU
KÜLTÜRLERİNDE *NIKİTA* RETROTRANSPOZONUNUN
HAREKETLERİ**

Emre BAYRAM

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

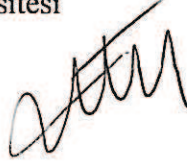
Temmuz, 2011

İSTANBUL

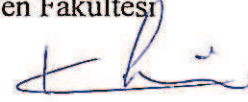
Bu çalışma 12/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Tijen OĞRAŞ
Tübitak Marmara Araştırma Merkezi
Gen Mühendisliği Enstitüsü

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 8587 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam **Prof.Dr.Nermin GÖZÜKIRMIZI**'ya, en içten dileklerle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca da, benden yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, özellikle de **Sibel YILMAZ, Halide HAMAT MECBUR, Gönül KARTAL ALAÇAM** ve **Ashhan TEMEL**'e samimi teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bana destek olan ve beni bugünlere getiren, benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, **sevgili aileme** tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Temmuz, 2011

Emre BAYRAM

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. ARPA (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	4
2.1.1. Arpa Genetiği	5
2.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	7
2.2.1. Kallus Kültürü	9
2.2.2. Arpada Embriyojenik Kallus Kültürü Çalışmaları	10
2.3. SOMAKLONAL VARYASYON	13
2.3.1. Somaklonal Varyasyonların Sebepleri ve Tespit Edilme Yöntemleri... ..	14
2.4. TRANSPOZONLAR ve EPİGENETİK	15
2.4.1. Transpozonlar	15
2.4.2. Transpozonların Biyolojik Önemleri ve Fonksiyonları.....	17
2.4.3. Transpozonların Sınıflandırılması, Hareket Mekanizmaları ve Yapıları	20
2.4.4. Epigenetik	25
2.4.5. Epigenetik ve Transpozonlar	27
2.5. <i>NIKITA</i> RETROTRANSPOZONU	28
2.6. IRAP ‘INTER-RETROTRANSPOSON AMPLIFIED POLYMORPHISM’.....	29

3. MALZEME VE YÖNTEM	30
3.1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	30
3.1.1. Besiyeri Yapımı	30
3.1.2. Kallus Kültürlerinin Kurulması	30
3.2. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.....	31
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	31
3.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
3.2.3. IRAP Analizleri	33
3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ‘PAGE’	34
4. BULGULAR	36
4.1. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ	36
4.2. GENOMİK DNA ANALİZLERİ	37
4.3. IRAP ANALİZLERİ.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Arpanın 7 çift kromozomunun şematik gösterimi	6
Şekil 2.2	: Mikroçoğaltım amaçlı bitki doku kültürü yöntemi	8
Şekil 2.3	: Mutant mısır tanelerindeki pigmentasyon	16
Şekil 2.4	: Angiosperm tür bitkilerdeki transpozon oranı.....	17
Şekil 2.5	: Transpozon sınıf ve yapılarına genel bakış.....	20
Şekil 2.6	: DNA Transpozonlarının hareket mekanizmaları.....	22
Şekil 2.7	: Arpada Rar 1 lokusundaki retrotranspozonlar (<i>Nikita</i> , <i>BARE1</i> , <i>Sukkula</i> , <i>BAGY2</i> , <i>Sabrina</i>) ve genlerin dizilişi	23
Şekil 2.8	: Epigenetik mekanizmalar	26
Şekil 2.9	: <i>Nikita</i> LTR dizisi	28
Şekil 2.10	: IRAP markır çalışma prensibi	29
Şekil 3.1	: Agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan markır	33
Şekil 4.1	: Olgun arpa embriyolarından elde edilen kalluslar. a; ekimi yapılmış embriyolar, b; 30 günlük kallus, c; 60 günlük kallus, d; 90 günlük kallus	36
Şekil 4.2	: Embriyo ve kalluslardan izole edilen genomik DNA'lar; 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır	37
Şekil 4.3	: N57 primeri ile yapılan PZR sonuçları. 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır	38
Şekil 4.4	: N2647 primeri ile yapılan PZR sonuçları. 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır	39

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve stok çözeltiler	32
Tablo 3.2	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	33
Tablo 3.3	: IRAP PZR için kullanılan primerlerin dizileri ve T _a sıcaklıkları.....	33
Tablo 3.4	: IRAP-PZR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	34
Tablo 3.5	: IRAP-PZR koşulları.....	34
Tablo 3.6	: PAGE bileşenleri ve konsantrasyonları.....	35
Tablo 4.1	: Örneklere ait genomik DNA konsantrasyonları.....	37

SEMBOL LİSTESİ

µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
µM	: mikromolar
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik asit
AFLP	: ‘amplified fragment length polymorphism’
AP	: aspartik proteinaz
Atm	: atmosfer basıncı
BAC	: ‘bacterial artificial chromosome’
BAP	: 6-benzilaminopürin
BARE-1	: ‘barley retroelement 1’
bç	: baz çifti
C değeri	: belli bir türün haploid genomundaki DNA miktarı
cDNA	: tamamlayıcı DNA ‘complementary DNA’
cm	: santimetre
cv	: kültür varyetesi ‘cultivar’
dak	: dakika
dH₂O	: distile su
Dicamba	: ‘3-6-dichloro-2-methoxybenzoic acid’
DNA	: dezoksiribonükleik asit
dNTP	: dezoksiribonükleotit trifosfat ‘deoxyribonucleotide triphosphate’
EDTA	: etilendiamin tetraasetik asit
ENV	: kılıf proteini ‘envelope protein’
g	: gram
H₂O	: su
HCl	: hidroklorik asit
IN	: integraz
IRAP	: ‘inter-retrotransposon amplified polymorphism’
ISSR	: ‘inter-simple sequence repeat’
C. Koch	: Karl Koch
Kb	: kilobaz
kbç	: kilobaz çifti
l	: litre
L	: (Carolus) Linnaeus
LINE	: ‘long interspersed nuclear elements’
LTR	: ‘long terminal repeats’
M	: molar
mA	: miliamper
mg	: miligram
MITE	: ‘miniature inverted transposable elements’
ml	: mililitre
mm	: milimetre
mM	: milimolar
mRNA	: mesajcı RNA
MS	: Murashige and Skoog besi yeri
M-SAP	: ‘methylation-sensitive amplification polymorphism’
MULE	: ‘mutator like transposable element’

N	: normal
NaCl	: sodyum klorür
NaOH	: sodyum hidroksit
NBT	: ‘p-nitrobluetetrazolium chloride’
ng	: nanogram
nm	: nanometre
NOR	: ‘nucleolar organiser region’
°C	: santigrad derece
ORF	: ‘open reading frame’
PAGE	: poliakrilamit jel elektroforezi ‘polyacrylamide gel electrophoresis’
pg	: pikogram
pH	: hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması ‘power of hydrogen’
PLE	: ‘ <i>penelope</i> -like element’
POL B	: DNA polimeraz B
poli-A	: poli-adenilat
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: reverse primer’ geri primer
RAPD	: ‘random amplified polymorphic DNA’
RBIP	: ‘retrotransposon based insertional polymorphism’
REMAP	: ‘retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism’
RFLP	: ‘restriction fragment length polymorphism’
RH	: ribonükleaz H (RNaz H)
RNA	: ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans ‘RNA interference’
RNaz	: ribonükleaz
RT	: ters transkriptaz ‘reverse transcriptase’
RTN	: bitki retrotranspozonu
San	: saniye
SINE	: ‘short interspersed elements’
SNP	: ‘single nucleotide polymorphism’
Sp .	: tür ‘species’
S-SAP	: sequence-specific amplification polymorphism
ssp.	: alt tür ‘subspecies’
SSR	: ‘simple sequence repeat’
T_a	: ‘temperature of annealing’
TAE	: tris-asetat-EDTA
TE	: yer değiştirebilen element ‘transposable element’
TEMED	: tetrametiletildiamin
TEOS	: tetraetil-o-silikat
Thell.	: (Albert) Thellung
TIR	: ‘terminal inverted repeats’
T_m	: ‘temperature of melting’
U	: ‘unit’
UPGMA	: ‘unweighted pair-group method with arithmetic averages’
UV	: ‘ultra-violet’
V	: volt

ÖZET

ARPA (*Hordeum vulgare* L.) DOKU KÜLTÜRLERİNDE *NIKITA* RETROTRANSPOZONUNUN HAREKETLERİ

Bu tez projesinde, *Nikita* retrotransposonunun hareketliliği arpada (*Hordeum vulgare* L.) bitki doku kültürü koşullarında, IRAP (“Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism”) moleküler markır tekniği kullanılarak incelendi. Bu amaçla, olgun arpa tohumlarından embriyolar çıkarıldı ve Murashige Skoog (MS) besiyerinde kallus oluşumu teşvik edildi. Örnekler, 30, 60 ve 90 günlük kallus kültürlerinden alındı ve genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. İzole edilen genomik DNA’lar kalıp olarak kullanıldı ve *Nikita*’ya özgü iki farklı primer (N57 ve N2647) ile IRAP-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapıldı. PZR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezinde ayrıldı ve incelendi.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, farklı yaşlardaki kalluslarda polimorfizmin *Nikita* retrotransposon hareketlerine bağlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, aynı yaştaki farklı kalluslar arasındaki polimorfizm, *Nikita* hareketlerinin her bireyde aynı olmayabileceğini, rastgele olabileceğini gösterdi.

Arpa doku kültüründe retrotransposon hareketlerinin anlaşılması üzerine çalışmalar sınırlıdır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulguların, epigenetik değişimlerin kallus oluşumu üzerine olan etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

SUMMARY

MOVEMENTS OF *NIKITA* RETROTRANSPOSON IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) TISSUE CULTURES

In this thesis project, *Nikita* retrotransposon movements were investigated in barley (*Hordeum vulgare* L.) tissues culture conditions using IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) molecular marker technique. For this purpose, embryos were dissected from mature barley seeds and callus formation was encouraged in Murashige Skoog (MS) medium. Samples were obtained from 30, 60 and 90 days old calli cultures and were used for genomic DNA isolation. The isolated genomic DNAs were used as template and IRAP-PCR (Polimeraz Chain Reaction) was performed with two different *Nikita* specific primers (N57 ve N2647). PCR products were separated and analyzed in Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Results obtained from this thesis project has shown that polymorphisms depend on *Nikita* retrotransposon movements in different aged calli. Besides, polymorphisms between different calli in same ages showed that *Nikita* movements might not be the identical in each individual and might be random.

Studies on retrotransposon movements in barley tissue culture, are limited. Results obtained from this thesis, are expected to contribute to understanding of the effects of epigenetic changes on callus formation.

1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) buğdaygillerden taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir. Tarih öncesi devirlerden beri kültürü yapılan ve ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelmektedir (Badr ve diğ., 2000; Saisho ve Purugganan, 2007; Temel ve diğ., 2008). Kısa yaşam döngüsü, tek yıllık bir bitki olması ve genomunun yedi çift kromozomdan oluşması, arpanın genetik çalışmalarda kullanılmasındaki önemini arttırmaktadır. Bununla birlikte, arpanın fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan büyük çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde tohum stoklarının ve genetik haritalarının bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi gibi özellikleri, arpanın fizyolojik ve moleküler çalışmalar için model bitki olarak kullanılmasında önemli rol oynamaktadır (Koornneef ve diğ., 1997; Forster ve diğ., 2000; Rodriguez ve diğ., 2006; Castiglione ve diğ., 2008). Arpa, aynı zamanda doku kültürü çalışmaları için de geniş çapta kullanılmaktadır. Kallus oluşumu ve rejenerasyon için gerekli olan besiyeri ve ortam koşulları optimize edilmiş ve transformasyon çalışmaları başarı ile sonuçlanmıştır.

Bitki doku kültürü, bitkilerin steril koşullarda yapay besiyerlerinde geliştirilmesidir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak, bitkiden alınan herhangi bir parça (eksplant) ile kısa sürede bitkinin istenen kısımları veya tüm bir bitki çoğaltılabilmektedir. Doku kültürü koşullarında genelde kallus oluşumu gözlenir. Kallus, sürekli bölünmekte olan farklılaşmamış hücre yığını olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2002). Kallus oluşumu sırasında doku kültürü koşullarının etkisiyle kallus dokusunda genetik ve epigenetik değişimlerin etkisiyle somaklonal varyasyonlar oluşabilmektedir. Somaklonal varyasyonlar nedeniyle, kallus oluşturan veya totipotent olup yeni bitkiler meydana getirebilen hücreler uzun süreli kültürlerde veya kısa süreli de olsa yüksek bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda bu yeteneklerini (kompotens) yitirebilmektedirler. Bu hücrelerden oluşan yeni bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sonucu kalıtsal ve fenotipik varyasyonlar (somaklonal varyasyon) ortaya çıkmaktadır. Bu varyasyonlar, yeni çeşit geliştirme ve iyileştirmelerde ıslahçılar

tarafından kullanılmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2002). Somaklonal varyasyonların çok çeşitli sebepleri olabilir. Bu sebeplerden bazıları, kromozom kırıkları ve duplikasyonlar, metilasyon değişimleri gibi epigenetik faktörlerdir. Doku kültürü koşullarında meydana gelen bu gibi genetik ve epigenetik varyasyonlar daha önceki çalışılmalarla gösterilmiştir (Gözükırmızı ve diğ., 1990; Temel ve diğ., 2008). Son yıllarda transpozon hareketlerinin de genomda büyük değişikliklere sebep olduğu ve bu değişikliklerin somaklonal varyasyonlara neden olabileceği görülmüştür.

Transpozon, kromozom üzerinde yeni bir yerleşim noktasına hareket eden DNA parçasıdır. İlk kez Barbara McClintock tarafından 1948 yılında mısır bitkisinde gözlemlenmiştir (McClintock, 1948). Bitki genomlarının yaklaşık % 50 – 90 kadarı transpozonlardan oluşmuştur. Transpozonlar tarafından oluşturulan genom hareketlerine transpozisyon denir. Genel olarak transpozonlar genomdaki transpozisyon mekanizmalarına göre retrotranspozonlar ve DNA transpozonları olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Bennetzen, 2000; Pagnotta ve diğ., 2009). Transpozonlar kromozomlarda yeni yerleştikleri yerlerdeki genlerin anlatımlarında önemli değişikliklere neden olurlar. Bununla birlikte replikasyonla çoğalan DNA transpozonları ve retrotranspozonlar genom büyümesine sebep olurlar. Transpozonlar insersiyon, inversiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyararak mutasyonlara ve böylece yeni alellerin oluşumlarına neden olurlar. Bu yeni oluşumlar evrimsel süreçte yeni türlerin oluşumunda etkili bir mekanizma olarak görülmektedir (Bennetzen, 2000; Schulman ve diğ., 2004; Pagnotta ve diğ., 2009). Günümüzde transpozonlar, prokaryotlarda klasik antibiyotik–direnc markırı, ökaryotlarda insersiyon mutasyonları, haritalama, gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi gibi amaçlarla moleküler genetik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bergman ve Quesneville, 2007).

Retrotanspozonların hareketleri, genomik DNA ve korunmuş uçları arasında yeni ek yerleri yarattığı ve polimorfizme sebep olduğu için markır olarak kullanılabilir. Polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan en yaygın markır tekniği ‘Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism’ (IRAP)’dir (Leigh ve diğ., 2003; Schulman ve diğ., 2004). IRAP, iki komşu retrotranspozon arasında kalan intergenomik bölgenin PZR ile çoğaltılmasına dayanır.

Retrotransposonlar kendilerini kopyalayıp sonra bu kopyalarını genomda çeşitli yerlere yerleştirirler. Retrotranspozonlar önce transkripsiyon yoluyla kendilerini bir RNA molekülü olarak kopyalarlar, sonra bu RNA (çoğu zaman transpozon tarafından kodlanan) bir ters transkriptaz tarafından tekrar DNA'ya dönüştürülür ve genoma geri sokulur. Retrotransposonlar uzun uç tekrar dizilerine (ing. Long Terminal Repeat; LTR) sahip olup olmadıklarına göre iki gruba ayrılırlar. LTR'li retrotranspozonların LTR dizilerinde promotörler ve retrotranspozisyon için gerekli olan en az iki enzimin genleri bulunur. LTR'li retrotranspozonlar retrovirüslere çok benzerler ama virüs olarak paketlenmelerini sağlayan *env* genine sahip değildirler. Virüs benzeri retrotranspozonlar paketlenemedikleri için başka hücrelere bulaşmazlar. LTR'li retrotranspozonlar insan genomunun %8'ini oluştururlar.

Günümüze kadar bitkilerde retrotranspozonlar üzerine yapılan çalışmalarda, retrotranspozonların evrimi, çeşitliliği, rekombinasyonu ve bir türün evrimini nasıl etkiledikleri gibi çalışmalara yoğunluk verilmiştir. Buna karşın literatürde arpada bitki doku kültürünün farklı aşamalarındaki retrotranspozon hareketlerinin incelenmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır. Bu değişimlerin araştırılması retrotranspozonların somaklonal varyasyon üzerine etkilerinin belirlenmesine katkılar sağlayarak, biyoteknolojik uygulamalarda karşılaşılan zorlukların aşılmasını sağlayacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada arpanın kallus kültürlerinde, eksplant olarak kullanılan olgun embriyo ile karşılaştırmalı olarak gelişim sürelerine bağlı gelişen kalluslardaki *Nikita* retrotranspozonunun hareketleri araştırıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ARPA (*Hordeum vulgare* L.)

Arpa, *Poaceae* ailesinden *Liliopsida* sınıfının bir üyesidir. *Poaceae* ailesine ait olan tüm bitkiler tek bir atadan gelişmiştir. Bununla birlikte, *Liliopsida* sınıfından *Triticeae* oymağının bir üyesi olan arpa, buğday (*Triticum sp.*) ve çavdar (*Secale sp.*) gibi birçok önemli tahıl türü ile akrabadır (Vicent ve diğ., 2005; Devos, 2005; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007; Bregitzer ve diğ., 2008; <http://www.public.iastate.edu/~imagefpc/IBSC%20Webpage/IBSC%20Template-home.html>; Schulte ve diğ., 2009).

Üstalem: *Eukarya* – Ökaryotlar

Alem: *Plantae* – Bitkiler

Altalem: *Tracheobionta* – Damarlı bitkiler

Üstşube: *Spermatophyta* – Tohumlu bitkiler

Şube: *Magnoliophyta* – Çiçekli bitkiler (*Angiospermae*)

Sınıf: *Liliopsida* – Monokotil (Tek Çenekli) Bitkiler

Altsınıf: *Commelinidae*

Takım: *Cyperales*

Aile: *Poaceae* – Buğdaygiller (Gramineae)

Altaile: *Pooideae*

Oymak: *Triticeae*

Cins: *Hordeum* – Arpa

Tür: *Hordeum vulgare* (Woese ve diğ., 1990;

http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_intro.html;

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=HOVU>).

Dünyada, tahıllar arasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alan arpa, Türkiye’de ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. Üretimde başı çeken ülkeler sırasıyla, Rusya, Ukrayna, Fransa, Almanya, Kanada ve İspanya’dır. Arpanın ekimi dünyada 56.774.297 hektarlık alana yapılmaktadır (Lyons ve diğ., 2008; <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>; http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_intro.html). Tek yıllık uzun gün bitkisi olan arpanın boyu ortalama 35-100 cm’ ye

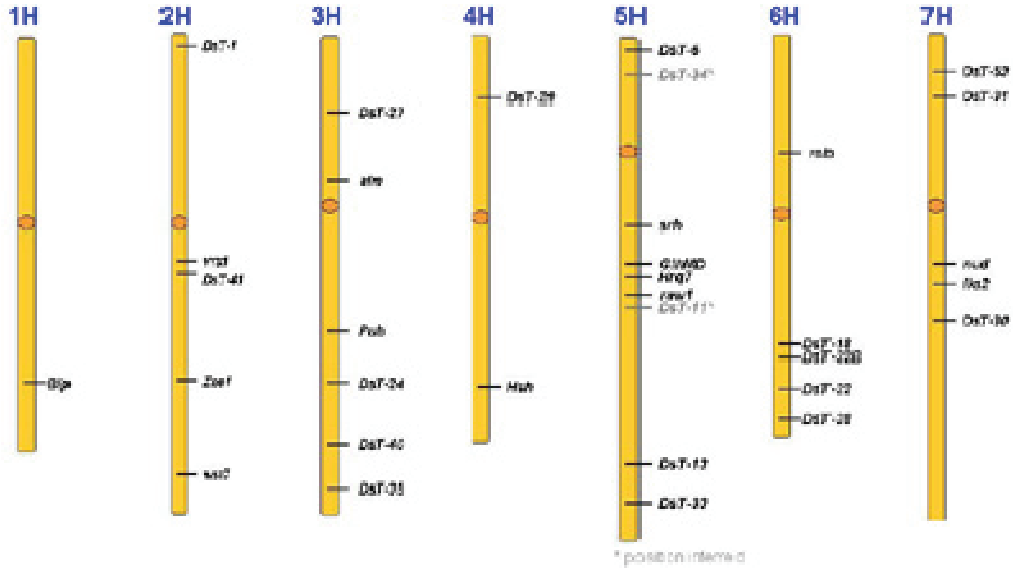
kadar gelişir. Başakları ortalama 8-15 cm uzunluğundadır. Tahıllar içerisinde en çok kardeşlenenlerden olup olağan durumda 5 – 8 kardeş verir. Yapraklarının topraktan mineral emilim yetenekleri yüksek olduğundan besin akışı 30 – 35 cm'ye ulaşabilir. Böylece arpa, insan besini olarak yeterli miktarda vitamin, protein ve mineraller içerir (İmamoğlu ve Sarı, 2009).

Arpanın başak morfolojisi yönünden; 2, 4 ve 6 sıralı olmak üzere 3 tipi bulunmaktadır. Farklı iklim koşullarına uyabilen ve dayanıklı bir bitki olan arpa dünyanın çok çeşitli bölgelerinde yetişebilir (Bennett ve Smith, 1976). Asidik ortam ve nemli koşullara duyarlı olmasına rağmen; soğuk, kuru, tuzlu, alkali toprak türlerine ve kuraklık gibi stress koşullarına diğer tahıl türlerine oranla daha dayanıklıdır (von Bothmer ve diğ., 1995; Shakhathreh ve diğ., 2009).

Arpa neolitik dönemden itibaren milyonlarca insan tarafından önemli bir besin kaynağı olarak tüketilmiş olsa da, bugün daha çok hayvan yemi ve bira yapımında kullanılmaktadır. 1980'lerde Avrupa ve Amerika'da besin değerinin anlaşılmasıyla gıda sektörüne yeniden girmiştir. Ancak, Asya ve Afrika'daki bazı kültürlerde arpanın gıda sektöründeki yeri eski çağlardan beri değişmemiştir. Bunun yanı sıra, buğdayın ekilemediği kutup bölgelerinde ve yüksek dağlık bölgelerde arpa ekilerek besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Bugün dünyada ekimi yapılan arpanın % 65'i hayvan yemi olarak, % 33'ü maltlık olarak bira ve viski yapımı ile biyodizel üretiminde, % 2'si de insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. (Dunwell, 1986; Goldstein ve Kronstad 1986; Bregitzer ve Campbell 2001; Baik ve Ulrich, 2008; Schulte ve diğ., 2009).

2.1.1 Arpa Genetiği

Arpa yaklaşık 5500 baz çiftinden oluşan geniş bir genoma sahiptir. Diploid kromozom sayısı $2n=14$ (Şekil 2.1), nükleer DNA 1C değeri 5,2 pg, nükleer DNA 2C değeri 10,4 pg ve nükleer DNA 4C değeri ise 20,8 pg'dır. 501.620 EST ve 8.012 protein verisi mevcuttur. Genomunun % 60 – 80'i tekrar dizilerinden oluşur (Bregitzer ve Campbell 2001; Bennett ve Leitch, 2005; <http://wheat.pw.usda.gov/BarleyTNP/>).



Şekil 2.1: Arpanın 7 çift kromozomunun şematik gösterimi (<http://wheat.pw.usda.gov/BarleyTNP/>)

Arpa ile yapılan moleküler çalışmalar birçok bilimsel konunun aydınlanmasında yararlı olmuştur. Bunların başlıcaları; bitki (özellikle *Poaceae*) biyolojisi, yüksek derecede korunmuş genlerin anlatımının yakın akraba türlerde arpaya özgü özellikleri ifade etmesi, arpa genomik çalışmalarının, gen transfer yöntemlerinin ve farklı moleküler tekniklerin geliştirilmesi, doku kültürü, epigenetik ve transpozonlar ve transpozonların gen anlatımına etkisinin anlaşılması ile ilgilidir (Bregitzer ve Campbell 2001; Li ve Yu 2007).

Günümüzde, (Uluslararası Arpa Dizileme Birliği) 'International Barley Sequencing Consortium' IBSC tarafından arpa genom dizisinin saptanmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (Bennett ve Leitch, 2005). Dünyanın birçok yerinde çok sayıda arpa *ex situ* gen bankalarında 31 *Hordeum* türünden 370.796 numune barındırmaktadırlar. Arpa genomunun çok sayıda iyi tanımlanmış haritaları çıkartılmıştır. Güncel olarak bilinen 5.000'den fazla önemli arpa geni de haritalar üzerinde gösterilmişlerdir (<http://www.public.iastate.edu/~imagefpc/IBSC%20Webpage/IBSC%20Template-home.html>). Bu haritaların oluşturulmasında çoğunlukla 'Bacterial Artificial Chromosome'(Bakteri Yapay Kromozomu) BAC'lar kullanıldığından, aynı zamanda

çok sayıda arpa BAC kitaplıkları da mevcuttur (Gabert ve diğ., 1996; Forster ve diğ., 2000; Schulte ve diğ., 2009). Arpa genom dizisinin 2012 yılında tamamlanması beklenmektedir

(<http://www.indiaprwire.com/pressrelease/agriculture/200804098649.htm>).

Yurdumuzda, arpa ile yapılan ilk temel genetik araştırmalar İstanbul Üniversitesi Botanik ve Genetik Kürsüsü'nde 'Basic Genetic Studies for Obtaining High Quality Barley Lines' (Yüksek Kalitede Arpa Hatları Elde Etme Amaçlı Temel Genetik Çalışmalar) projesi ile başlatılmıştır (Bilge ve diğ., 1981). Çalışmada Zafer 160 arpa tohumlarına ekimden önce X ve gama ışınları, etil alkol, streptomisin, terramisin, penisilin G, sodyum siyanür ve etilmetan sülfonat çözeltileri uygulanmıştır. Daha sonraki yıllarda çalışmalar, doku kültürü (Gözükırmızı ve diğ., 1990) , gen transferi (Gürel ve Gözükırmızı, 2003) moleküler markır (Temel ve diğ., 2008; Arı ve diğ., 1995; Albayrak ve Gözükırmızı, 1999; Altınkut ve diğ., 2001) yöntemleri ile devam etmiştir. 40 yılı aşkın bir süredir genetik temelli çalışmalarında arpayı model sistem olarak kullanan İstanbul Üniversitesi, günümüzde de Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde arpa bitkisi çok değişik amaçlı projelerde kullanılmaktadır (Bilge ve diğ., 1981; Arıcan ve Gözükırmızı, 2008; Kartal ve diğ., 2009).

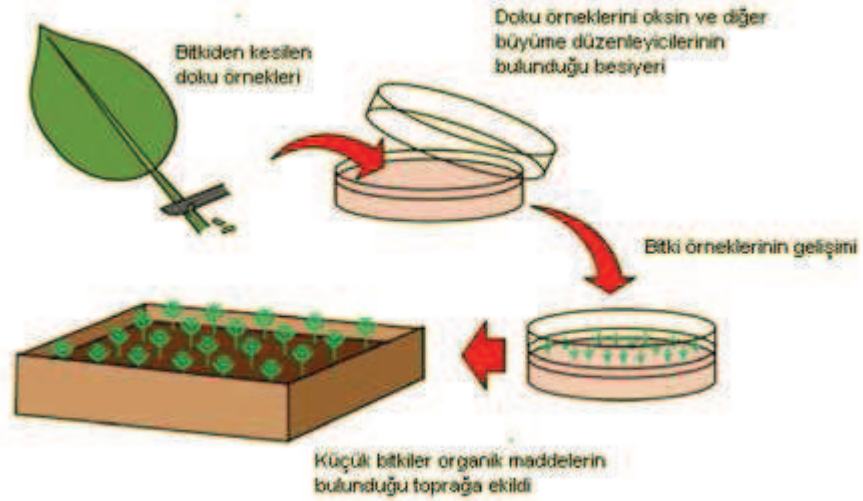
Bu çalışmada kullanılan Zafer 160 arpa varyetesi, 1932 yılında Yeşilköy Ziraî Araştırma Enstitüsünde seleksiyon yöntemi ile ıslah edilmiştir. 6 sıralı, seyrek başaklı, kılçıklı, tane dökmeyen, kavuzlu taneli, 1000 tane ağırlığı 52 g, kısa, kurağa dayanıklı, orta erkenci, verimli, bütün hastalıklara dayanıklı, biralık kalitesi orta derecede bir arpa çeşididir (Altınkut ve diğ., 2001).

2.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Yapay besi ortamlarında bitki veya hayvanlardan alınan canlı doku ya da hücrelerin çoğaltılması mümkündür. Bu doku veya hücrelerin steril koşullarda üretilmesine doku kültürü ya da hücre kültürü denilmektedir (Şekil 2.2). Bitki doku kültürü, bitki tohumları, organları, dokuları, hücreleri ya da protoplastlarının aseptik koşullar altında yapay besi ortamlarında kültüre alınması durumudur. Bitki doku kültürü yapımında bitkiden alınan doku parçalarına eksplant denir. Bu kültür sonucunda, yeni doku, bitki

veya ikincil metabolitler gibi bitkisel ürünler elde edilebilir (Passarge, 2000; Babaoğlu ve diğ., 2002; Öztürk ve diğ., 2002; Uysal ve Yıldırım, 2003; http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_tissue_culture).

Bitki doku kültürü alanında ilk çalışmalar 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. Ancak kullanılan eksplantların ve yetiştirme ortamlarının uygun olmayışı sebebiyle başarı sağlanamamıştır. Özellikle 1960'lı yıllarda uygun besin ortamlarının bulunmasından sonra, bu konudaki çalışmalar daha da artmış ve son 25 yıllık dönemde diğer biyolojik alanlarda olduğu gibi bu alanda da gözle görülür ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün doku kültürlerinden elde edilen sonuçlar laboratuvar dışına çıkarak uygulamada ve ticaretle kullanım alanı bulmuş olup gelişen teknikler her geçen gün daha da önem kazanmaktadır (Er ve Canpolat 1992).



Şekil 2.2: Mikroçoğaltım amaçlı bitki doku kültürü yöntemi (<http://nayfahsaienceproject.blogspot.com/2007/07/planttissue-culture.html>).

Bitki doku kültürünün hem teorik hem de deneysel temelleri, totipotensi ve fenotipik esneklik kavramlarına dayanır. Totipotensi, bir hücrenin, mitoz bölünmeler yoluyla bölünüp tam bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine denmektedir (Yentür, 1995; Vasıl, 2008). Bu kavram ilk defa Schleiden (1838) ve Schwann (1839) tarafından ortaya atılmıştır. Schwann (1839), bitki hücrelerinin aslında otonomik olduğunu ve prensip olarak, yeni bir bitkiyi tümünden oluşturmak üzere kendilerini rejenere edebileceklerini söylemiştir. Fenotipik esneklik ya da fenotipik plastisite organizmaların ortamlarına en

iyi şekilde uyum sağlayabilmeleri için kendi metabolizma, büyüme ve gelişmelerini değiştirebilme yetenekleridir. Bitkilerin yüksek totipotensi ve fenotipik esneklikleri sayesinde, çok başarılı bitki doku kültür modelleri kurulabilmiştir (Phillips ve diğ., 1994; Vasıl, 2008).

Bitki doku kültürünün birçok uygulama alanı vardır. Üretimi zor olan endemik bitkilerin mikroçoğaltımının yapılması, germplazm kaynaklarını kullanarak kaybolan türlerin korunması, ikincil metabolitlerin üretimi, genetik çeşitliliği arttırmak amaçlı haploid bitki üretimi, yeni varyetelerin geliştirilmesi, biyoteknolojik uygulamalarla transgenik bitkilerin elde edilmesi ve üstün özellikli bitki klonlarının oluşturulması bunlardan bazılarıdır (Passarge, 2000; Babaoğlu ve diğ., 2002; http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_tissue_culture; Kothari ve diğ., 2010).

2.2.1 Kallus Kültürü

Eksplantlar genellikle oksin ve sitokinin içeren uygun bir besiyerinde kültüre alındıklarında düzensiz bir büyüme ve aşırı bir hücre bölünmesi gösterebilirler. Doğru koşullar oluşturulduğunda bitkinin herhangi bir dokusunun eksplant olarak kullanılabilmesi mümkündür. Kallus periyodik olarak yenilenen taze bir ortamda alt kültüre alındığında, bu çoğalma neredeyse süresiz olarak devam ettirilebilir. Eksplant olarak kullanılan dokudaki farklılaşmış hücreler kallus oluşumu sırasında bir dereceye kadar tersine farklılaşabilir 'dedifferentiation'. Bu farklılaşma hem morfolojik hem de metabolik düzeyde olabilir. Farklılaşan bu hücreler tıpkı kök hücreler gibi pek çok hücre çeşidine tekrar farklılaşabilme 'redifferentiation' kabiliyetindedirler. Kallus hücrelerinde görülen bu tersine farklılaşmanın en önemli sonuçlarından biri fotosentez özelliklerini kaybetmeleridir. Bu sebeple kallus, metabolik görünüm bakımından eksplantın alındığı ana bitkiye benzememektedir. Kallusun genellikle fotosentez yapamaması nedeni ile besiyerine kallusun kullanabilmesi için mineraller, vitaminler ve karbon kaynakları (sukroz gibi) eklenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Işık, kallus'ta farklılaşmaları teşvik edebileceği için, kallus kültürü karanlık ortamlarda yapılmalıdır. Uzun süreli kültür esnasında kallus, oksin ve sitokinine olan gereksinimini kaybedebilir. Alışma 'habituation' olarak da bilinen bu durum bazı bitki çeşitlerinin kallus kültürlerinde sıkça görülen genel bir durumu teşkil eder.

Kallus kültürü, bitki biyoteknolojisinde önemli bir yer tutar. Besin ortamındaki oksin ve sitokinin oranlarında değişiklikler yapılarak, kök, sürgün ve somatik hücreler gelişebilir hatta böylelikle tüm bitki de oluşturulabilir. Kallus kültürleri, aynı zamanda bitki transformasyonları araştırmalarında kullanılan hücre süpsansiyonlarının elde edilmesi için de kullanılabilir (<http://www.oup.com/uk/orc/bin/0199254680/ch02.pdf>).

2.2.2 Arpada Embriyojenik Kallus Kültürü Çalışmaları

Tahıl bitkileri ile gerçekleştirilen doku kültürlerinde gelişim için genellikle olgunlaşmamış tohum embriyoları kullanılmaktadır. Bununla beraber eldesi ve nispeten steril bir doku olması nedeniyle olgun tohum embriyoları da doku kültür çalışmalarında kullanılmaktadır.

Kültür ortamı içerdiği karbon kaynağı, vitaminler ve esansiyel elementler aracılığıyla, eksplantın totipotensi ve fenotipik esneklik kavramları doğrultusunda rejenerasyon olmasını sağlar. Bu içeriklerin yanı sıra, bitki büyüme düzenleyicileri eksplantın ya da bitki doku kültüründe büyümekte olan bitki hücrelerinin gelişimsel yollarını belirleyen kimyasallardır. Genelde bitki hormonları veya bu hormonların sentetik analogları olan bitki büyüme düzenleyicileri, başlıca beş gruba ayrılırlar. Bunlar; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir. Kallus ve embriyo kültürlerinde en çok oksinler ve sitokininler, daha az miktarda da gibberellinler kullanılmaktadır. Arpa doku kültüründe bitki büyüme düzenleyicilerinden bir oksin olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'in kallus eldesi için yeterli olduğu bilinmektedir. Bazı yeni hormon karışımları ile kallus oluşma oranı arttırılabilmektedir (Babaoğlu ve diğ., 2002; <http://www.oup.com/uk/orc/bin/0199254680/ch02.pdf>).

Arpada etkin bir transformasyonun gerçekleştirilebilmesi için kallustan çok sayıda bitki rejenerasyon sisteminin kurulması gerektiği bildirilmiştir. Olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile embriyojenik kallusların elde edilmesi ve değişik ortam ve genotiplerin embriyojenik kallus elde edilmesi üzerine etkileri yoğun bir şekilde araştırılmış olmasına karşın, embriyojenik kalluslardan bitki rejenerasyonu üzerinde çok fazla bir araştırmanın olmadığı bildirilmiştir. Farklı zamanlarda olgunlaşmamış embriyoların kültüre alınmasının kalluslardan yüksek oranda bitki rejenerasyonunun olup olmayacağını araştırmak için kontrollü koşullarda Golden Promise ve Morex arpa

çeşitlerinin 4 değişik tarihte ekimi yapılmıştır. Ekim ayında ekimi yapılan arpa çeşitlerinden elde edilen kalluslardan diğer tarihlerde ekimi yapılanlara göre daha fazla bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir (Dahleen, 1999). Rejenerasyonda sıcaklıktan çok radyasyonun etkili olduğu ortaya konulmuştur. Sera koşullarındaki verici bitkilerin rejenerasyonunda da doğal ışığın sıcaklıktan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Dahleen, 1999). Farklı oksin ve sitokinlerin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarının, arpanın olgun embriyolarından kallus oluşumu üzerine olan etkiler araştırılmıştır. Kallus oluşumunu uyararak amacıyla oksin olarak 2,4-D kullanılmıştır. Farklı çeşitlerin değişik 2,4-D konsantrasyonlarındaki kallus oluşturma yeteneklerinin farklılık gösterdiği belirlenmiş ve embriyolardan bitki gelişimi üzerine 2,4-D'nin etkisi araştırılmıştır. Bazı çeşitlerde sitokinler kallus gelişimini arttırmış, bazılarında ise ket vurmıştır (Bayliss ve Dunn, 1979).

Oka ve diğ. (1995), yapmış oldukları bir çalışmada sırasıyla 2 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l pikloram içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında arpanın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumu elde etmişlerdir. Araştırma sonucunda, olgunlaşmamış embriyoların skutellum epidermisinden elde edilen 'nodular compact' kalluslardan meristem dokularından rejenere olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşmış embriyolarda ise meristemlerin, yaprağın epidermal hücrelerinden ya da koleoptilin kök kısmından elde edilen 'nodular compact' kalluslardan oluştuğunu gözlenmiştir (Oka ve diğ., 1995).

Akula ve diğ. (1999), yapmış oldukları bir çalışmada 9 arpa çeşidinin olgun embriyolarından kallus elde etmenin bitki rejenerasyonu için güvenli bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Oksinlerden; 2,4-D, (3,6-dikloro-orto-anisik asit) '3-6-dichloro-o-anisic acid' dicamba ve pikloramın birçok arpa çeşidinin olgun embriyolarından kallus oluşumunu olumlu etkilediği kanıtlanmıştır. Oluşan kallusların dağınık, kırılğan ve şeffaf olduğu belirtilmiş, aynı bileşimi içeren yeni ortam üzerine 2-3 kez aktarıldıktan sonra da beyaz yoğun kalluslar oluştuğu gözlenmiştir. Pikloramın yüksek konsantrasyonda kullanılması sonucu 3 çeşitte (Tallon, Grimmet, Sloop) rejenerasyon kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. Arapiles, absisik asit ve betain gibi kimyasalların olgun embriyolardan morfojenik kallus uyarımında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu kalluslardan rejenere olan bitkilerin dayanıklı olduğu ve hormon

içermeyen ortama aktarıldığı zaman köklerin gelişmeye hazır olduğu belirtilmiştir (Akula ve diğ., 1999).

Chang ve diğ. (2003), yapmış oldukları bir çalışmada önemli biralık arpa çeşitlerinden olan Morex için etkin bir bitki rejenerasyon sistemi kurmuşlardır. Olgunlaşmamış embriyo büyüklüğünü ve bir seri kültür ortamını bu araştırma kapsamında denemeye almışlardır. Embriyojenik kallus oluşumu için embriyo büyüklüğünün çok önemli olduğu bulunmuştur. Küçük embriyoların (0,5-1,5 mm) büyük embriyolara göre daha fazla embriyojenik kalluslar oluşturduğu tespit edilmiştir. 3 mg/l 2,4-D ya da dicamba ile değiştirilmiş MS ortamının embriyojenik kallus oluşumu için uygun olduğu saptanmıştır. Embriyojenik kallusların, kallus oluşum ortamında altı kez alt kültüre alındığında bile rejenerasyon özelliğini koruduğu ortaya çıkmıştır (Chang ve diğ., 2003).

Halankova ve diğ. (2004), yapmış oldukları bir çalışmada tarımsal açıdan önemli 23 arpa çeşidinin kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve rejenerasyon kapasitesini, 2,4-D ya da dicamba'lı oluşum ortamında ve modifiye edilmiş rejenerasyon ortamı üzerinde denemişlerdir. Kallus oluşturan zigotik embriyoların sıklığının genotipe göre %88-100 oranında değiştiğini belirlemiştirler. Somatik embriyogenesis ve rejenerasyonun yüksek sıklık göstermesi için dicamba'nın 2,4-D'den daha uygun olduğu gözlenmiştir. Bütün çeşitlerde yeşil embriyolar elde edilmiş ve bunların içinde albino bitkilere rastlanmamıştır. Denemede Victor çeşidi hariç kullanılan bütün çeşitler düşük rejenerasyon kapasitesi göstermiş ve örnek olarak Golden Promise çeşidi ile karşılaştırılmışlardır (Halankova ve diğ., 2004).

Sharma ve diğ. (2005), araştırmalarında Avrupa arpa çeşitlerinin bir serisinin kuru tohumlarından olgun embriyoları kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda embriyojenik kallusların elde edildiği ve bu kallusların kullanılabilir bir sistem olduğu saptanmıştır. Çimlenme gücü düşürülmüş embriyolardan yüksek oranda embriyojenik kalluslar, bu kalluslardan da yüksek oranda yeşil gelişmiş bitkiler elde edildiği ortaya çıkmıştır. Olgun embriyoların uzunlamasına iki eşit parçaya bölünüp kültüre alınması durumunda ise embriyonun en az çimlenmeyi ve en iyi kallus oluşumunu gösterdiği gözlenmiştir. Embriyogenesis ve uzun vadeli olarak morfojenik kapasitesinin korunması

için ortamdaki BAP (6-benzilaminopürin) bileşeninin düşük seviyeleri çok etkili bulunmuştur. Bu çalışmaya göre; toprağa aktarılmaya hazır hale gelen bitkilerin gelişimine kadar olan bütün adımlarda olgun embriyoların ilk izolasyonundan 16-20 hafta sonra bitki rejenerasyonu tamamlanmıştır. Tüm arpa çeşitlerinde uygulanan benzer araştırmalar sonucu, embriyojenik kallusun ortalama oranının % 22-25 arasında olduğu ve kallus eldesi ve kallus tipinin, kullanılan arpa çeşidine, eksplanta ve kültür koşullarına bağlı olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (Sharma ve diğ., 2005).

2.3. SOMAKLONAL VARYASYON

Bitki doku kültüründe, kökenleri aynı olmasına rağmen hücrelerde varyasyonlar meydana gelebilir. Kültürdeki hücreler birbirlerinden morfolojik, fizyolojik veya genetik olarak farklı hale gelebilirler. Bitki doku kültüründe sıklıkla rastlanılan bu duruma somaklonal varyasyon adı verilmektedir (Larkin ve Scowcroft, 1981). Somaklonal varyasyonlar, kromozom sayısı ve yapısındaki değişiklikler, gen mutasyonları, somatik krossing-over, kardeş kromatid değişimi, insersiyon, delesyon, metilasyon değişimi, transpozonların hareketleri gibi pek çok genetik ve epigenetik değişikliklerin sonucunda meydana gelebilirler (Schellenbaum ve diğ., 2008).

Doku kültürü çalışmaları biyoteknolojik uygulamalar için önem taşır. Somaklonal varyasyon, hızlı bir varyasyon kaynağı olduğu için bazı değişimler yüksek frekanslarda meydana gelebilir, yeni varyantlar ortaya çıkabilir ve varyeteler oluşabilir. Buna karşın somaklonal varyasyon mikroüretimde büyük kayıplara da neden olmaktadır.

Günümüze kadar doku kültüründe somaklonal varyasyonların epigenetik temelli oluşumlarını araştırmaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. DNA metilasyonunun kültürde rejenere olan bitkilerde ve onların nesillerinde yüksek oranda görülmesi, DNA modifikasyonlarının kültür sürecinde stabil olmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, epigenetik varyasyonların doku kültüründe meydana gelen somaklonal varyasyonlarla yakın ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (Kaepler ve Kaepler, 2000).

2.3.1 Somaklonal Varyasyonların Sebepleri ve Tespit Edilme Yöntemleri

Somaklonal varyasyon mekanizmalarının belirlenmesi doku kültürü çalışmalarında istenmeyen varyasyonlara karşı geliştirilebilecek yöntemler için önem taşır. Bitki doku

kültürü koşullarının uyardığı varyasyon; eksplant eldesi işlemlerindeki yaralanmalar, 2,4-D uygulaması, sentetik besiyeri gibi stres koşulları nedeni ile olabilir. Daha önce Madlung ve Comai (2004), doku kültürü koşullarını, genomik stresi sağlayan faktörlerden biri olarak belirlemişlerdir. McClintock (1984) ise, stresin kromozom parçaları veya kromozomların kaybına, transpozisyon olayları ile kolaylaştırılan kırılma ve füzyon gibi genomik düzenlenmelere sebep olabileceğini belirtmiştir (Madlung ve Comai, 2004).

2,4-D, kallus oluşumunu uyardığı için en çok kullanılan hormonlardan biridir. Buna karşın sitozin metilasyonunda artışa sebep olmaktadır. Somaklonal varyasyonların oluşumunda epigenetik değişiklikler, özellikle DNA (sitozin) metilasyonu, genetik değişikliklerden daha önemli bir role sahiptir (Peredo ve diğ., 2006; Temel ve diğ., 2008). Metillenmiş sitozinler bitki genomunda düzenli bir şekilde dağılmazlar ve transpozonlar yüksek oranda metillenmiş bölgelerdir (Rabinowicz ve diğ., 2005).

Doku kültürü koşullarının sebep olduğu transpozon hareketliliği ilk kez Tto1, Tto2, Tnt1 retroelementleri için Hirochika (1993) tarafından tütün bitkisinde gösterilmiştir. Son yıllarda Huang ve diğ. (2009) ise, pirinç doku kültüründe nDaiZ retrotranspozonun aktivasyonunu ortaya koymuşlardır.

Doku kültürü sırasında meydana gelen varyasyonların belirlenmesi çok değişik yöntemler ile olabilmektedir. Bu yöntemlerin başında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi gelmektedir. Bitki DNA polimorfizm analizleri, gen kaynakları ve genetik benzerlikleri araştırmak ve nitelendirmek için güçlü bir araçtır. Son 20 yıldan beri birçok farklı moleküler markır tekniği geliştirilmiştir. Bir moleküler markır, kalıtımı güvenilir şekilde belirlenebilen, bir protein veya DNA dizisidir. Moleküler markırlardan bazıları (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’ RFLP, (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ‘Random Amplified Polymorphic DNA’ RAPD, (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) ‘Amplified Fragment Length Polymorphism’ AFLP, (Basit Dizi Tekrarları) ‘Simple Sequence Repeats’ SSR, (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ‘Single Nucleotid Polymorphism’ SNP, (Diziye Özgü Çoğaltma Polimorfizmi) ‘Sequence Specific Amplification Polymorphism’ SSAP, (Metilasyona Duyarlı Çoğaltım

Polimorfizmi) ‘Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism’ MSAP, (Retrotranspozonlararası Çoğaltılmış Polimorfizm) ‘Inter Retrotranspozon Amplified Polymorphism’ IRAP, (Retrotranspozon–Mikrosatelit Çoğaltılmış Polimorfizm) ‘Retrotranspozon–Microsatellite Amplified Polymorphism’ REMAP (Retrotranspozon Temelli İnsersiyon Polimorfizmi) ‘Retrotranspozon Based Insertional Polymorphism’ ve RBIP şeklinde sıralanabilir. Bu markır teknikleri birçok bitki ve hayvanda genetik akrabalığın teşhisinde tür içi ve türler arasında kullanılmaktadır. Somaklonal varyasyonların tespitinde en çok kullanılan moleküler markır analizleri; AFLP, SSAP ve MSAP yöntemleri iken özellikle retrotranspozonların sebep olduğu polimorfizmin belirlenmesinde IRAP, REMAP, RBIP ve SSAP markırları kullanılmaktadır (Schulman ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2007; Bednarek ve diğ., 2007; Schellenbaum ve diğ., 2008).

2.4. TRANSPOZONLAR ve EPİGENETİK

2.4.1. Transpozonlar

Transpozonlar genom içinde yer değiştirebilme yeteneğine sahip DNA dizileridir. Bu yer değiştirebilen tekrarlı diziler, transpozisyon aracılığı ile bir kromozomal bölgeden diğerine hareket ederler. *Plasmodium* cinsinin bir kaç türü hariç tüm ökaryotlarda ve neredeyse tüm prokaryotlarda bulunan transpozonlar, ökaryotik genomların büyük bir yüzdesini oluştururlar (Okamoto ve Hirochika 2001; Bowen ve Jordan, 2002; Grzebelus, 2005; Jurka, 2007; Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2009). Transpozonlar, bitki genomlarının ortalama % 50-90, hayvan genomlarının da % 3-45 kadarını oluşturmaktadırlar. Prokaryotların çoğunluğunda % 1-3 oranında bulunan transpozonların yüzde miktarı, mayada (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) % 3, memelilerde % 25-45, insanda % 45 ve Graminaceae’de ve Liliaceae’de % 90-98 kadardır (Bowen ve Jordan, 2002; Schulman ve Kalendar, 2005; Wicker ve diğ., 2007; Mansour, 2007; Roberts ve diğ., 2008; Wessler, 2009; Lerat, 2009). Barbara McClintock’un kontrol elementleri ismini verdiği transpozonlar, bazı mısır tanelerinin pigmentasyonu için gerekli genlere insersiyon yapıp, bu genleri inaktive etmektedirler.

Transpozonlarla çalışmış olan ilk bilim insanları, 1914’te mısır genetikçisi Emerson (1914) ve 1941’de sitogenetikçi Rhoades (1941) olmuştur. Bu araştırmacılar, mısırdaki transpozonların neden olduğu fenotipik varyasyonların arkasındaki genetik

mekanizmaları araştırmışlar ancak bu varyasyonların transpozonlardan kaynaklandığını anlayamamışlardır (Federoff, 2001). Transpozonlar ilk kez, 1948 yılında McClintock (1948). tarafından, mutant mısır (*Zea mays* L.) tanelerindeki farklı pigment yapılarına neden olan elementler olarak keşfedilmişlerdir (Şekil 2.3) (Feschotte ve diğ., 2002). Dönemin klasik genetik anlayışına göre kromozomlardaki genlerin sabit olduğu fikri hakim olduğundan, McClintock'un "kontrol elementleri" adını verdiği transpozonların değeri bilim çevrelerince pek anlaşılammış, hatta kabul görmemiştir. Ancak ilerleyen yıllarda genetik yapısı ve temel özelliklerinin ortaya çıkmasıyla ve mayadan insana birçok organizmada var olduğunun kanıtlanmasıyla, 1983 yılında McClintock tıp Nobel ödülüne layık görülmüştür (McClintock, 1984; Feschotte ve diğ., 2002).

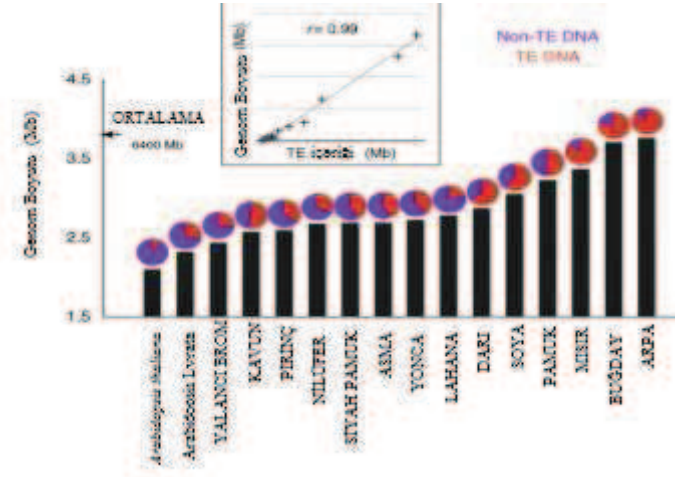


Şekil 2.3: Mutant mısır tanelerindeki pigmentasyon
(<http://www.bioinformatics.nl/webportal/background/transposonsinfo.html>)

McClintock'un kontrol elementleri ile ilgili araştırmalar ilerledikçe, bu elementlere farklı adlar verilmiştir. Bu adların başlıcaları; hareketli (genetik) elementler 'mobile (genetic) elements', zıplayan genler 'jumping genes' ve yer değiştirebilen (genetik) elementler 'transposable (genetic) elements' olarak sayılabilir. Araştırmacılar tarafından günümüzde en yoğun biçimde kullanılan "yer değiştirebilen elementler" sözcüklerinden yola çıkarak popüler transpozon sözcüğü de türetilmiştir (Federoff, 2001; Miller, 2004; Wicker ve diğ., 2007; Roberts ve diğ., 2008).

Tenaillon ve diğ. (2010), bitki transpozonlarının evrimini göstermişlerdir (Şekil 2.4). Transpozonların epigenetik etkisinin azaltılması siRNA aracılığı ile hedef genlerin sessizleştirilmesi ile gerçekleştirildiğini göstermişlerdir. İlk olarak genomik strese yol açan epigenetik sinyallerle uyarılan transpozon hareketleri gerçekleşiyor, bu stresler biyotik faktörler, enfeksiyon, hibridizasyon, abiyotik faktörler ve sıcaklık etkisiyle

oluşturulmaktadır. Transpozonların evolüsyonel etkisinin susturma mekanizmalarıyla etkisizleştirildiğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.4: Angiosperm tür bitkilerdeki transpozon oranı (Tenailon ve diğ., 2010)

2.4.2. Transpozonların Biyolojik Önemleri ve Fonksiyonları

Transpozonlar hareketlilikleri açısından aktif transpozonlar ve inaktif transpozonlar olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. Bu hareketli elementlerin büyük bir yüzdesi, adlarının tersine inaktif transpozonlardan oluşur. Türlerin evriminin erken aşamalarında bu inaktif transpozonlar, transpozisyon yapmış ve bugünkü bulunduğu kromozomal bölgelere yerleşmişlerdir. Bu yüzden inaktif transpozonlar, moleküler fosil olarak da adlandırılmaktadırlar. Ancak transpozonların aktif veya inaktif olması tamamen kalıcı bir durum değildir ve tersine döndürülebilir. Çevresel koşulların değişmesi ve başka faktörler, bu elementleri aktive veya inaktive eden epigenetik yapılanmayı değiştirebilmektedir (Wessler, 2009).

Çoğu transpozonlar iki temel özellik taşırlar. Birincisi, genom içinde bir yerden diğerine hareket edebilme özelliği (transpozisyon), ikincisi de genomdaki kopya sayılarını arttırabilme (replikasyon) özelliğidir (Bennetzen, 2000). Bu ikinci özellikten dolayı ve bazı dizilerin genomda çok yüksek miktarlarda bulduklarının ve “konak” genomlarından daha hızlı replike olduklarının keşfedilmesinden dolayı, araştırmacılar transpozonların, kendi türlerinin devamlılığından başka bir amacı olmayan elementler

olduğunu varsaymış, böylece transpozonlar bencil DNA sıfatını edinmişlerdir (Okamoto ve Hirochika, 2001).

Transpozonlar, transpozisyonları sonucu genomun birçok farklı bölgelerine insersiyon yapabilmektedirler. Özellikle eksonlara veya gen yakınındaki bölgelere yerleştiklerinde; nokta mutasyonu, çerçeve-kayma mutasyonu, delesyon, duplekasyon, inversiyon gibi birçok mutasyonlara yol açmaktadırlar. Bu mutasyonların sonucunda alternatif gen ürünleri oluşabileceği gibi, gen ürünü olan protein oluşmayabilir ve bu ciddi fenotipik değişikliklere sebep olabilir. Bunun yanı sıra replikatif transpozisyonla hareket eden transpozonlar, genom boyutunun büyümesine neden olmaktadır. Gen fonksiyonunu, yapısını ve aktivitesini değiştirebilmekte aynı zamanda genom ve kromozom yapılarının da ciddi boyutlarda değişmesini de sağlayabilmektedirler (Bennetzen, 2000; Federoff, 2000; Wicker ve diğ., 2007; http://www.genbilim.com/index.php?option=com_content&task=view&id=1958).

Bütün bu özelliklerinden dolayı asalak DNA gözüyle bakılan transpozonların içinde buldukları konak genomlara birçok yararları da vardır. Günümüzde moleküler fosil olarak da adlandırılan inaktif elementler aslında doğal seçimde başarılı olabilmış ve genoma zarar vermeyen elementlerdir, çünkü mutasyona neden olan transpozonlar, konak genomlarına zarar verdikleri takdirde organizma yaşayamayacak, bu yeni insersiyonlar yeni döllere aktarılamayacaktır. Yol açtıkları mutasyonlar, gen ve genom düzeyindeki oluşturdukları gerek yapısal gerekse fonksiyonel değişiklikler ve de gerektiğinde yeni alellerin oluşmasını sağlaması sayesinde başarılı ve aktif transpozonlar türlerin evriminde ve hatta yeni türlerin oluşumunda çok önemli roller üstlenmektedirler. Aynı nedenlerden dolayı, transpozonlar çok önemli varyasyon kaynaklarıdır ve fenotipik esnekliğe de yol açarlar. Birçok araştırmacı türlerin evrimsel geçmişinde tek bir genin replikatif transpozisyonu yoluyla gen ailelerinin ortaya çıkmış olduklarını ve bu sayede türlerin farklı gelişimsel ortamlara uyum sağlayabildiklerini düşünmektedir (Wessler, 2006; Bergman ve Quesneville, 2007; Wicker ve diğ., 2007; Wessler ve Micklos, 2009).

Transpozonlar, genlere çok yakın bölgelere veya genlerin promotör bölgelerine de insersiyon yapabilmektedirler. Yakınlarındaki veya promotörlerine girdikleri genleri,

gen anlatımı açısından, etkisizleştirerek düzenlemektedirler. Yer değiştirebilen elementleri oluşturan DNA dizileri, genelde metil grupları bakımından zengindirler. Transpozonlar, gen düzenlenmesini gerek bu metil gruplarının komşu bölgeleri etkilemesi sayesinde, gerekse RNAi (RNA 'interferans') mekanizmasını kullanarak transkripsiyonu engelleyerek gerçekleştirirler. Bu epigenetik gen düzenlenmesi sayesinde transpozonlar, embriyonik gelişim sırasındaki doku farklılaşmasından, ergindeki farklı dokuların farklılıklarının korunmasına kadar birçok mekanizmada görev almaktadırlar. Bu görevleri üstlenmiş olan transpozonların, aynı zamanda, genomların evrimine de büyük katkı sağlamış oldukları düşünülmektedir (Colot, 2004; Lippman ve diğ., 2004; Jurka, 2007; Wessler, 2009; Venner ve diğ., 2009).

Moleküler fosil olarak adlandırılan transpozonlar, kromozom yapısı için ayrıca çok önemli başka fonksiyonlara da sahiptirler. Kromozom yapısının oluşumu sırasında, birçok transpozon bugün sentromer ve telomer olarak bilinen bölgelere yerleşmiş ve yerleştikten sonra inaktive olmuşlardır. Ökaryot kromozomlarının heterokromatin denen bölgeleri çoğunlukla bu moleküler fosillerden oluşmaktadır. Bunun dışında başka transpozonlar, aktif olarak kromatin yapısının oluşumunda, sentromer fonksiyonunda ve sinaptonemal komplekslerin bir araya gelmesinde, dolayısıyla hücre bölünmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Thornburg ve diğ., 2005; Biémont, 2009).

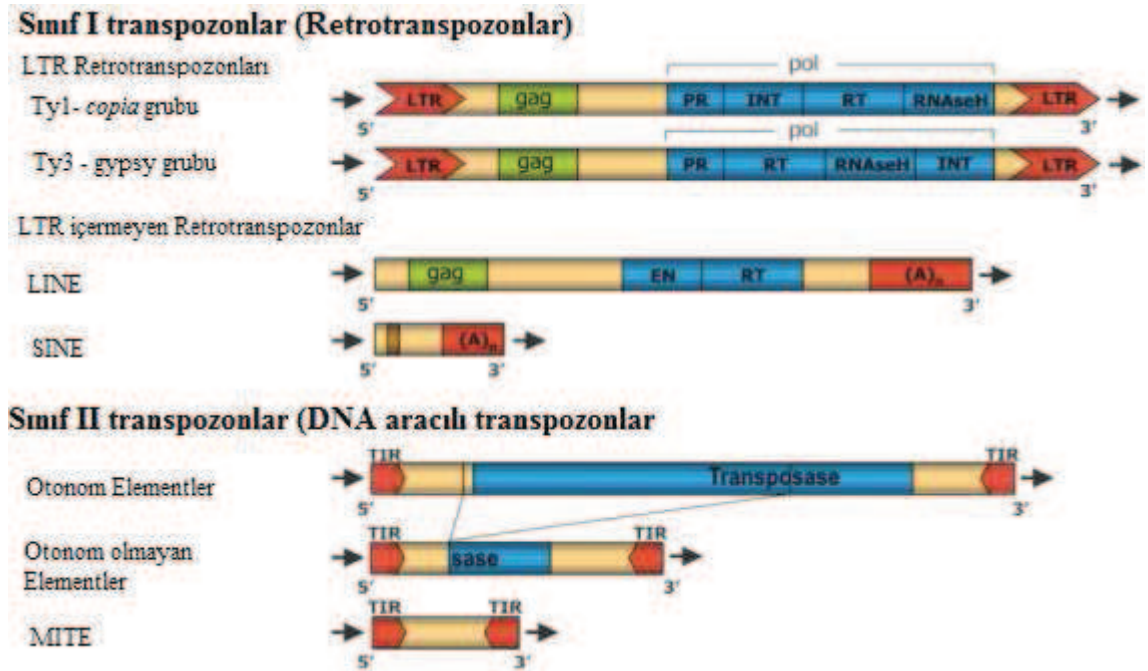
Uygulama alanında transpozonlar, moleküler biyologlar tarafından birçok amaçla kullanılmaktadır. Transpozonların neden olduğu insersiyon polimorfizmleri moleküler teknikler kullanılarak belirlenmekte, böylelikle transpozonlar; DNA parmakizi, çeşitlilik ve filogeni araştırmaları ve genetik haritalamaya yönelik olarak birer markır olarak kullanılmaktadırlar. Bunun dışında, gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi, mutasyon patern algılayıcısı ve mutasyon aracı olarak da kullanılırlar. Genleri insersiyonal biçimde baskılanarak, gen fonksiyonu araştırmalarında da kullanılırlar. Prokaryotlarda klasik antibiyotik–direnc markırı olarak kullanılmalarının yanı sıra izole edilebilirler ve plazmid vektörler kullanılarak bakteri transformasyonunda da kullanılabilir.

Transpozonların gen izolasyonunda kullanılması mutant fenotipten istenilen genin izolasyonu için önemlidir. İzlenecek yol transpozon insersiyonu ile oluşan mutanı

bulmak, kopyalanmış transpozonu prob olarak kullanarak genom kitaplığından geni izole etmek, mutant gen aracılığıyla yabancı geni bulmaktır. Genelde aktif elementi bilinen organizmalar bu tip çalışmalarda kullanılırlar. Organizmada tanımlanmış element yoksa heterolog olan transpozonlar kullanılır ve element mutlaka istenilen gene giriş yapar (Grzebelus, 2005; Bergman ve Quesneville, 2007; Moran ve Malik, 2009).

2.4.3. Transpozonların Sınıflandırılması, Hareket Mekanizmaları ve Yapıları

Transpozonlarda sınıflandırma, ilk defa Finnegan (1989) adlı bir araştırmacı tarafından yapılmıştır ve bugün kullanılan sınıflandırmanın temelini oluşturur (Şekil 2.5). Bu sistem transpozonları, kullandıkları transpozisyon araçlarına göre ikiye ayırmaktadır (Wicker ve diğ., 2007).



Şekil 2.5: Transpozon sınıf ve yapılarına genel bakış (Roberts ve diğ., 2008).

LTR: Uzun Uç Tekrarları 'Long Terminal Repeats' LINE: Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler 'Long Interspersed Nuclear Elements' SINE: Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler 'Short Interspersed Nuclear Elements' MITE: Minyatür Evrik tekrarlı Yer değiştirebilen Elementler 'Miniature Inverted repeat Transposable Elements'

Retrotranspozon da denilen, sınıf I transpozonları, transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanan RNA transpozonlarıdır. Bir RNA polimeraz enzimi aracılığı ile transpozonun mRNA'ya transkripsiyonu yapılır ve ardından ters transkriptaz aracılığı ile bu mRNA cDNA'ya dönüştürülür. Sentezlenen cDNA genomdaki hedef bölgeye yerleşerek yeni

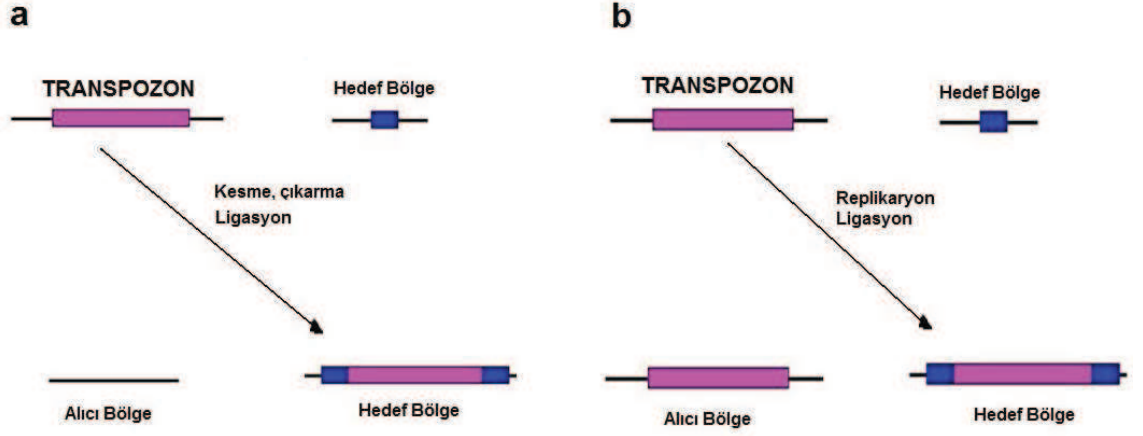
konumunu alır. Bu mekanizma yaygın olarak ‘kopyala-yapıştır’ mekanizması olarak bilinir (Marco ve Marin, 2005; Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2009).

Sınıf II transpozonları ise, transpozisyon aracı olarak RNA’yı kullanmayan DNA transpozonlarıdır. Yer değiştirebilen bu DNA dizisi, kendilerini buldukları kromozomal bölgeden keserek çıkartırlar ve ardından hedef bölgeye insersiyon yaparlar. Bu mekanizma da yaygın olarak kes-yapıştır ‘kes-yapıştır’ mekanizması olarak bilinir (Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2009).

Hem prokaryot hem de ökaryotlarda, Minyatür Evrik tekrarlı Yer değiştirebilen Elementler ‘Miniature Inverted repeat Transposable Elements’ (MITE) gibi, RNA aracılığı olmadan kopyala-yapıştır mekanizmasıyla hareket edebilen transpozonların keşfedilmesi, ikili sisteme meydan okumuştur. Bazı araştırmacılar, bu tarz transpozisyon yapan grupları tamamen ayrı bir sınıf olarak kabul etmiştir. Başka araştırmacılar ise MITE gibi dizilerin keşfinden sonra, transpozonları transpozisyon aracına göre sınıflandırmayı reddederek, tamamen enzimolojik sınıflandırmalar geliştirmişlerdir. Kullanılan ölçütlerden biri, transpozonun kendi transpozisyonu için gerekli olan enzimleri üretilip üretilmemesidir. Buna göre, otonom elementler kendi transpozisyonları için gerekli enzimleri, özellikle transpozazı, kodlayabilen transpozonlardır. Otonom olmayan elementler ise, transpozaz kodlamadıklarından, başka transpozonların kodladıkları transpozazlara ihtiyaç duymaktadırlar.

Bugün kullanılan hiyerarşik sınıflandırma Thomas Wicker tarafından 2007 yılında önerilmiştir (Wicker ve diğ., 2007). Bu sınıflandırma bir yandan Finnegan’ın ikili sistemini temel alırken, bir yandan da mekanik ve enzimatik kriterler kullanmaktadır. Hiyerarşik bir sınıflandırma olduğundan, sınıf, alt sınıf, takım, üstaile, aile ve altaile terimleri kullanılır. En üst takson olan sınıf, ikili sınıflandırmadaki gibi RNA transpozonları ve DNA transpozonları içindir. Bu sınıflandırmada sınıf II olan DNA transpozonları, MITE gibi kopyala-yapıştır mekanizmasıyla çalışan RNA aracısız dizileri de içerir (Deininger ve Batzer, 2002; Wicker ve diğ., 2007). DNA transpozonları iki farklı tipte hareket edebilirler bu sebeple iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.6). Bu transpozonlar kendilerini buldukları lokustan kesip çıkararak (konservatif) veya

kendilerini replike ederek (replikatif) genomun başka bir bölgesine yerleşirler (Wicker ve diğ., 2007).



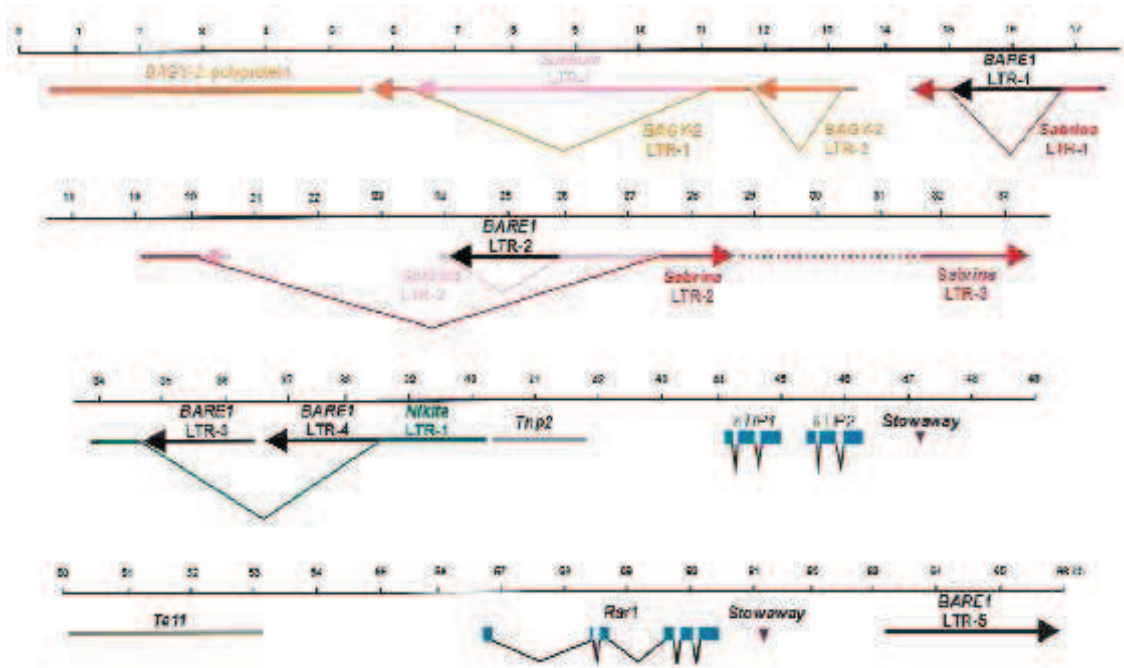
Şekil 2.6: DNA Transpozonlarının hareket mekanizmaları. (a); konservatif tip transpozisyon, (b); replikatif tip transpozisyon (Wicker ve diğ., 2007)

DNA transpozonları genelde otonom elementler olup basit bir yapıya sahiptirler. Çoğunluğunun gövde kısmında transpozaz enzimini kodlayan tek bir gen ve bu genin iki ucunda ters çevrilmiş tekrarlar 'terminal inverted repeats' (TIR) bulunmaktadır (Şekil 2.5). Transpozaz enziminin rekombinasyonu için gerekli olan bu kısa tekrarlar genelde 10-40 bp uzunluğunda olmakla birlikte, 200 bp uzunluğunda da olabilmektedirler. Otonom olmayan elementler transpozaz kodlayan geni içermezler ancak içerdikleri TIR dizileri ve otonom bir transpozonun üretmiş olduğu transpozaz sayesinde genomda hareket edebilirler. DNA transpozonlarının transpozisyonu sırasında gereken başka bir enzim de rezolvazdır ve transpozonun insersiyon yapabilmesini sağlar (Smit ve Riggs, 1996; Feschotte ve diğ., 2002; Weesler, 2009).

Retrotranspozonlar genelde, uzun uç tekrarları 'long terminal repeats' (LTR) içerip içermediğine göre alt sınıflara ayrılırlar. LTR'li retrotranspozonlar, *gag* ve *pol* adlı iki gen içerirler (Şekil 2.5). *Gag* geni, kılıf yapısında bir proteini, *pol* geni ise çok fonksiyonlu bir polipeptidi kodlar. Bu polipeptid, aspartik proteinaz (AP), ters transkriptaz (RT), RNaz H (RH), ve DDE integras (INT) aktivitelerine sahiptir. LTR'li retrotranspozonlar bitkilerde bol miktarda bulunurken, bu oran hayvanlarda düşüktür. İnsan genomunun % 8'ini oluştururlar. Uzunlukları bir kaç yüz baz çiftinden, 25 kilobaza kadar değişiklik gösterir.

LTR'li retrotranspozonlar bitki genomlarının çok önemli bir yüzdesini kapsarlar. *Arabidopsis thaliana* genomunun % 15 kadarı, arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve buğday (*Triticum* sp.) gibi bazı türlerin genomlarının da % 70-80 kadarı bu dizilerden oluşmuştur. LTR'li retrotranspozonlar evrim sürecinde genom boyutlarının hızlı bir şekilde artmasını sağlamışlardır. Ancak buna rağmen çok küçük bir kısmı aktiftir. Bazı durumlarda LTR'ler arası rekombinasyon, LTR dizilerinin yalnız kalmasına neden olmaktadır. Genomda tek başına kalan LTR dizilerine solo-LTR denir (Marco ve Marin, 2005).

Shirasu (2000), arpanın Rar 1 lokusundaki 66 kb bitişik sekanslarda retrotranspozon varlığını araştırılmış ve 18 kb'lık aralıklarla toplanan 66 kb'lık alanlarda üçlü genler bulmuştur. Bu çalışmada aynı zamanda çoğu retroelementin solo LTR'ler içerdiği ve arpada LTR'ler arasındaki ortak özelliğin de intrakromozomal rekombinasyon içermeleri olduğunu göstermiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Arpada Rar 1 lokusundaki retrotranspozonlar (*Nikita*, *BARE1*, *Sukkula*, *BAGY2*, *Sabrina*) ve genlerin dizilişi (Shirasu ve diğ., 2000).

Hem yapı hem de transpozisyon mekanizması açısından retrovirüslere çok benzerler. Tek farkları, virüs olarak paketlenmelerini sağlayan Env genine sahip olmamalarıdır.

Dolayısıyla Env genini edinmek veya kaybetmek yoluyla birbirlerine dönüşebilirler. Bu sebeple retrovirüslerin evrim sürecinde ökaryotlardaki LTR'li retrotranspozonlardan kökenlenmiş olabileceği düşünülmektedir (Feschotte ve diğ., 2002; Marco ve Marin, 2005; Wicker ve diğ., 2007).

LTR'siz retrotranspozonların başında (Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler) 'Long Interspersed Nuclear Elements' LINE ve (Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler) 'Short Interspersed Nuclear Elements' SINE dizileri gelmektedir. LINE'lar poli-A dizisi içeren retrotranspozonlar olup otonomdurlar. 6.000 bç uzunluğuna kadar çıkabilen ve genomda 500.000 kopya kadar bulunan retrotranspozon kökenli dizilerdir. İnsan genomunun yaklaşık % 20'si LINE dizilerinden oluşur. SINE'lar ise otonom olmayan retrotranspozonlardır. En iyi bilinen örnekleri Alu elementleridir. İnsan genomunda bulunan yaklaşık bir milyon SINE dizisi, genomun % 13'ünü oluşturur.

LINE ve SINE'lar basit genlere benzer, elementin RNA şeklinde kopyalanmasını başlatan bir promotörü ve bir poli-A dizisini içerirler. Bitkilerdeki başka önemli transpozon aileleri (Mutasyona Yol açabilecek Yer değiştirebilen Elementler) 'Mutator-Like Transposable Element' MULE ve (*Oryza sativa*'nın Yer değiştirebilen Elementleri) 'Transposable Elements of *Oryza sativa*' TEOS'dir. MULE'ların 1.000 gen içinde 3.000 kadar kopyası bulunmuştur. Gen içine girdiğinde kimerik transkript oluşumuna neden olarak yeni gen ürünlerini oluşturabilirler. Yer değiştirebilen elementler ayrıca yüksek hayvanlardaki DNA geçişlerinin (yatay gen aktarımı) en önemli sorumluları olarak gösterilmektedirler (Banks ve diğ., 1988; <http://genotyping.wordpress.com/?s=hareketli+dna>).

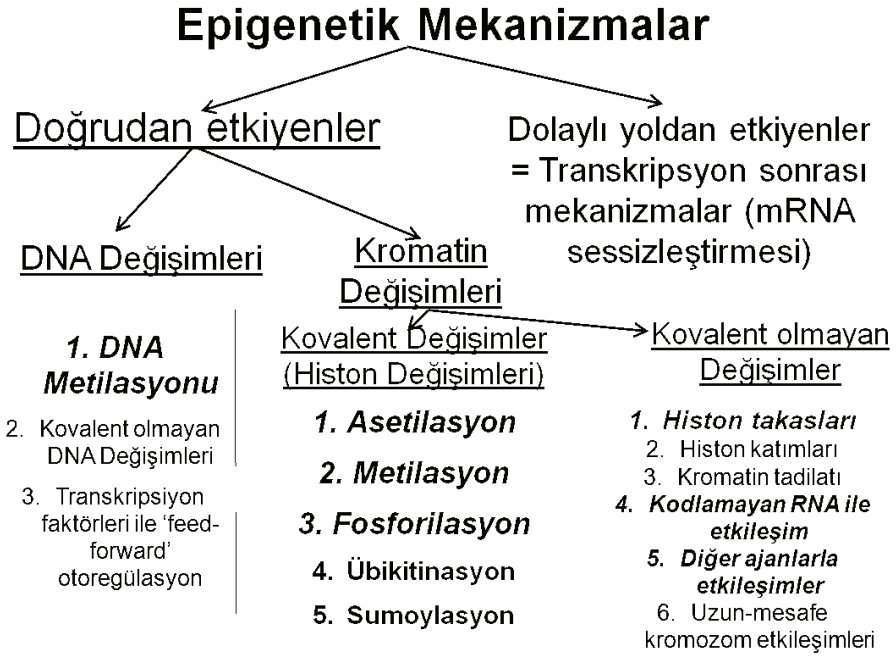
Bitki retrotranspozonlarının (RTN) diğer insersiyon elementlerine göre bazı üstünlükleri vardır; RTN-aracılığı ile insersiyon mutasyonları stabildir, replikatif biçimde varlıklarını sürdürürler, transpozisyon hedefi orijinal kopyadan farklı bir hedeftir, bu yolla rastgele insersiyonların bir koleksiyonu oluşturularak mutagenesis araştırılabilir, transpozisyon kolaylıkla düzenlenebilir, doku kültürü ile aktive edilir ve rejenerasyonla inaktive edilir (Hirochika, 1993; Huang ve diğ., 2009), yüksek düzeyde mutageniktirler, gen bakımından zengin bölgelere girebilirler, orijinal kopya sayısı düşük olabilir,

böylece özgün bir mutasyondan sorumlu kopya bulunabilir, endogen aktif RTN'ler basit ters transkripsiyon – PZR (RT-PZR) yöntemi ile izole edilebilirler (Todorovska, 2007).

2.4.4. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan mitoz veya mayoz yoluyla kalıtılan gen anlatım değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Çağdaş anlamıyla ilk kez Waddington (1942) tarafından kullanılan epigenetik terimi, diğer bazı araştırmacıların deyişiyle genetik kökenli olmayan ve kalıtılan fenotipik varyasyonların incelenmesidir.

Fenotipi neyin belirlediği, bir organizmada farklılaşmış hücrelerin aynı genotipleri içermelerine rağmen nasıl bağımsız gen anlatım profillerine ve hücre fonksiyonlarına sahip olduğu, fenotiplerin mitotik evrelerde nasıl stabil bir şekilde korunduğu, farklılaşmanın nasıl gerçekleştiği, çevrenin gen anlatımına etkisi ve bunun kalıtımı gibi bir çok konu epigenetiğin araştırma alanlarından (Bird, 2007; Goldberg ve diğ., 2007). En önemli epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu ve histon değişimleridir. Bu histon değişimlerinin en önemlileri, histon asetilasyonu ve metilasyonu, histon takasları ve RNAi ile etkileşim olarak sayılabilir. Tüm epigenetik mekanizmalar Şekil 2.8'da verilmektedir (Rakyan ve Beck, 2006; Goldberg ve diğ., 2007; Bond ve Finnegan, 2007). DNA metilasyonu en iyi karakterize kimyasal değişimdir. Memelilerde, neredeyse tüm DNA metilasyonları CpG dinükleotidlerinin sitozin bakiyelerinde meydana gelmektedir. Genomun yüksek yoğunluktaki CpG bölgelerine CpG adacıkları denir ve bu adacıkların DNA metilasyonu, transkripsiyonu baskılama yoluyla gen sessizleştirmesine neden olur.



Şekil 2.8: Epigenetik mekanizmalar (D'Alessio ve Szyf, 2006; Holliday, 2007; Waterland ve Michels, 2007; Kiefer, 2007; Vliet ve diğ., 2007; Henderson ve Jacobsen, 2007)

Histon değişimleri, çoğunlukla histon asetilasyon ve metilasyonlarından oluşmaktadır. En önemli histon modifikasyonlarından biri, H3'ün dokuzuncu pozisyonunda bulunan lizin aminoasidinin metilasyonudur ve kısaca H3K9 metilasyonu olarak gösterilir. Diğer temel histon modifikasyonları; H3K27 metilasyonu, H3K4 metilasyonu, histon asetilasyonu, fosforilasyonu, übikitinasyonu ve sumoylasyonu olarak sayılabilir (Şekil 2.8).

Histon değişimlerinin bir histon kodu oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece, nükleozomun yapısal dinamiğini etkileyerek kromatin fonksiyonunu düzenlemekte ve gen anlatım kalıplarını dikte etmektedir. DNA metilasyonu sadece gen sessizleştirilmesine yol açarken, histon değişimleri hem gen sessizleştirilmesine hem de aktivasyonuna yol açarlar (D'Alessio ve Szyf, 2006; Rakyan ve Beck, 2006; Vliet ve diğ., 2007; Martin ve Zhang, 2007; Nishimura ve Paszkowski, 2007).

Bütün epigenetik mekanizmalar birbirleriyle iş birliği içinde hareket ederler. Epigenetik mekanizmaların düzenlenmesi çoğunlukla iki yönlüdür ve hem mitotik hem de mayotik süreçler sonunda korunmasının ancak bu sayede sağlanabildiği düşünülmektedir. DNA

metilasyonları, gen anlatımının düzenlenmesinde görev alan en önemli epigenetik faktörlerdendir. Kovalent kromatin değişimleri, DNA metilasyon motiflerini düzenler ama aynı zamanda DNA metilasyonları da histon değişimlerini etkilemektedirler. Bunlardan başka RNAi de histon değişimlerini ve başka birçok mekanizmayı etkilemektedir (Rakyan ve Beck, 2006; D'Alessio ve Szyf, 2006; Holliday, 2007; Goldberg ve diğ., 2007; Bond ve Finnegan, 2007; Henderson ve Jacobsen, 2007).

Çok çeşitli ve birbirleriyle ilgisiz gibi görünen onlarca biyolojik olay, aslında epigenetik mekanizmaların etkisinde meydana gelmektedir. Bunların başlıcaları; X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, paramutasyon, floral simetri, farelerde agouti lokusunun aktarılması, 'polycomb' sessizleştirilmesi, konum-etki çeşitliliği, sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster* L.) *Hox* genlerinin modellenmesi, hücre farklılaşması, kanser gelişimi ve nöronal gelişim olarak sayılabilir. Günümüzde epigenetik, hem prokaryot hem ökaryot birçok organizmada gelişimsel, fizyolojik, nörolojik, sitogenetik, kalıtsal, evrimsel, patolojik ve tıbbi alanlarda araştırılmaktadır (Bird, 2007; Vliet ve diğ., 2007; Martin ve Zhang, 2007; Kiefer, 2007).

2.4.5. Epigenetik ve Transpozonlar

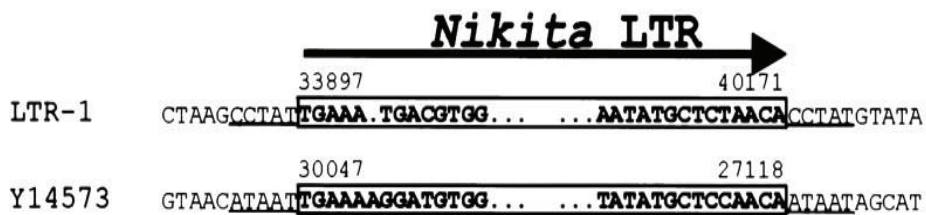
Transpozonlar, her ne kadar klasik epigenetik mekanizmalardan biri olarak görülmeseler de, yaptıkları transpozisyonların çok önemli epigenetik etkileri bulunmaktadır. 1950 yılında McClintock, transpozonların çok önemli epigenetik fonksiyonları olduğunu belirtmiştir. Promotör bölgelere ya da genlere yakın bölgelere insersiyon yaparak gen sessizleştirmesine yol açan transpozonlar bol miktarda metil grupları içermektedirler. Günümüzde, transpozonların, tüm genomda metilasyon açısından en yoğun bölgeler olduğu bilinmektedir. Transpozonlar, X kromozomu inaktivasyonundan, imprintinge kadar birçok epigenetik olayda önemli rollere sahiptirler. Transpozonların neden olduğu yaygın epigenetik gen düzenlenmesinin yanı sıra, transpozonların kendileri de epigenetik mekanizmalar tarafından sessizleştirilmekte veya aktifleştirilmektedir. İnaktif transpozon ve moleküler fosil kavramları bu sayede ortaya çıkmaktadır. Transpozonların büyük bir çoğunluğu inaktiftir ve bu inaktivite epigenetik nedenlerle gerçekleşebileceği gibi evrim sırasında element içi delesyon nedeniyle de gerçekleşmiş olabilir. Epigenetik olarak aktivitesini ve hareket edebilme yeteneğini kaybetmiş transpozonlara 'örtülü element' adı verilmektedir. Örtülü

elementler ve otonom olmayan transpozonlar, sentromer ve telomer gibi genomun heterokromatik bölgelerini oluşturmaktadırlar (Banks ve diğ., 1988; Slotkin ve Martienssen, 2007; Weil ve Martienssen, 2008).

Epigenetik mekanizmalar, bazı koşullar altında sessiz transpozonları aktive ederler. Bunun en güzel örneği gelişim sürecinde sessiz olup, hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarında etkin hale geçen bitki retrotranspozonlarıdır. Epigenetik olarak aktive edilen bu LTR'li retrotranspozonlar, buldukları yerdeki komşu genlerin de gen anlatımını epigenetik yollarla etkilediklerinden, LTR'li retrotranspozonların bitki gelişim ve evriminde önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Mansour, 2007). Epigenetik düzenleme, transpozonların olası zararlı etkilerini durdurucu bir mekanizma olarak işler. Transpozonları baskılayan susturucu mekanizmaların başlıcaları; RNAi ile post-transkripsiyonel sessizleştirme, histon kuyruk değişimleri, DNA metilasyonu ve kromatin paketlenme ve yoğunlaşmasındaki değişimlerdir. Bu baskılayıcı mekanizmalar sayesinde transpozonların yüksek mutatif özellikleri engellenmektedir (Banks ve diğ., 1988; Slotkin ve Martienssen, 2007; Weil ve Martienssen, 2008).

2.5. *NIKITA* RETROTRANSPOZONU

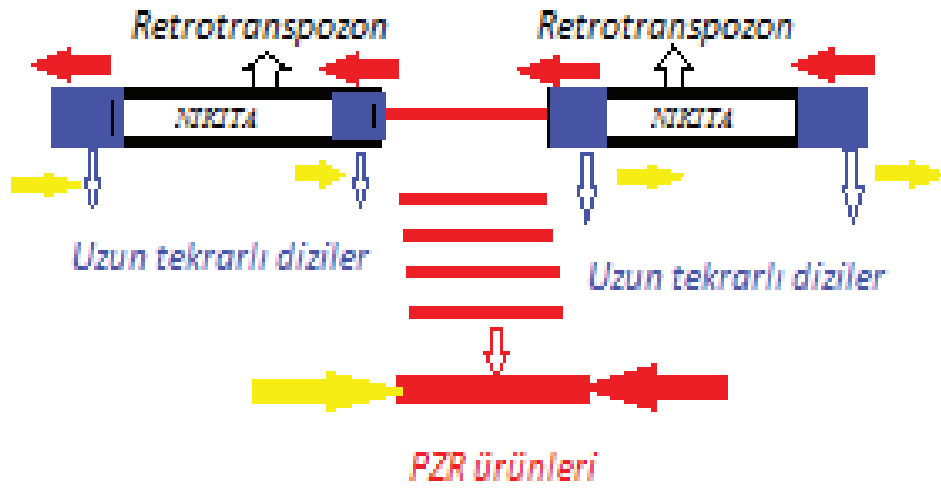
Nikita arpada 33.897 ve 40.171 nt pozisyonu arasında yerleşmiş olan solo LTR elementidir (Şekil 2.9). *Nikita* dizisi Mlo lokusundaki 3 kb uzunluğundaki bir diziyile (30.047 ve 27.118 arasındaki nt pozisyonu) yüksek derecede ilişkidir. Rar1 lokusundaki *Nikita* iki tane BARE-1 LTR'si (LTR-3 ve LTR-4) tarafından bölünmüştür. *Nikita*'nın terminal LTR dizisi kutu içine alınmıştır ve komşu olan 5 baz çiftinin altı çizilerek belirtilmiştir. Genbank aksesyon numarası sol tarafta belirtilmiştir. DNA dizilerinin üzerindeki numaralar ise nt pozisyonlarını belirtmektedir (Shirasu ve diğ., 2000).



Şekil 2.9: *Nikita* LTR dizisi (Shirasu ve diğ., 2000).

2.6. IRAP ‘INTER-RETROTRANSPOZON AMPLIFIED POLYMORPHISM’

Retrotranspozonların entegrasyonları genomik DNA ve korunmuş uçları arasında yeni ek yerleri yarattığından, markır olarak kullanılabilir. Polimorfizmleri retrotranspozon insersiyonu ile belirlemekte kullanılan markır sistemleri; genelde bu uçlar arasındaki ve bitişik DNA bölgelerinin bazı bileşenlerinin polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla çoğaltılması esasına dayanır. Kalendar ve Schulman (2006) bu amaca yönelik; REMAP ve IRAP olmak üzere iki yöntem geliştirmişlerdir (Schulman ve diğ., 2004).



Şekil 2.10: IRAP markır çalışma prensibi

IRAP, retrotranspozonlar arasındaki polimorfik bölgelerin çoğaltılmasıdır (Şekil 2.10). Bu yöntem markır bantları oluşturmak için ne restriksiyon enzim kesimine ne de ligasyona ihtiyaç duymaktadır. IRAP ürünleri dışarı bakan primerler kullanılarak yanyana iki retrotranspozondan elde edilirler. PZR’de kullanılan, primerler retrotranspozonun LTR dizilerinin uç kısımlarına göre dizayn edilir. İleri primerler retrotranspozonun 3’ LTR dizisine göre dizayn edilirken geri primerler 5’ dizisine göre dizayn edilir. Retrotranspozonların LTR dizileri çoğu zaman %90-95 oranında benzerlik gösterdikleri için tek bir primer PZR’de hem ileri hem de geri olarak da kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında da transpozon hareketleri arpa doku kültürlerinde kallus gelişiminin değişik evrelerinde *Nikita* retrotranspozonu için geliştirilmiş IRAP moleküler markırları kullanılarak araştırıldı ve sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardaki bulgularla karşılaştırılarak değerlendirildi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada bitki materyeli olarak arpa (*Hordeum vulgare* L. Zafer-160 cv.) olgun embriyoları ve olgun embriyolardan gelişen 30 günlük, 60 günlük ve 90 günlük kalluslar kullanıldı. Tohumlar, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden sağlandı.

3.1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

3.1.1. Besiyeri Yapımı

Arpa olgun embriyolarından kallus gelişimi için 3 mg/l (13.59 μ M) 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic) içeren Murashige ve Skoog (MS) (1962), besiyerleri kullanıldı. Bir litre MS besiyeri için; 4.3 g MS besiyeri tuz karışımı 'MS basal salt mixture' (M5524, Sigma) ve 30 g sükröz 800 ml distile suda çözülüp, pH'sı 1N NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Son hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanan besiyerine 9 g agar (Agar, A7002, Sigma) eklenip, otoklavda (OT 012, Nüve) 121°C, 1.2 atm koşullarında, 15 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen besiyerinin sıcaklığı 50 – 55°C'ye geldiğinde içerisine 1 ml, 1000X MS vitamin karışımı (M3900, Sigma) ve 3 ml, 1 mg/ml stok 2,4-D çözeltisi eklenip, besiyeri her bir petri kabında 25 ml olacak şekilde kaplara döküldü. Stok 2,4-D çözeltisi hazırlamak için, 10 mg 2,4-D (D7299, Sigma) 1 ml saf etanolde çözüldükten sonra, distile suyla 10 ml'ye tamamlandı ve 0.2 μ m por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi.

3.1.2. Kallus Kültürlerinin Kurulması

Doku kültürü çalışmaları sırasında yapılan tüm işlemler, hava akımlı steril kabinde (Gelaire Flow Laboratories TC 48) gerçekleştirildi. Arpa tohumları, yüzey sterilizasyonu için, % 20'lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika bekletilip, üç kere distile su ile yıkandı. Ardından tohumların testaları soyuldu ve steril bistüri kullanılarak embriyolar endosperm dokusundan kesilerek ayrıldı. Arpa embriyoları saf etanol içerisinde 30 saniye bekletildi. Etanolün uzaklaştırılması için embriyolar distile su ile 3 defa durulandı. Her embriyo tek tek steril kurutma kağıdında kurutuldu ve kallus oluşumu için 3 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerine ekildi. Ekilen embriyoların her biri bir harf ile isimlendirildi. Petriler, kallus oluşumu için alüminyum folyo ile kapatılarak, sıcaklığı 25°C olan bitki büyütme kabininde inkübe edildi.

DNA izolasyonunda kullanılacak örneklerin eldesi için, 30 gün sonunda her bir kallus iki parçaya ayrıldı. Parçalardan biri genomik DNA (gDNA) izolasyonu için kullanıldı. Diğer parça ise MS besiyerine (3 mg/l 2,4-D) alt kültüre alınarak kallus gelişimi devam ettirildi. Bu örnekleme işlemleri 60. ve 90. günde de aynı şekilde uygulandı. Örnekleme işlemleri sırasında kallusların etiketlenmesine dikkat edildi. Her örneklemede elde edilen 30, 60 ve 90 günlük kalluslar aynı embriyodan gelişen kalluslardı. Tüm örnekleme işlemleri tamamlandıktan sonra DNA izolasyonuna geçildi.

3.2. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Arpa kallus kültüründe yaşa bağlı meydana gelebilecek olan retrotranspozon hareketlerini belirlemek için 'Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism' (IRAP) moleküler markır tekniğinden yararlanıldı. Bitkiler arasında doğal olarak meydana gelmiş olabilecek polimorfizmin belirlenmesi ve sonuçların güvenilirliğini saptamak için çalışmalar 3 farklı birey üzerinde yürütüldü. Çalışmada kontrol amacı ile kültüre alınmamış olgun embriyolar kullanıldı. İzolasyon için kullanılan örnekler sırası ile E1, E2, E3, A30, B30, C30, A60, B60 ve C60, A90, B90 ve C90 olarak isimlendirildi.

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün tampon ve stok çözeltilerin içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. İzolasyonda kullanılacak tüm cam ve plastik malzemeler nükleaz aktivitesini engellemek için distile su ile durulandı. Ardından otoklavda 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile steril edilen malzemeler kurutulduktan sonra genomik DNA izolasyonu için kullanıldı.

Bitki materyelleri steril porselen havan ve havaneli ile sıvı azot içerisinde parçalandı. Toz haline getirilen 100mg dokulardan her örnek için alınıp porselen havanda yaklaşık 3 dakika boyunca ezerek iyice öğütülmesi sağlanmıştır. Toz haline gelen örnekler 1.5 ml'lik mikrofij tüplerine alındı ve üzerine 350 µl 2X CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) tamponu eklendi (Tablo 3.1). Ardından tüplere 350 µl LiCl eklendi ve tüpler bir kaç defa altüst edildikten sonra 65°C'lik su banyosunda 1 saat kadar inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 700 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve birkaç defa altüst edilerek karıştırıldı.

Örnekler 13500 rpm’de 1 dak. santrifüj edildi ve üst sıvı temiz bir tüpe alındı. Yeni tüplere örnekle eşit miktarda (~500 µl) kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve tekrar 13500 rpm’de 1 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı tekrar yeni bir tüpe alındı ve üzerine 1/10 hacim (~50 µl) 3M sodyum asetat ve 2 hacim (~1 ml) saf etanol (soğuk) eklendi. Örnekler -20°C’de 2 gün süre ile inkübe edildi. Süre sonunda tüpler 13500 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve çökelen pellet %70’lik etanol ile iki defa yıkandı. Yıkama işleminin ardından pelletler oda ısısında 1saat kadar kurumaya bırakıldı. Ardından izole edilen DNA’lar 50 µl steril su içinde çözdürüldü. İzole edilen DNA’ların kalitesi % 1’lik agaroz jelde kontrol edildi. İzole edilen DNAların spektrofotometre kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. 260 nm dalga boyundaki absorbans değeri DNA miktar tayininde 260/280 oranı ise DNA saflığının tayininde kullanıldı. DNA miktarı ‘DNA miktarı (µg/ml)= OD₂₆₀ x Seyreltme faktörü x 50 (µg/ml)’ formülünden yararlanılarak hesaplandı.

Tablo 3.1: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve stok çözeltiler

Çözeltilinin Adı	İçeriği
Ekstraksiyon Tamponu	100 mM Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane, 154563, Sigma), 25 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, E5134, Sigma), pH 8.0, 1.4 M NaCl (Sodium chloride, S3014, Sigma), %2 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide, H9151, Sigma)
Kloroform:İzoamil alkol	24 Hacim Kloroform (Chloroform, C7559, Sigma): 1 Hacim İzoamilalkol (Isoamylalcohol, W205702, Sigma)
CTAB/NaCl	%10 CTAB, 0.7 M NaCl
EtOH/NH ₄ Ac	%76 EtOH, 10 mM NH ₄ Ac (101115, Merck)
%70 EtOH	7 Hacim Etanol, 3 Hacim distile su

3.2.2. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Agaroz jel elektrofrezisinde kullanılan tampon ve boyaların içerikleri Tablo 3.2’de verilmiştir. % 1’lik agaroz jel hazırlamak için, 10X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 40 ml 1X TAE tamponuna, 0,4 gram agaroz (Biobasic Agarose A) eklenip mikrodalga fırında eritildi. Ilınan agaroz jele 4µl etidyum bromür eklendi ve yatay elektrofrez kasetine dökülüp, uygun tarak yerleştirildikten sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşmaya bırakıldı. Her DNA örneğinden 1µl alınıp, 4µl steril distile su ve 1µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Markır olarak

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (SM0312, Fermentas) kullanıldı (Şekil 3.1). Agaroz jel 80V'da 2 saat yürütüldü ve UV tablasında görüntülendi ve fotoğrafı çekildi.

Tablo 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Çözeltinin Adı	İçeriği
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	400 mM Tris, % 1,2 glasiyel asetik asit, 10 mM EDTA
Etidyum bromür	10 mg/ml etidyum bromür, distile su içinde
6X yükleme tamponu	10 mM Tris, 60 mM EDTA (pH 8,0), % 0.3 bromofenol mavisi, % 60 gliserol



Şekil 3.1: Agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan markır; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (SM0312, Fermentas)

3.2.3. IRAP Analizleri

Nikita retrotranspozonunun hareketinin IRAP markır tekniği kullanılarak belirlenmesi için PZR'de hem ileri hem geri olarak bağlanabilen tek bir primer kullanıldı. Bununla birlikte reaksiyon farklı bir primer ile tekrarlanarak iki reaksiyon arasındaki sonuçlar karşılaştırıldı. PZR'de kullanılan primerlerin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları (T_a) Tablo 3.3'de verilmiştir (Rodriguez ve diğ., 2006; Branco ve diğ., 2007; Bento ve diğ., 2010).

Tablo 3.3: IRAP PZR için kullanılan primerlerin dizileri ve T_a sıcaklıkları

Adı ve Yönü	Dizisi (5' → 3')	T_a (°C)
<i>Nikita</i> -57Forward →	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	52
<i>Nikita</i> -E2647Forward →	ACCCCTCTAGGCGACATCC	53

PZR’de kalıp olarak 3’er adet embriyo, 30, 60 ve 90 günlük kalluslar olmak üzere 12 adet örnek üzerinden çalışmalar yürütüldü. Örneklerden izole edilen gDNA’lar steril distile su ile sulandırılarak konsantrasyonları 10 ng’a ayarlanarak kullanıldı. PZR 200 µl’lik tüplerde gerçekleştirildi. PZR bileşenleri Tablo 3.4’de verilen oranlarda tüplere ilave edildi ve tüpler Tablo 3.5’de verilen koşullara ayarlı PZR cihazına yerleştirildi. Reaksiyon bitiminde PZR ürünleri poliakrilamid jelde ayrılarak incelendi.

Tablo 3.4: IRAP-PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril distile su	9,9	-
10 X PZR tampon	2	1X
25 mM MgCl ₂	2	2,5 mM
10 mM dNTP	2	1 mM
10 µM primer	1,6	0,8 µM
10 ng/µl Kalıp DNA	2	20 ng
5U/µl Taq polimeraz (D0081, BioBasic)	0,5	2,5 U (0,125 U/µl)
Toplam	20	-

Tablo 3.5: IRAP-PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dak	1
Denatürasyon	94°C	30 san	
Bağlanma	Değişken	30 san	30
Uzama	72°C	3 dak	
Son uzama	72°C	7 dak	1

3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektrofrez ‘PAGE’

Akrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanan poliakrilamid jellerin elektrofretik ayırımalarında çeşitli üstünlükleri vardır. Küçük ya da orta boydaki nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir. Hareket eden moleküllerle destek materyali arasındaki etkileşim minimum düzeydedir. Destek materyali fiziksel olarak oldukça karardır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektrofrez örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmasına olanak verir çünkü ayırım hem moleküler elekleme hemde elektrofretik harekete dayanır. Poliakrikamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N’metilen-bis akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlandı. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör (amonyum persülfat-TEMED) sistemi tarafından

kontrol edildi. Fotokimyasal polimerizasyon, UV ışığı altında riboflavin tarafından gerçekleştirildi. Bir jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. Bu iki maddenin polimerizasyonu ile jelde porlar oluşturuldu. Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise küçük porlar oluşur ve düşük molekül ağırlıklı moleküllerin analizi yapılır.

PZR bitiminde ürünler, 22x20 cm boyutlarındaki %6'lık poliakrilamid jelde (Tablo 3.6) 160 voltta 6 saat yürütülerek ayrıldı. Jel etidyum bromür içeren 1X TBE tamponu içinde 15 dakika süre ile boyandıktan sonra, UV tablasında görüntülendi.

Poliakrilamid jel elektroforezi düzlemsel biçimde hazırlanmış jellerde gerçekleştirildi. Poliakrilamid jel birbirinden belli uzaklıkta tutulan iki cam tabaka arasında hazırlandı. Polimerizasyon sırasında jelin üst kısmına yerleştirilen plastik bir tarak ile jelde küçük kuyucukların oluşumu sağlandı. Polimerizasyondan sonra tarak çıkarıldı, kuyucuklar tuzları ve polimerize olmamış akrilamidi yok etmek üzere tamponla yıkandı. Jel kaseti tampon içerisine yerleştirildi, kuyucuklara örnekler konuldu ve akım geçirildi.

Tablo 3.6: PAGE bileşenleri ve konsantrasyonları

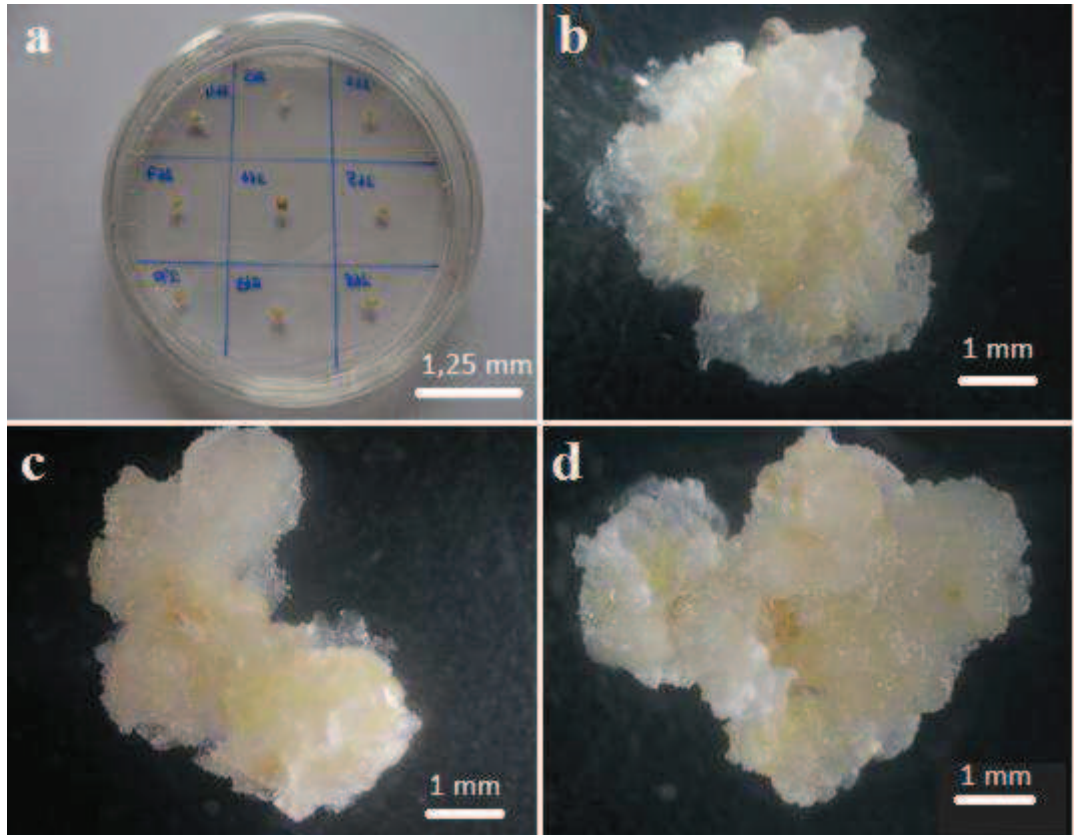
Adı	Miktar
Distile su	29,48 ml
% 30 Akrilamid:bisakrilamid 29:1; 0,45 µ filtre sterilizasyonu	10 ml
5X TBE (500 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8,0,)	10 ml
% 10 Amonyum persülfat	500 µl
TEMED	20 µl
Toplam	50 ml

4. BULGULAR

Bu çalışmada *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160 varyetesinin olgun embriolarından elde edilen kalluslarda, yaşa bağlı olarak doku kültürü koşullarının sebep olduğu *Nikita* retrotranspozon polimorfizmi IRAP yöntemi kullanılarak araştırıldı.

4.1. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

Hordeum vulgare L. tohumlarının yüzey sterilizasyonu sonrası steril koşullarda çıkarılan olgun embriyoları MS besiyerine ekilerek 30, 60 ve 90 günlük süreler sonucu aktif bölünen kallus kültürleri elde edildi (Şekil 4.1). Elde edilen kallusların sarımsı beyaz ve pamuksu yapıda olduğu (II. tip kallus) ve bu sonuçlara göre kallus kültürlerinin DNA izolasyonu için uygun olduğu görüldü.



Şekil 4.1: Olgun arpa embriolarından elde edilen kalluslar. a; ekimi yapılmış embriyolar, b; 30 günlük kallus, c; 60 günlük kallus, d; 90 günlük kallus (Bar; 1mm).

4.2. GENOMİK DNA ANALİZLERİ

PZR'de kalıp olarak kullanılan genomik DNA'lar Rogers ve Bendich (1985)'in önerdikleri CTAB yöntemi kullanılarak izole edildi. Ardından DNA'ların kalitesi % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi (Şekil 4.2). Elektroforez sonucuna göre izole edilen DNA'ların PZR'de kullanılabilecek kalitede olduğu görüldü. Bununla birlikte DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları dereceleri spektrofotometre ile belirlendi (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlara göre DNA'ların konsantrasyonlarının birbirlerinden çok farklı olduğu buna karşın saflık derecelerinin iyi olduğu görüldü. Bütün DNA'ların konsantrasyonları eşitlenmek amacı ile 100 µl çözültide 10 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 4.1: Örneklere ait genomik DNA konsantrasyonları

Örnek	DNA Konsantrasyonu
Emb.1	238,1
Emb.2	334,4
Emb.3	292
A30	305,6
B30	29,1
C30	970,8
A60	136,9
B60	37,6
C60	498,5
A90	26,8
B90	106,5
C90	26,5

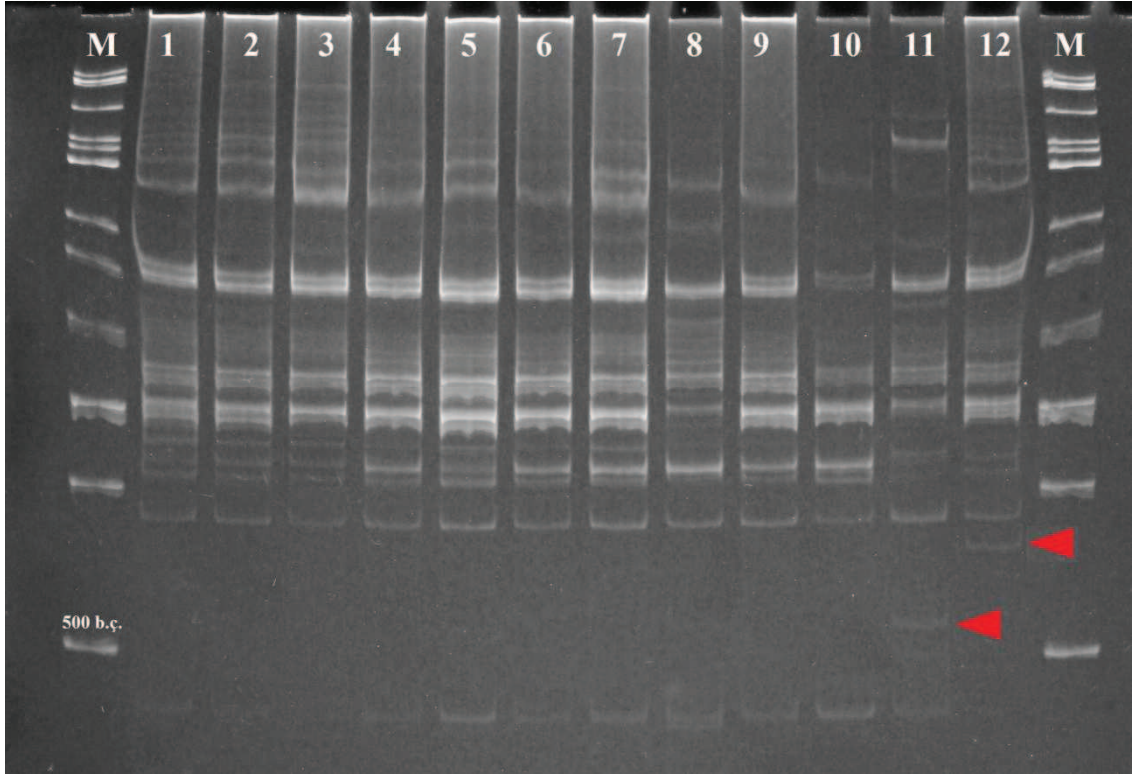


Şekil 4.2: Embriyo ve kalluslardan izole edilen genomik DNA'lar; 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır. Not: her kuyucuğa 1µl DNA örneği yüklenmiştir

4.3. IRAP ANALİZLERİ

Çalışmada IRAP-PZR analizleri için iki farklı primer (N57 ve N2647) kullanılarak iki reaksiyon kuruldu. Reaksiyonların her birinde bu primerlerden sadece biri hem ileri hem de geri primer olarak kullanıldı. Analizlerde kontrol amaçlı olarak olgun arpa embriyolarından izole edilen DNA'lar kullanıldı. Bitkiler arasında *Nikita* retrotranspozon hareketleri bakımından meydana gelmiş olabilecek doğal bir polimorfizmin olup olmadığının belirlenmesi için analizler 3 birey üzerinden yürütüldü.

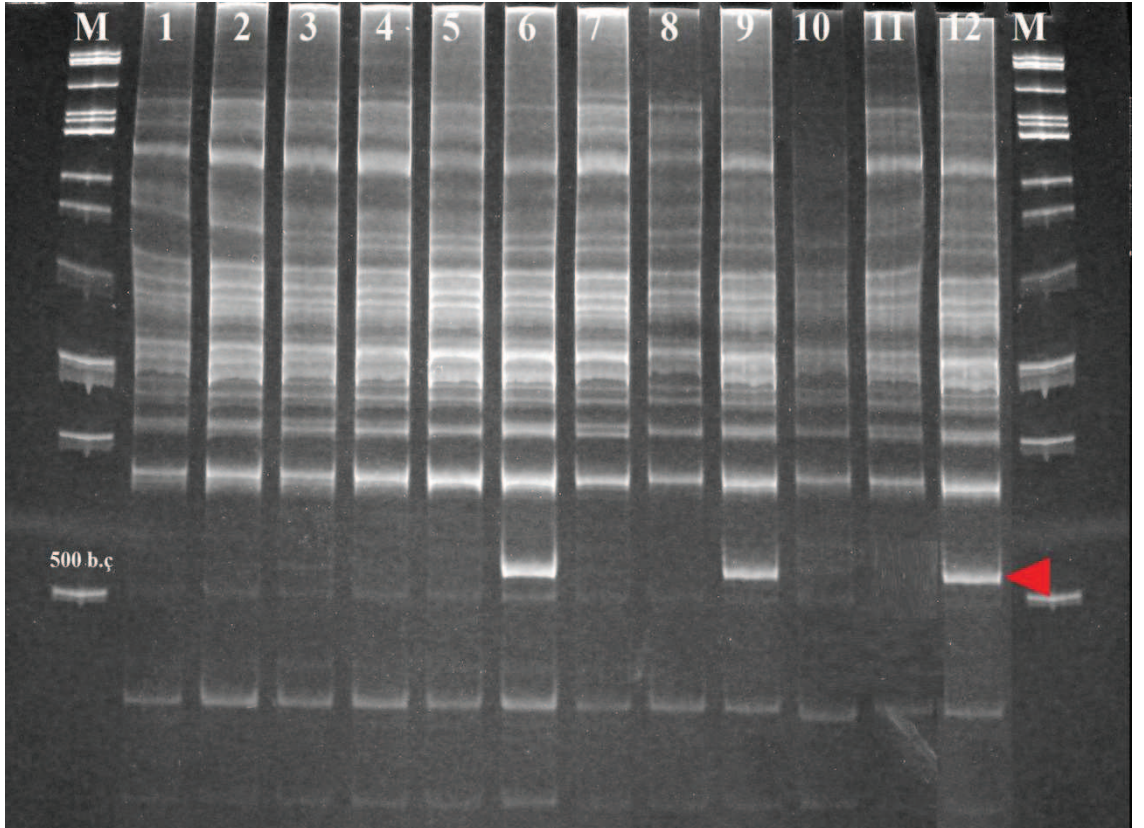
PZR ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde ayrılarak değerlendirildi. N57 primeri ile yapılan PZR sonuçlarına göre kontrol amaçlı kullanılan embriyolar arasında polimorfizme rastlanmadı (Şekil 4.3 kuyucuk; 1, 2, ve 3). Elde edilen bu sonuca göre bitkiler arasında doğal olarak meydana gelmiş bir polimorfizm olmadığı kabul edildi.



Şekil 4.3: N57 primeri ile yapılan PZR sonuçları. 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır

30 ve 60 günlük kalluslardan izole edilen DNA'lar ile yapılan PZR sonuçlarında ise elde edilen bantların embriyonik DNA'lardan elde edilen bantlar ile homomorfik olduğu görüldü (Şekil 4.3 kuyucuk; 4, 5, 6, 7, 8 ve 9). Aynı şekilde 90 günlük A90 örneğinden elde edilen bantlar da embriyo, 30 ve 60 günlük örneklerden elde edilen bantlar ile homomorfik olduğu bulundu. Buna karşın 90 günlük B90 (~550 b.ç.) ve C90 (~700 b.ç.) örneklerinde birbirinden farklı polimorfik bantlar görüldü (Şekil 4.3 kuyucuk; 11 ve 12).

N2647 primeri ile yapılan PZR sonuçlarına göre, embriyonik DNA'lar arasında doğal bir polimorfizm olmadığı belirlendi (Şekil 4.4 kuyucuk; 1, 2 ve 3). Elde edilen bu sonuç N57 primeri ile yapılan PZR sonucu ile tutarlıdır. Bununla birlikte 30 günlük kallus örnekleri, A30 ve B30, sonuçlarının da embriyonik DNA'lardan elde edilen sonuçlar ile aynı olduğu görüldü (Şekil 4.4 kuyucuk; 4 ve 5). Buna karşın C30 nolu 30 günlük kallus örneğinde yaklaşık 520 b.ç. büyüklüğünde bir polimorfik bant görüldü (Şekil 4.4 kuyucuk; 6).



Şekil 4.4: N2647 primeri ile yapılan PZR sonuçları. 1, 2, 3; Embriyo (E1, E2, E3), 4, 5, 6; 30 günlük kalluslar (A30, B30 ve C30), 7, 8, 9; 60 günlük kalluslar (A60, B60 ve C60), 10, 11, 12; 90 günlük kalluslar (A90, B90 ve C90) M; markır

60 ve 90 günlük uygulamalardan elde edilen PZR sonuçlarında da A60, B60 ve A90, B90 örneklerinde her hangi bir polimorfizme rastlanmazken, C60 ve C90 örneklerinde C30 örneğinde görülen polimorfik bant tespit edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında değişik kültür sürelerindeki arpa kalluslarında, retrotranspozon hareketleri IRAP markır tekniği kullanılarak incelendi. Bunun için daha önce arpada en aktif 4. retrotranspozon olduğu belirtilen *Nikita* üzerinde çalışmalar yürütüldü (Kalendar ve diğ., 1999). Örnekleme yapılacak olan kültür süresi olarak 30, 60 ve 90. günler belirlendi ve kontrol amaçlı olarak kültüre alınmamış arpa olgun embriyoları kullanıldı. Bitkiler arasında doğal bir polimorfizmin olup olmadığının belirlenmesi amacı ile çalışmalar 3 farklı birey üzerinden yürütüldü.

Çalışmada, PZR'de kullanılan 2 farklı (N-2645, N-57) primer ile kontrol olarak kullanılan 3 olgun embriyo (E1, E2, E3), 30 günlük (A30, B30 ve C30), 60 (A60, B60 ve C60) günlük ve 90 günlük (A90, B90 ve C90) evrelerdeki 3 farklı kallus örneği arasındaki benzerlikler analiz edildi.

Kültüre alınmamış embriyolardan elde edilen genomik DNA'lar ile yapılan IRAP-PZR sonuçlarına göre elde edilen bantların hepsinin homomorfik olduğu görüldü. Elde edilen bu sonuca göre, bitkiler arasında doğal olarak meydana gelmiş bir *Nikita* retrotranspozon hareketliliği polimorfizmi olmadığı belirlendi. Bu sebeple kültüre alınmış olan kalluslar arasında meydana gelebilecek bir polimorfizmin doku kültürü koşullarından ileri geldiği kabul edildi.

Çalışmada iki farklı primer (N57 ve N2647) ile PZR yapıldı. Olgun embriyo özgün bantları ve farklı yaşlardaki kalluslarda gözlenen bantların büyük oranda homomorfik olması genomun büyük kısmının incelenen transpozon yönünden oldukça stabil olduğunu göstermektedir. Evrensel ve diğ., tarafından 2011 yılında yapılan benzer bir çalışmada, farklı yaşlardaki (30, 45 ve 60 günlük) arpa kallus kültürlerinde yaşa bağlı meydana gelen *BARE-1* retrotranspozonunun hareketleri IRAP markır tekniği ile incelenmiştir. *BARE-1* arpada karakterize edilmiş olan en aktif retrotranspozondur (Kalendar ve diğ., 1999). Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *BARE-1*'in kallus

kültürünün yaşına bağlı olarak embriyoya oranla %14-25 oranında yüksek bir polimorfizm gözlenmiştir. Polimorfizm oranının yüksek olması *BARE-1*'in arpada tamınlanmış en aktif retrotranspozon olmasından ileri gelmekte olabilir.

Çalışmada elde edilen bantların büyük oranda homomorfik olmasına karşın farklı yaşlardaki kalluslarda az miktarda değişik polimorfik bantlar gözlemlendi. N57 primeri ile yapılan reaksiyonda polimorfik bantlara kültürün 90. gününde rastlanırken, N2647 primeri ile yapılan reaksiyonda 30. günden itibaren polimorfizm görüldü. Bununla birlikte polimorfik bantlar farklı embriyolardan gelişen aynı yaştaki kalluslarda farklı olarak gözlemlendi. Bireyler arasında bir polimorfizm olmadığı daha önceki kültüre alınmamış embriyolarla yapılan çalışmalarda gösterildiği için aynı yaştaki kalluslar arasındaki polimorfizmin farklı olması, doku kültürü koşullarının her birey üzerinde aynı etkiyi göstermediğini kanıtlamıştır.

Doku kültürü koşullarının arpada somaklonal varyasyonlara sebep olduğu daha önce sitogenetik ve moleküler markırlarla gösterilmiştir. Gözükırmızı ve diğ. (1990), kromozom sayısı ve yapı anomalilerinin kallus yaşı ile arttığını ve bir yıllık kalluslarda, bu değişimlerin % 80 oranlarına çıktığını sitolojik preparatlarda sayım yolu ile göstermişlerdir. Araştırmacılar anormallik oranı artışı ile rejenerasyon yeteneğinde de azalmalar olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte Temel ve diğ. (2008), kalluslarda tüm genom düzeyindeki değişimleri RAPD ve CRED-RA yöntemleri ile hem genetik hem de epigenetik temelli olarak araştırmışlardır. Çalışmada genetik değişimlerin yanı sıra epigenetik değişimlerin de kallusta varyasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Retrotranspozon temelli IRAP bantlarının değişimlerinin bir nedeni de kromozom sayısı değişimleri olabilir. Bazı durumlarda çok koyu görünen polimorfik bantlar poliploidi ile de ilgili olabilir.

Literatürde retrotranspozonlar ile yapılan çalışmalar genellikle evrimsel süreçte türlerin oluşumunda retrotranspozonların rollerini anlamaya yöneliktir. Doku kültürü koşullarının sebep olduğu mutasyonlar ve somaklonal varyasyonlar ile retrotranspozonların ilişkilerini inceleyen çalışmalar oldukça azdır. Bu bakımdan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doku kültüründe meydana gelen mutasyonların sadece metilasyon, kromozom sayısı değişimleri gibi faktörlere bağlı olmadığını, aynı

zamanda retrotranspozonların da kallusun yaşına bağlı olarak somaklonal varyasyonlara sebep olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu kültürlerden rejenere olan bitkilerin de genetik açıdan farklılıklar taşması muhtemeldir. Bu sebeple ileriki çalışmalarda, retrotranspozon hareketleri bakımından polimorfizm gösteren kalluslardan rejenere olan bitkilerde de benzer çalışmalar yapılması gerekmektedir. Ayrıca polimorfik bantların dizi analizlerinin belirlenmesi ile transpozon hareketlerinin genomun hangi bölgelerinde yoğunlaştığı belirlenebilir ve bu yolla gen anlatımlarındaki değişimler araştırılabilir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ileriki çalışmalar için bir kaynak olacak ve literatür bilgilerine katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

AKULA, C., AKULA, A. and HENRY, R., 1999, Improved Regeneration Efficiency from Mature Embryos of Barley Cultivars, *Biologia Plantarum*, 42, 505-513.

ALBAYRAK, G., GÖZÜKIRMIZI, N., 1999, RAPD Analysis of Genetic Variations in Barley, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 627-630.

ALTINKUT, A., KAZAN, K., İPEKÇİ, Z., GÖZÜKIRMIZI, N., 2001, Tolerance to Paraquat is Correlated with the Traits Associated with Water Stress Tolerance in Segregating F₂ Population of Barley and Wheat, *Euphytica*, 121 (1), 81-86.

ANONİM, 2009, *FAOSTAT* [online], Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [Ziyaret Tarihi: 7 Kasım 2010].

ANONİM, 2009, *Barley Intro* [online], Gramene, http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_intro.html [Ziyaret Tarihi: 4 Kasım 2010].

ANONİM, 2008, *IndiaPRwire* [online], Barley Genome Sequencing expected to complete by 2012, <http://www.indiaprwire.com/pressrelease/agriculture/200804098649.htm> [Ziyaret Tarihi: 19 Aralık 2010].

ANONİM, 2004, *Plant Tissue Culture* [online], Wikipedia The Free Encyclopedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_tissue_culture [Ziyaret Tarihi: 18 Mart 2011].

ANONİM, 2003, *Plant Tissue Culture* [online], Oxford University Online Resource Sources, <http://www.oup.com/uk/orc/bin/0199254680/ch02.pdf> [Ziyaret Tarihi: 14 Nisan 2011].

ANONİM, 2008, *SequenceS* [online], Genomlardaki Hareketli (Mobile) DNA'lar, <http://genotyping.wordpress.com/?s=hareketli+dna> [Ziyaret Tarihi: 14 Ocak 2011].

ANONİM, 2006, Transposon-Mediated Functional Genomics in Barley, *This site supports the efforts from the NSF-funded project 0110512*, <http://wheat.pw.usda.gov/BarleyTNP/> [Ziyaret Tarihi: 08 Ocak 2010].

ANONİM, 2009, *International Barley Sequencing Consortium* [online], International Barley Sequencing Consortium, <http://www.public.iastate.edu/~imagefpc/IBSC%20Webpage/IBSC%20Template-home.html> [Ziyaret Tarihi: 22 Mart 2011].

ANONİM, 2009, *PLANTS Profile* [online], United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Plants Database, <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=HOVU> [Ziyaret Tarihi: 22 Nisan 2011].

ANONİM, 2007, *Nay Fah Sai Science Project* [online], Molecular Genetic House Plant Tissue Culture, <http://nayfahsaiscienceproject.blogspot.com/2007/07/planttissue-culture.html> [Ziyaret Tarihi: 18 Ocak 2010].

ANONİM, 2007, *GENBİLİM Türkiye Bilim Sitesi* [online], Hareketli Genler, http://www.genbilim.com/index.php?option=com_content&task=view&id=1958 [Ziyaret Tarihi:14 Nisan 2011].

ARI, Ş., BİLGİN, G., ÇOBANOĞLU, G., GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 1995, Determination of Barley Hybrids with Molecular Markers, *Cereal Research Communications*, 23 (3), 229-234.

ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI, N., 2008, Effects of Hyperbaric Oxygenation on Cultured Barley Embryos, *Acta Biologica Hungarica*, 59 (4).

BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., 2002, *Bitki Biyoteknolojisi I – Dokü Kültürü ve Uygulamaları*, 2. Baskı, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 975-6652-047.

BADR, A., MÜLLER, K., PREGL, R.S., RABEY, H.E., EFFGEN, S., İBRAHİM, H., POZZI, C., ROHDE, W. and SALAMİNİ F., 2000, "On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare* L.)". *Molecular Biology and Evolution* 17 (4): 499-510.

BAIK, B.K., ULRICH, S.E., 2008, Barley for Food: Characteristics, Improvement, and Renewed Interest, *Journal of Cereal Science*, 48, 233–242.

BANKS, J.A., MASSON, P., FEDEROFF, N., 1988, Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize *Suppressor* transposable element, *Genes and Development*, 2: 1364-1380

BAYLISS, M.W. and DUNN, S.D.M., 1979, Factors Affecting Callus Formation from Embryos of Barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Science Letters*, 14 (4), 311-316.

BEDNAREK, P.T., ORŁOWSKA, R., KOEBNER, R.M.D., ZIMNY, J., 2007, Quantification of the Tissue-Culture Induced Variation in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *BMC Plant Biology*, 7, 10.

BENNETZEN, J., 2000, Transposable Elements Contributions to Plant Gene and Genome Evolution, *Plant Molecular Biology*, 42, 251-269.

BENNETT, M.D. and LEITCH, I.J., 2005, Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects, *Annals of Botany*, 95, 45-90.

BENNETT, M.D., SMITH, J.B., 1976, Nuclear DNA Amounts in Angiosperms, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*. 274(933), 227-74.

- BENTO, M., GUSTAFSON, P., VIEGAS, W. and SILVA, M., 2010, Genome merger: from sequence rearrangements in triticale to their elimination in wheat-rye addition lines. *Theor Appl Genet* (2010) 121:489–497.
- BERGMAN, C.M. and QUESNEVILLE, H., 2007, Discovering and Detecting Transposable Elements in Genome Sequences, *Briefing in Bioinformatics*, 8 (6), 382-392.
- BIÉMONT, C., 2009, Are Transposable Elements Simply Silenced or Are They Under House Arrest, *Trends in Genetics*, 25 (8), 333-334.
- BİLGE, E., ORALER, G., GÖZÜKIRMIZI, N., OLGUN, A., TOPAKTAŞ, M., 1981, Experimental Mutations in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası*, Seri B 46, 29-35.
- BIRD, A., 2007, Perceptions Of Epigenetics, *Nature*, 447, 398-398.
- BOND, D.M. and FINNEGAN, E.J., 2007, Passing The Message On: Inheritance of Epigenetic Traits, *TRENDS in Plant Science*, 12 (5), 211-216.
- BOWEN, N.J., and JORDAN, K., 2002, Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity, *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 65-76.
- BRANCO, C.J.S., VIEIRA, E.A., MALONE, G., KOPP, M.M., MALONE, E., BERNARDES, A., MISTURA, C.C., CARVALHO, F.I.F., OLIVEIRA, C.A., 2007, IRAP and REMAP Assessments of Genetic Similarity in Rice, *Journal of Applied Genetics*, 48 (2), 107-113.
- BREGITZER, P. DAHLEEN, L. S. NEATE, S. SCHWARZ, P. and MANCHARAN, M., 2008, A single backcross effectively eliminates agronomic and quality alterations caused by somaclonal variation in transgenic barley. *Crop Science*, 48(2), 471-479.
- BREGITZER, P. and CAMPBELL, R. D., 2001, Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. *Crop Science*, 41, 173-179.
- CASTIGLIONE, M.R., VENORA, G., RAVALLI, C., STOILOV, L., GECHEFF, K., CREMONINI, R., 2008, DNA Methylation and Chromosomal Rearrangements in Reconstructed Karyotypes of *Hordeum vulgare* L., *Protoplasma*, 232, 215-222.
- CHANG, Y., ZITZEWITZ, J.V., HAYES, P.M. and CHEN, T.H.H., 2003, High Frequency Plant Regeneration from Immature Embryos of an Elite Barley Cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). *Plant Cell Reports*, 21 (8), 733-8.
- COLOT, V., 2004, Transposable Elements and the Origin Heterochromatin and Epigenetic Control, *Le Journal du Centre National de la Recherche Scientifique*, 59-60.

DAHLEEN, L.S., 1999, Donor-Plant Environment Effects on Regeneration from Barley Embryo-Derived Callus, *Crop Science*, 39 (3), 682-685.

D'ALESSIO, A.C. and SZYF, M., 2006, Epigenetic Tête – à – Tête: the Bilateral Relationship Between Chromatin Modifications and DNA Methylation, *Biochemistry and Cell Biology*, 84, 463-476.

DEININGER, P.L. and BATZER, M., 2002, Mammalian Retroelements, *Genome Research*, 12, 1455-1465.

DEVOS, K.M., 2005, Updating the Crop Circle, *Current Opinion In Plant Biology*, 8, 155-162.

DUNWELL, J.M., 1986, *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 4*, MacMillan & Co, London, 0-02-947940-1.

EMERSON, R.A., 1914, The Inheritance of a Recurring Somatic Variation in Variegated Ears of Maize, *The American Naturalist*, 48, 87-115.

ER, C., CANPOLAT N., 1992, Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları, Ankara.

EVRENSEL, C., YILMAZ, S., TEMEL, A. and GOZUKIRMIZI, N., 2011, Variations in *BARE-1* insertion patterns in barley callus cultures., *Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science*, 10 (2): 980-987.

FORSTER, B.P., ELLIS, R.P., THOMAS., W.T.B., NEWTON, A.C., TUBEROSA, R., THIS, D., EL-ENEIN, R.A., BAHRÍ, M.H. and BEN SALEM, M., 2000, The Development and Application of Molecular Markers for Abiotic Stress Tolerance In Barley, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 19-27.

FEDEROFF, N., 2000, Transposons and Genome Evolutions in Plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (13), 7002-7007.

FEDEROFF, N., 2001, How Jumping Genes Were Discovered, *Nature Structural Biology*, 8 (4), 300-301.

FESCHOTTE, C., JIANG, N. and WESSLER, S.R., 2002, Plant Transposable Elements: Where Genetics Meets Genomics, *Nature*, 3, 329-341.

FINNEGAN, D.J., 1989, Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution, *Trends in Genetics*, 5, 103-107.

FORSTER, B.P., ELLIS, R.P., THOMAS., W.T.B., NEWTON, A.C., TUBEROSA, R., THIS, D., EL-ENEIN, R.A., BAHRÍ, M.H. and BEN SALEM, M., 2000, The Development and Application of Molecular Markers for Abiotic Stress Tolerance In Barley, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 19-27.

- GABERT, V.M., JORGENSEN, H., BRUNSGAARD, G., EGGUM, B.O., JENSEN, J., 1996, The Nutritional Value of New High-Lysine Barley Varieties Determined With Rats and Pigs, *Canadian Journal of Animal Science*, 76, 443-450.
- GOLDBERG, A., ALLIS, C.D. and BERNSTEIN, E., 2007, Epigenetics: A Landscape Takes Shape, *Cell*, 128, 635-638.
- GOLDSTEIN, C.S., KRONSTAD, W.E., 1986, Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*, *Theoretical and Applied Genetics*, 71(4): 631-636.
- GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., ORALER, G., OKATAN, Y., PALAVAN, N., 1990, Callus Induction, Plant Regeneration and Chromosomal Variations in Barley, *Acta Botanica Neerlandica*, 39 (4), 379-387.
- GRZEBELUS, D., 2005, Transposon Insertion Polymorphism As a New Source of Molecular Markers, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (1), 21-29.
- GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 2003, Electroporation Transformation of Barley, *Modern Methods of Plant Analysis*, 23, 69-89.
- HALAMKOVA, E., VAGERA, J. and OHNOUTKOVÁ, L., 2004, Regeneration Capacity of Calli Derived from Immature Embryos in Spring Barley Cultivars, *Biologia Plantarum*, 48(2), 313-316.
- HENDERSON, I.R and JACOBSEN, S.E., 2007, Epigenetic Inheritance in Plants, *Nature*, 447, 418-423.
- HIROCHIKA, H., 1993, Activation of Tobacco Retrotransposons During Tissue Culture, *The EMBO Journal*, 12 (6), 2521-2528.
- HOLLIDAY, R., Epigenetics, 2007, A Historical Overview, *Landes Bioscience*, 1 (2), 76-80.
- HUANG, J., ZHANG, K., SHEN, Y., HUANG, Z., LI, M., TANG, D., GU, M., CHENG, Z., 2009, Identification of a High Frequency Transposon Induced by Tissue Culture, *nDaiz*, a Member of the *hAT* Family in Rice, *Genomics*, 93, 274-281.
- İMAMOĞLU, A., SARI, N., 2009, *Çiftçi Bröşürü: Arpa Yetiştiriciliği* [online], Ege Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü, <http://www.etae.gov.tr/yayin-ek/ciftci-bro/125-ciftcibro.pdf> [Ziyaret Tarihi: 16 Mart 2011].
- JURKA, J., 2007, Conserved Eukaryotic Transposable Elements and the Evolution of Gene Regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 201-204.

KAEPLER, S. and KAEPLER, H., 2000, Epigenetic Aspects of Somaclonal Variation in Plants, *Plant Molecular Biology*, 43, 179-188.

KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A., 1999, IRAP and REMAP: Two New Retrotransposon-Based DNA Fingerprinting Techniques, *Theoretical & Applied Genetics*, 98, 704-711.

KALENDAR, R., SCHULMAN, A., 2006, IRAP and REMAP for Retrotransposon-Based Genotyping Fingerprinting, *Nature Protocols*, 1 (5), 2478-2484.

KARTAL, G., TEMEL, A., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI, N., 2009, Effects of Brassinosteroids on Barley Root Growth, Antioxidant System and Cell Division, *Plant Growth Regulation*, 58, 261-267.

KIEFER, J.C., 2007, Epigenetics in Development, *Developmental Dynamics*, 236, 1144-1156.

KOORNNEEF, M., ALONSO-BLANCO, C. and PEETERS, A.J.M., 1997, Genetic Approaches in Plant Physiology, *New Phytologist*, 137, 1-8.

KOTHARI, S.L., JOSHI, A., KACHHWAHA, S., OCHOA-ALEJO, N., 2010, Chilli peppers – A review on Tissue Culture and Transgenesis, *Biotechnological Advances*, 28, 35-48.

LARKIN, P.L., SCOWCROFT, W.R., 1981, Somaclonal Variation – a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60 (4), 197-214.

LERAT, E., 2009, Identifying Repeats and Transposable Elements in Sequenced Genomes: How to Find Your Way Through the Dense Forest of Programs, *Heredity*, 1-14.

LEIGH, F., KALENDAR, R., LEA, V., LEE, D., DONINI, P., SCHULMAN, A.H., 2003, Comparison of the Utility of Barley Retrotransposon Families for Genetic Analysis by Molecular Marker Techniques, *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 464-474.

LI, X. and YU, X., 2007, Genetic and Epigenetic Instabilities Induced by Tissue Culture in Wild Barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link), *Plant cell tissue organ culture*, 90, 153-168.

LIPPMAN, Z., GENDREL, A.V., BLACK, M., VAUGHN, M.W., DEDHIA, N., McCOMBIE, R., LAVINE, K., MITTAL, V., MAY, B., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C., DOERGE, R.W., COLOT, V. and MARTIENSSEN, R., 2004, Role of Transposable Elements in Heterochromatin and Epigenetic Control, *Nature*, 430, 471-477.

- LYONS, M., CARDLE, L., ROSTOKS, N., WAUGH, R., FLAVELL, A.J., 2008, Isolation, Analysis and Marker Utility of Novel Miniature Inverted Repeat Transposable Elements From the Barley Genome, *Molecular Genetics and Genomics*, 280, 275-285.
- MADLUNG, A. and COMAI, L., 2004, The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure, *Annals of Botany*, 94 (4), 481-495.
- MANSOUR, A., 2007, Epigenetic Activation of Genomic Retrotransposons, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (2), 99-107.
- MARCO, A. and MARIN, I., 2005, Retrovirus-Like Elements in Plants, *Recent Research Development Plant Sciences*, 81-7736-245-3.
- MARTIN, C. and ZHANG, Y., 2007, Mechanisms of Epigenetic Inheritance, *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 266-272.
- McCLINTOCK, B., 1948, The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize, *Proceedings of the National Academy of Science*, 36, 344-355.
- McCLINTOCK, B., 1984, The Significance of Responses of the Genome to Challenge, *Science Journal*, 226, 792.
- MILLER, W.J., 2004, *Mobile Genetic Elements – Protocols and Genomic Applications Edited*, Humana Press Inc. 999, New Jersey, ABD, 1-58829-007-7.
- MORAN, J.V. and MALIK, H.S., 2009, Diamonds and Rust: How Transposable Elements Influence Mammalian Genomes, *European Molecular Biology Organization Reprints*, 10 (12), 1306-1310.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15, 473-479.
- NISHIMURA, T., PASZKOWSKI, J., 2007, Epigenetic transitions in Plants Not Associated With Changes in DNA or Histone Modifications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796, 393-398.
- OKA, S., SAITO, N. and KAWAGUCHI, H., 1995, Histological Observations on Initiation and Morphogenesis in Immature and Mature Embryo Derived Callus on Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Annals of Botany*, 76, 487-492.
- OKOMATO, H. and HIROCHIKA, H., 2001, Silencing of Transposable Elements in Plants, *Trends in Plant Science*, 6 (11), 527-534.
- ÖZTÜRK, N.Z., TALAME, V., DEYHOLOS, M., MICHALOWSKI, C.B., GALBRAITH, D.W., GÖZÜKIRMIZI, N., TUBEROSA, H., BOHNERT, H., 2002, Monitoring Large-Scale Changes in Transcript Abundance in Drought and Salt-Stressed Barley, *Plant Molecular Biology*, 48 (5-6), 551-573.

PAGNOTTA, M.A., MONDINI, L. and PORCEDDU, E., 2009, Quantification and Organization of WIS2-1A and *BARE-1* Retrotransposons in Different Genomes of *Triticum* and *Aegilops* Species, *Molecular Genetics and Genomics*, 282, 245-255.

PASSARGE, E., 2000, *Renkli Genetik Atlası*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 975-420-0351.

PEREDO, E.L., REVILLA, M.A., ARROYO-GARCIA, R., 2006, Assessment of Genetic and Epigenetic Variation in Hop Plants Regenerated from Sequential Subcultures of Organogenic Calli, *Journal of Plant Physiology*, 163 (10), 1071-1079.

PHILLIPS, R.L., KAEPLER, S.M., OLHOFT, P., 1994, Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls, *Proc Nati Acad Sci USA*, 91: 5222-5226.

POURKHEIRANDISH, M. and KOMATSUDA, T., 2007, The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective, *Annals of Botany*, 100 (7), 999-1008.

RABINOWICZ, P.D., CITEK, R., BUDIMAN, M.A., NUNBERG, A., BEDELL, J.A., LAKEY, N., O'SHAUGHNESSY, A.L., NASCIMENTO, L.U., McCOMBIE, W.R., MARTIENSSEN, R.A., 2005, Differential Methylation of Genes and Repeats in Land Plants, *Genome Research*, 15 (10), 1431-1440.

RAKYAN, V.K. and BECK, S., 2006, Epigenetic Variation And Inheritance in Mammals, *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 573-577.

RHOADES, M.M., 1941, The Genetic Control of Mutability in Maize, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9, 138-144.

ROBERTS, A.P., CHANDLER, M., COURVALIN, P., GUÉDON, G., MULLANY, P., PEMBROKE, T., ROOD, J.I., SMITH, J., SUMMERS, A.O., TSUDA, M., BERG, D.E., 2008, Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements, *Plasmid*, 60, 167-173.

RODRIGUEZ, M., O'SULLIVAN, D., DONINI, P., PAPA, R., CHIAPPARINO, E., LEIGH, F. and ATTENE, G., 2006, Integration of Retrotransposons-Based Markers In a Linkage Map of Barley, *Molecular Breeding*, 17, 173-184.

ROGERS, S.O. and BENDÍCH, A. J., 1985, Extractions of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues., *Plant Molecular Biology*, 5: 69-76.

SAÏSHO D. and PURUGGANAN D.M., 2007. "Molecular Phylogeography of Domesticated Barley Traces Expansion of Agriculture in the Old World". *Genetics* 177: 1765–1776.

SCHELLENBAUM, P., MOHLER, V., WENZEL, G. and WALTER, B., 2008, Variation in DNA Methylation Patterns of Grapevine Somaclones (*Vitis Vinifera* L.), *BioMed Central Plant Biology*, 8, 78.

SCHULMAN, A.H., FLAVELL, A.J. and ELLIS, T.H.N, 2004, The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants, *Methods in Molecular Biology*, 260, 145-173.

SCHULMAN, A.H., KALENDAR, R., 2005, *Cytogenetic and Genome Research*, 110, 598-605.

SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, K., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P. and STEIN, N., 2009, The International Barley Sequencing Consortium—At the Treshold of Efficient Access to the Barley Genome, *Plant Physiology*, 149, 142-147.

SCHWANN, T., 1839, Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen, *Leipzig, Wilhelm Engelmann*, 176.

SCLEIDEN, M.J., 1838, Beiträge zur Phytogenesis, *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin (Johannes Müller)*, 137-176.

SHAKHATREH, Y., HADDAH, N., ALRABABAH, M., GRANDO, S., CECCARELLI, S., 2009, Phenotypic Diversity in Wild Barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell.) Accessions Collected in Jordan, *Genetic Resources amd Crop Evolution*.

SHARMA, V.K., HÄNSCH, R., MENDEL, R.R. and SCHULZE, J., 2005, Mature Embryo Axis-Based High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Multiple Cultivars of Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), 1913-1922.

SHIRASU, K., SCHULMAN, A.H., LAHAYE, T., 2000, A Contiguous 66-kb Barley DNA Sequence Provides Evidence for Reversible Genome Expansion, 2000 10: 908-915.

SLOTKIN, R.K. and MARTIENSSEN, R., 2007, Transposable Elements and the Epigenetic Regulation of the Genome, *Nature*, 8, 272-285.

SMIT, A.F.A. and RIGGS, A.D., 1996, Tiggers and Other DNA Transposon Fossils in the Human Genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1443-1448.

TEMEL A., GÖNÜL KARTAL G., GÖZÜKIRMIZI N. 2008. "Genetic and Epigenetic Variations in Barley Calli Cultures". *Biotechnology and Biotechnology Equipment* 22 (4): 911–914.

- TENAÏLLON, M.I., HOLLİSTER, J.D. and GAUT, B.S., 2010, A triptych of the evolution of plant transposable elements, *Genetique Vegetale, Organismal and Evolutionary Biology, Ecology and Evolutionary Biology*, 471–478.
- THORNBURG, B.G., GOTEA, V., MAKALOWSKI, W., 2005, Transposable Elements As a Significant Source of Transcription Regulating Signals, *Gene*, 365, 104-110.
- TODOROVSKA, E., 2007, Retrotransposons and their role in plant – genome evolution. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*. 3: 294-305.
- UYSAL, M.E., YILDIRIM, A.F., 2003, Konya İlinde Kışlık ve Yazlık Ekilen Arpa Çeşitlerinde Yaprakbiti (Homoptera:Aphidoidea) Populasyon Gelişimi, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (32), 1-5.
- VASIL, I.K., 2008, A History of Plant Biotechnology: From the Cell Theory of Schlieden and Schwann to Biotech Crops, *Plant Cell Reports*, 27, 1423-1440.
- VENNER, S., FESCHOTTE, C. and BIÉMONT, C., 2009, Dynamics of Transposable Elements: Towards a Community Ecology of the Genome, *Trends in Genetics*, 25 (7), 317-323.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H., 2005, Variability, Recombination, and Mosaic Evolution of the Barley *BARE-1* Retrotransposon, *Journal of Molecular Evolution*, 61, 275-291.
- VLIET, J.V., OATES, N.A. and WHITELAW, E., 2007, Epigenetic Mechanisms İn The Context Of Complex Diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1531-1538.
- von BOTHMER, R., JACOBSEN, N., BADEN, C., JØRGENSEN, R.B., LINDELAURSEN, I., 1995, *An Ecogeographical Study of the Genus Hordeum*, 2nd ed., Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene pools 7. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 929-0432-292.
- YENTÜR, S., 1995, *Bitki Anatomisi*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 975-404-3515.
- WADDINGTON, C., 1942, The Epigenotype, *Endeavour*, 1, 18-20.
- WATERLAND, R.A., and MICHELS, K.B., 2007, Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis, *Annual Review of Nutrition*, 27, 363-388
- WEIL, C. and MARTIENSSSEN, R., 2008, Epigenetic Interactions Between Transposons and Genes: Lessons from Plants, *Current Opinion in Genetics and Development*, 18, 1-5.

WESSLER, S., 2006, Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (47), 17600-17601.

WESSLER, S.R., 2009, The Implicit Genome [online], Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks, http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The_Implicit_Genome.pdf [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2011].

WESSLER, S., MICKLOS, D., 2009, *YouTube – Cold Spring Harbor Laboratory’s Dolan DNA Learning Center* [online], Jumping Gene Caught in the Act, <http://www.youtube.com/user/DNALearningCenter#p/f/4/9MPiRx3SPMM> [Ziyaret Tarihi: 16 Şubat 2011].

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. and SCHULMAN, A.H., 2007, A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements, *Nature Genetics*, 8, 973-982.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Sakarya’da doğdum. Orta ve Lise öğrenimimi İstanbul’da tamamladıktan sonra 2004 yılında kaydımı yaptırmış olduğum İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2008 yılında mezun oldum. 2009 yılının Eylül ayında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek lisans eğitimime başladım.