



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

NOHUT GEVENİ (*Astragalus cicer L.*) SENTROMERİK DNA DİZİLERİNİN
MOLEKÜLER KLONLANMASI

GİZEM SUNKAR

Şubat 2021

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

NOHUT GEVENİ (*Astragalus cicer L.*) SENTROMERİK DNA DİZİLERİNİN
MOLEKÜLER KLONLANMASI

GİZEM SUNKAR

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Şubat 2021

Gizem SUNKAR tarafından **Doç. Dr. Ahmet Latif TEK** danışmanlığında hazırlanan “**Nohut Geveni (*Astragalus cicer L.*) Sentromerik DNA Dizilerinin Moleküler Klonlanması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nejdet KANDEMİR

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri, Tokat

İmza

Üye : Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Ayhan Şahenk Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği, Niğde

İmza

Üye : Doç. Dr. Ufuk DEMİREL

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Ayhan Şahenk Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği, Niğde

İmza

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından /..../2021 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/..../2021.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2021

Prof. Dr. Murat BARUT

MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

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

Gizem SUNKAR



ÖZET

NOHUT GEVENİ (*Astragalus cicer L.*) SENTROMERİK DNA DİZİLERİNİN MOLEKÜLER KLONLANMASI

SUNKAR, Gizem

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman:

Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Şubat 2021, 84 sayfa

Nohut geveni olarak da bilinen *Astragalus cicer L.* çok yıllık bir baklagil bitkisidir. Literatürde nohut geveninin tarımsal ve genetik özellikleri hakkında son derece sınırlı bilgi mevcuttur. Türkiye'de, bir yem bitkisi olarak nohut geveninin daha etkin kullanılmasına yönelik çalışmalar, çoğunlukla çeşit ve popülasyon geliştirme aşamalarında ilerlemektedir. Bitki genomlarının önemli bir kısmını tekrarlayan DNA elementleri olarak adlandırılan ve ardışık çok sayıda kopyası bulunan sentromerik DNA dizileri teşkil etmektedir. Yakın zamanda *Astragalus* sentromerik DNA dizileri tespit edilmiştir. Bu çalışma ışığında, nohut geveni sentromerik bölgelerinde bulunan DNA dizileri, polimeraz zincir reaksiyonu ve Southern hibridizasyon tekniklerinin entegre edildiği moleküler biyoteknolojik yöntemlerle analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, nohut geveni genomundaki 20-bç ardışık tekrar eden sentromerik DNA dizi monomerleri keşfedilmiş ve 5S, 45S ribozomal DNA'lar karakterize edilmiştir. Tezimizin çıktıları, nohut geveni çalışmaları için ciddi bir bilgi açığını kapatmakla birlikte aynı zamanda baklagil bitkilerinin genom yapı özellikleri için gelecekteki çalışmalarda referans teşkil etmektedir.

Anahtar sözcükler: Ardışık tekrarlar, ribozomal DNA, tekrarlayan DNA elementleri, baklagil, genom, sentromer, Southern hibridizasyon, *Astragalus*

SUMMARY

MOLECULAR CLONING OF CENTROMERIC DNA SEQUENCES IN CICER MILKVETCH (*ASTRAGALUS CICER L.*)

SUNKAR, Gizem

Niğde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor: Associate Professor Dr. Ahmet Latif TEK

Şubat 2021, 84 pages

Astragalus cicer L., also known as cicer milkvetch, is a perennial leguminous plant. There is very limited information about cicer milkvetch in the literature. Studies in Turkey on the use of cicer milkvetch as a more effective forage plant have progressed in the stages of population and variety development. A significant portion of plant genomes are composed of centromeric DNA sequences, which are called repetitive DNA elements and have numerous copies in tandem. Recently, *Astragalus* centromeric DNA sequences have been identified. This work has utilized the molecular biotechnological methods by integrating the polymerase chain reaction and the Southern hybridization techniques to shed light on the centromeric regions of cicer milkvetch. As a result of the analyzes, 20-bp sequentially repeating centromeric DNA sequence monomers in the cicer milkvetch genome were discovered and 5S, 45S ribosomal DNAs were characterized. Our thesis could provide some basic information for cicer milkvetch studies, and at the same time will be a reference for genomic features of leguminous plants.

Keywords: Tandem repeats, ribosomal DNA, repetitive DNA elements, leguminosae, genome, centromere, southern hybridization, *Astragalus*.

ÖN SÖZ

Öncelikle danışmanım Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e tezim boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik ettiği için çok teşekkür ederim. Danışman-öğrenci olarak karşılıklı güven neticesinde ilerlediğimiz bu yolda ne zaman bir sıkıntı yaşasam yanımda olup bana destek olduğu için kendisine sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde sağladıkları burs imkânıyla maddi ihtiyaçlarımı karşılamamda bana yardımcı olan Ayhan Şahenk Vakfı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, FEB 2017/34 numaralı "Nohut Geveni (*Astragalus Cicer* L.) Sentromerik DNA Dizilerinin Moleküler Karakterizasyonu" isimli BAP projesinden üretilmiş olup, projeye destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu zorlu ve tempolu süreçte laboratuvar çalışmalarımda olsun, özel hayatımda olsun her zaman yanımda olan benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Bilge Şevval YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca aynı laboratuvarda çalışmaktan mutluluk ve gurur duyduğum sevgili ekip arkadaşlarım Hümeysra YILDIZ, Sevim Döndü KARA, Ainura Adylbek KYZY ve Harriet SUNKARİ'ye laboratuvar çalışmalarımız boyunca sabırlı, anlayışlı ve yardımsever olmalarından dolayı çok teşekkür ederim. Bu süreçte deneyim ve bilgilerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Esra KARAKAŞ, Dilan ATEŞ, Mehmet BEDİR, Özge ÇETİN ve Cansu ÇİFÇİ 'ye desteklerinden ve ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak beni yetiştiren, her koşulda her daim arkamda olan, ileriye yönelik her adımında beni yüreklendiren maddi manevi her türlü yanımda olan sevgili ailem; annem Ayşe SUNKAR'a, sevgili babam Erdoğan SUNKAR'a, sevgili ablalarım Gülcan ve Çilem SUNKAR'a ve biricik kardeşim Sinan SUNKAR'a benimle bir oldukları ve beni asla yalnız bırakmadıkları için özel ve minnet dolu bir teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	4
2.1 Astragalus Cinsi ve Türü Olan <i>Astragalus cicer</i> L. Türünün Morfolojik, Fizyolojik ve Sitogenetik Özellikleri	4
2.1.1 Astragalus cinsi ve <i>Astragalus cicer</i> L. türünün taksonomisi ve coğrafi dağılımı	6
2.2 Tekrarlayan DNA Elementleri	7
2.2.1 Ardışık tekrarlar	11
2.2.1.1 Mikrosatelit tekrarlar	11
2.2.1.2 Minisatelit tekrarlar	13
2.2.1.3 Satelit DNA (satDNA) tekrarları	13
2.2.1.4 Ribozomal DNA (rDNA) tekrarları	14
2.2.2 Dağınık tekrarlar	15
2.3 Sentromer ve Sentrometik Tekrar Dizileri	16
2.4 Southern Hibridizasyon	18
2.5 Tez Çalışmasının Amaç ve Hedefleri	19
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 Bitki materyali	21
3.2 Metot	22
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu	22
3.2.2 Sentromerik tekrarlayan DNA dizilerinin PZR amplifikasyonu	23
3.2.3 Agaroz jelden PZR ürününün saflaştırılması	24

3.2.4 Elektrokompetent hücre hazırlama.....	25
3.2.5 Ligasyon	25
3.2.6 Bakteriyel transformasyon.....	26
3.2.7 Plazmid DNA izolasyonu	26
3.2.8 Koloni PZR ve dizileme	28
3.2.9 Verilerin değerlendirilmesi ve biyoinformatik analizi	29
3.2.10 Dot blot.....	29
3.2.11 Southern hibridizasyon analizi	30
3.2.11.1 DIG-DNA labelling (probe hazırlama).....	30
3.2.11.2 DNA'nın membrana kapiller transferi	30
3.2.11.3 DNA'nın membrana sabitlenmesi	32
3.2.11.4 Hibridizasyon protokolü	32
3.2.11.5 Belirleme aşaması.....	33
3.2.11.6 Karanlık oda metodu ile film görüntüsü eldesi	34
BÖLÜM IV BULGULAR.....	36
4.1 İş Akışı ve Planı	36
4.2 Nohut Geveni Bitkisinin Çimlendirme ve Yetiştirilmesi.....	37
4.3 Nohut Geveninde Genomik DNA İzolasyonu	37
4.4 Sentromerik Tekrarlayan DNA Dizilerinin PZR İle Çoğaltılması	38
4.5 Agaroz Jelden PZR Ürününün Saflaştırılması.....	39
4.6 Bakteriyel Transformasyon.....	40
4.7 Nohut Geveni Türünde İnsert DNA Parçasının Varlığının Saptanması	41
4.8 Verilerin Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analiz	42
4.9 Southern Hibridizasyon	53
BÖLÜM V TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	80
ÖZ GEÇMİŞ	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Astragalus cicer L.</i> türünün taksonomik açıdan genel gösterimi	6
Çizelge 2.2. Tekrarlayan DNA elementlerinin genel sınıflandırması	9
Çizelge 2.3. Bazı organizma türlerinde tekrarlayan DNA elementlerinin genom içerisindeki kapsam yüzdesi	10
Çizelge 2.4. Ardışık tekrarlayan DNA elementlerinin sınıflandırılması ve yaklaşık monomer dizi uzunlukları	11
Çizelge 2.5. Dağınık tekrarlayan DNA elementlerinin sınıflandırılması	15
Çizelge 2.6. Temsili organizmalarda sentromerik tekrarlayan DNA elementleri	18
Çizelge 3.1. <i>Astragalus sinicus</i> sentromerik tekrarlayan DNA dizilerinin korunmuş bölgelerinden tasarlanan ileri ve geri primer dizileri	24
Çizelge 3.2. Koloni PZR için kullanılmış olan standart M13 primerlerin dizisi	28
Çizelge 3.3. DNA'nın membrana kapiller aktarımında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri	30
Çizelge 3.4. Hibridizasyon aşamasında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri	32
Çizelge 3.5. Belirleme aşamasında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri	33
Çizelge 3.6. X-Ray Film banyosu için kullanılan kimyasallar	34
Çizelge 4.1. <i>Astragalus cicer L.</i> bitkisinin genç yapraklardan farklı ağırlıklarda elde edilen genomik DNA izolasyonlarının Nanodrop ölçümleri. Kırmızı kare içerisine alınan gDNA ile çalışmalar yürütülmüştür	38
Çizelge 4.2. Analizi yapılan dizileme sonuçlarının total uzunluğunu, M13 (ileri, geri) primerlerinden uzaklaştırılmış klonların net uzunluğunu ve NCBI Blast veri sonuçlarını gösteren çizelge	43
Çizelge 4.3. Southern hibridizasyon analizinde kullanılan membranlar ve parametreleri	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Bitki kromozomları üzerinde tekrarlayan dizilerin genel dağılımı. Farklı tipteki tekrarlayan dizilerin dağılımı, bitki kromozomu üzerinde farklı renklerle renklendirilerek şematik olarak temsil edilmektedir. Turuncu renk, sentromerik ardışık tekrarları; yeşil renk, telomerik ardışık tekrarları; pembe renk, sub-telomerik ardışık tekrarları; mor renk, interstitial ardışık tekrarları; mavi renk, genom içerisinde dağılmış tekrarları; sarı renk ise genler ve düşük kopya dizileri temsil etmektedir 8
- Şekil 2.2. Southern Hibridizasyon tekniğinin genel mekanizması 19
- Şekil 3.1. Bitkinin yetiştirilmesi ve materyalin toplanması. Tohumların filtre kağıdında çimlendirilmesi (a), çimlenenlerin küçük saksıya aktarılması (b), köklenenlerin büyük saksıya aktarılması (c), bitkinin genç yapraklarının kesilmesi (d-e) ve genç yaprakların buzda muhafaza edilerek toplanması (f) şekilde gösterilmiştir 21
- Şekil 3.2. Yapraktan genomik DNA izolasyonunu gösteren önemli aşamalar. Materyalin sıvı azot kullanılarak öğütülmesi (a), izopropanol eklenmesi ile bulutsu DNA yapısının gözlenmesi (b) ve distile su ile DNA'nın çözdürülmesi (c) 23
- Şekil 3.3. pGEM-T easy vektörünün boyutu ve çoklu klonlama bölgesini kesen restriksiyon enzimlerini gösteren harita (Promega) 26
- Şekil 3.4. Agaroz jeldeki DNA'nın membrana kapiller aktarımı 31
- Şekil 3.5. Karanlık oda içerisinde film eldesi (pembe kaptaki developer solüsyonu, mavi kaptaki fixer solüsyonu, yeşil kaptaki ise ddH₂O bulunmaktadır) 35
- Şekil 4.1. Genel metodolojiyi gösteren akış diyagramı 37
- Şekil 4.2. Farklı ağırlıkla yapraklardan izole edilen ve farklı konsantrasyonlara sahip nohut geveni (*Astragalus cicer* L.) bitkisinin genomik DNA jel görüntüsü .. 38
- Şekil 4.3. Nohut geveni 47-50 ve 53 °C primer bağlanma sıcaklıkları kullanılarak PZR çoğaltması sonucunun elde edilen DNA fragmentlerinin agaroz jel görüntüsü 39
- Şekil 4.4. Agaroz jelden 1000 bp uzunluğundaki PZR ürününün saflaştırılması (a) ve saflaştırılma işleminden sonra 1000 bp uzunluğundaki PZR ürününün agaroz jel görüntüsü (b) 40

Şekil 4.5. Transformasyon sonucu büyüyen tek rekombinant kolonileri gösteren tabak	40
Şekil 4.6. Koloni PZR sonuçlarının jel görüntüsü (kırmızı ile kare içine alınan klonlar insert klonlardır).....	41
Şekil 4.7. Koloni PZR sonuçlarının jel görüntüsü (kırmızı ile kare içine alınan klonlar insert klonlardır).....	42
Şekil 4.8. YASS genomic similarity search tool programı ile 10 klonun Dizilerin dotplot ile tekrarlayan dizilerinin karşılaştırmaları (Noe ve Kucherov, 2005). Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir	44
Şekil 4.9. Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) dizilerin dotplot ile ikili karşılaştırmaları. Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir (Soldan sağa doğru klonlar sırasıyla CentAc4, CentAc15, CentAc16).....	45
Şekil 4.10. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm Astragalus cicer L. klonların ve Astragalus sinicus da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda Astragalus cicer L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir	49
Şekil 4.11. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm Astragalus cicer L. klonların ve Astragalus sinicus da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda Astragalus cicer L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir	50
Şekil 4.12. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm Astragalus cicer L. klonların ve Astragalus sinicus da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda Astragalus cicer L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir	51

Şekil 4.13. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm Astragalus cicer L. klonların ve Astragalus sinicus da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda Astragalus cicer L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir	52
Şekil 4.14. Çoklu hizalama sonrası Astragalus cicer ve Astragalus sinicus 20 bç monomerlerinde tespit edilen 10-mer ve 5-merler.....	53
Şekil 4.15. Dot blot tekniği ile prob kontrolü	54
Şekil 4.16. Nohut geveni gDNA'sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 4.17. Karanlık oda metodu ile Ac77 klonu prob olarak kullanılarak merdivenvari ardışık ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü. Soldaki film görüntüsünde karanlık odada membrandan filme görüntü aktarımı 20 saatte gerçekleşmiştir. Sağdaki film görüntüsünde ise membrandan filme görüntü aktarımı 3,5 saatte gerçekleştirilmiştir	55
Şekil 4.18. Nohut geveni gDNA'sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü (a) ve Karanlık oda metodu ile 5S prob kullanılarak merdivenvari ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü (b).....	56
Şekil 4.19. Nohut geveni gDNA'sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü (a) ve karanlık oda metodu ile 45S prob kullanılarak merdivenvari ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü (b).....	56

SİMGE VE KISALTMALAR

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

Kısaltmalar	Açıklama
CATD	Sentromer Hedeflenme Alanı
cDNA	Komplementer DNA
Cent	Sentromerik Tekrar Dizisi

CenH3	Sentromere Özgü Histon H3 (Nükleotit)
CENH3	Sentromere Özgü Histon H3 (Protein)
SatDNA	Satelit DNA
rDNA	Ribozomal DNA
LTR	Uzun Terminal Tekrarları
UTR	Transkribe Olmayan Bölgeler
LARD	Büyük Retrotranspozon Türevleri
TRIM	Minyatürde Terminal Tekrarlı Retrotranspozon
LINE	Uzun Dağınık Nükleer Elementler
SINE	Kısa Dağınık Nükleer Elementler
TIR	Terminal Ters Çevrilmiş Tekrarlar
MITE	Minyatür-Ters Çevrilmiş Tekrar Elementi
ORF	Dahili Açık Okuma Çerçevesi
pol	Polimeraz
ddH ₂ O	Deionize Distile Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EtOH	Etanol
HFD	Histon Katlanma Bölgesi
gDNA	Genomik DNA
H3	Histon 3
NCBI	National Center For Biotechnological Information
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon

BÖLÜM I

GİRİŞ

Fabaceae ailesinin bir üyesi olan *Astragalus* Avrupa kıtasına özgü çok yıllık bir baklagildir (Acharya vd., 2006). *Astragalus* çiçekli bitkiler içerisinde 2.500'den fazla türle en fazla üyesi bulunan taksonomik grubu oluşturur. Türkiye, *Astragalus* türleri bakımından zengin bir ülkedir (Kıvçak,1956). Yaklaşık 400 türü bulunan geven genellikle taşlı yerlerde, steplerde, özellikle Orta ve Doğu Anadolu'da doğal olarak yayılım göstermektedir (Karakurt, 2004).

Astragalus cinsinin bir üyesi olan *Astragalus cicer L.* nohut geveni olarak da bilinmektedir ve Avrupa kıtasına özgü çok yıllık poliploid bir baklagildir (Acharya vd., 2006; Latterell ve Townsend., 1994). Nohut geveninin doğal dağılımı, Finlandiya'dan Kuzey İspanya'ya ve doğu Rusya'ya kadar uzanan bir alanda serin ve nemli yerlerde yetişmektedir (Stroh vd., 1973; Townsend 1971). Nohut geveni, adaptasyon kabiliyeti yüksek, kışa dayanıklı, değişik toprak yapılarına uyumlu bir yem bitkisi olarak tanımlanmaktadır (Miller ve Hoveland 1995). Türkiye'de İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu gibi kurak bölge şartlarında yem ve mera bitkisi olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (Bakır vd., 1980).

Nohut geveninin diğer baklagil ve yem bitkileri ile karşılaştırıldığında pek çok avantajı bulunmaktadır. Mera bitkisi olarak uygun olan bu bitkinin, ayrıca rizom oluşturması sebebiyle otlatmaya çok dayanıklı olduğunu bildirilmektedir (Ünal ve Fırıncıoğlu, 2002). Nohut geveni bünyesindeki azot miktarını artırmak için genellikle buğdaygillerle karışım halinde yetiştirilir aynı zamanda yemdeki toplam kuru madde ve protein içeriğini arttırır (Smoliak ve Hanna 1977). Nohut geveni yonca gibi bünyesinde selenyum içermediğinden hayvanlar için toksik etki oluşturmamaktadır. Böylece yoncanın aksine otlayan hayvanları şişirme gibi herhangi bir fizyolojik sorun yaratmamaktadır (Karakurt, 2004). Nohut geveninin iklim ve toprak şartlarına karşı gösterdiği geniş adaptasyon kabiliyeti, bitkinin yurdumuzun hemen hemen her bölgesinde yetişebilme imkânı vermektedir (Karakurt, 2004). Suni mera tesisinde karışımlarda kullanılacak iyi bir baklagil yem bitkisi olarak ve aynı zamanda da

bozulmuş merelerin iyileştirilmesine yönelik yapılacak ıslah çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir (Ünal, 2000; Ünal ve Fıncıoğlu, 2002).

Ökaryotik organizmaların genomlarının önemli bir kısmını tekrarlayan DNA elementleri olarak adlandırılan ve ardışık çok sayıda kopyası bulunan DNA dizileri teşkil etmektedir (Figuroa ve Bass, 2010; Garrido-Ramos, 2015; Yang ve Li, 2017). Genom içerisinde tekrarlanma kabiliyetine sahip tekrarlayan DNA elementleri, ökaryotik genomlarda proteinlere kodlanan DNA dizilerinden daha fazla miktarda bulunmaktadır. Bu elementlerin bir kısmı genom boyunca dağılmış bir özellik gösterirken bazıları da kromozom üzerinde belirli bir bölgeye lokalize olmaktadır (Adega vd., 2009; Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998). Tekrarlayan DNA elementleri genel olarak 2 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar ardışık tekrarlar ve dağınık tekrarlardır. Ardışık tekrarlar; satelit tekrarlar, minisatelit-mikrosatelit tekrarlar ve ribozomal DNA'dır. Dağınık tekrarlar ise DNA transpozonlar ve retrotranspozonlardır (Charlesworth vd., 1994; Kobayashi, 2006; Sharma ve Raina, 2005). Satelit tekrarlar içerisinde yüksek oranda art arda tekrarlanabilme özelliğine sahip dizilerdir. İkinci tekrar sınıfı ise minisatelitler ve mikrosatelitler olarak adlandırılan ardışık tekrar dizileridir. Bu ardışık sınıfı satelit tekrarlara göre genomda daha az tekrarlanabilme özelliğine sahiptir. Sonuncu ribozomal DNA ardışık tekrar dizisi ise ökaryot canlıların genomlarındaki en büyük ardışık tekrar dizisidir (Charlesworth vd., 1994; Kobayashi, 2006; Sharma ve Raina, 2005). Transpozonlar genom boyunca hareket ederek kromozom üzerinde dağılmış olarak bulunurken ardışık (tandem) tekrarlar genellikle kromozom sentromer, telomer, subtelomer ve interstitial (sentromer ve telomer arasındaki bölge) gibi bölgelerinde lokalize olarak bulunmaktadır. (Iglesias ve Moazed, 2017). Bu bölgeler içinden sentromerik tekrar dizileri sentromer evriminin anlaşılması yönünden araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Çünkü sentromer hücre bölünmesi sırasında kromozomların doğru bir şekilde ayrılmasını sağlayan bütün ökaryotlarda korunmuş önemli bir yapıdır (Jiang vd., 2003). Sentromer fonksiyonel olarak korunmuş olmasına rağmen evrimsel olarak sentromerik DNA tekrar dizileri değişiklik gösterdiğinden dinamik bir yapıya sahiptir. Sentromerlerin benzersiz diziler, transpozonlar veya yüksek oranda tekrarlanan dizilerden oluşabilecekleri ve genetik olarak birincil DNA dizi ile belirlenebilecekleri veya çeşitli şekillerde CSE4 (tomurcuklanan mayalar), CENP-A (hayvanlar ve bazı mantarlar) olarak bilinen sentromere özgü histon H3 varyantını (CENH3, bitkiler ve diğer birçok ökaryot) içeren nükleozomların lokalizasyonu ile

epigenetik olarak korunabilecekleri gösterilmiştir. Bu yapının anlaşılır hale gelmesi için ökaryotlarda sentromer dinamiğini değişmesine katkı sağlayan tekrar dizilerine ayrıca odaklanması gerekmektedir. (Tek vd., 2011).

Tekrarlayan DNA elementlerinin genomdaki miktarı, dağılımı ve işlevleri genom yapısının daha iyi anlaşılabilmesinde önemli ipuçları vermektedir (Richards ve Ausubel 1988, Tek vd., 2011). Özellikle nohut geveni sentromerik bölgelerinin tanımlanması poliploid orijini hakkında ve poliploidiyi oluşturan genomların dinamikleri hakkında ciddi ipuçları verebilecektir. Son yıllarda, sentromer modifikasyonu sayesinde bitki ıslah çalışmalarında haploid bitki üretiminin son derece etkili ve her bitki de kullanılma potansiyeline işaret edilmektedir (Tek vd. 2015). Rekombinant DNA tekniklerinin entegre edildiği nohut geveni bitkisinin genomu içerisindeki sentromerik DNA dizilerinin klonlanması ve bunların genom içindeki dağılım ve organizasyonu ayrıntılı olarak henüz tespit edilememiştir. Bu amaçla yaptığımız çalışmada moleküler yöntemlerden olan PZR ve Southern hibridizasyon yöntemi kullanılarak, nohut geveni genomunda sentromerik DNA dizilerinin nükleotit dizi benzerliklerinin ve değişiklikleriyle birlikte genomdaki dağılımı gösterilmektedir. Yapılan analizler sonucunda, nohut geveni genomundaki 20-bç ardışık tekrar eden sentromerik DNA dizi monomerleri keşfedilmiş ve 5S, 45S ribozomal DNA'lar karakterize edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler nohut geveni sentromerik tekrar dizi çalışmaları için ciddi bir bilgi açığını gidererek sentromer yapı ve fonksiyonu için önemli bir referans teşkil edecektir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 *Astragalus* Cinsi ve Türü Olan *Astragalus cicer L.* Türünün Morfolojik, Fizyolojik ve Sitogenetik Özellikleri

Batı Asya'da en yüksek çeşitlilik oranına sahip ve çiçekli bitkiler arasında en çok türe sahip olan *Astragalus*, hızlı tür düzeyinde adaptif yayılımın ve dünya çapında çeşitli habitatlara adaptasyonun klasik bir örneğidir (Azani vd., 2019). Eski Dünya *Astragalus* türlerinin temel kromozom sayısı 8'dir ve yaklaşık %25'i poliploiddir. Avrasya ve Kuzey Afrika'ya özgü türlerin yaklaşık %80'i "Eski Dünya" tür grubunu oluşturur. *Astragalus* cinsinin sitolojisi hakkında nispeten az şey bilinmesine rağmen, mevcut kanıtlar temel kromozom sayısının Eski Dünya türlerinin birleştirici bir özelliği olduğunu göstermektedir (Spellenberg, 1976). Buna karşılık, çoğu Yeni Dünya türünün temel kromozom sayısı 7,8 11,12,13,14,15 arasında değişebilir ve esasen hiç poliploidi yoktur (Townsend, 1993; Sheidai vd., 2009). Bu cinse ait *Astragalus* türlerinin çok farklı kromozom sayılarına ve poliploidiye sahip olduğu temel kromozom sayılarından belirlenebilir. Geçmişten günümüze *Astragalus* türleri hakkında birçok karyolojik araştırma yapılmıştır. *Astragalus* türleri üzerinde yapılan önceki çalışmalara göre; *Astragalus sinicus L.* $2n = 2x = 16$, *Astragalus gossypinus* $2n = 2x = 14$, *Astragalus meyeri* $2n = 2x = 16$, *Astragalus denudatus*, *Astragalus dschuparensis*, *Astragalus microcephalus* ve *Astragalus hirticalyx* $2n = 4x = 32$, *Astragalus brachycalyx* ve *Astragalus compactus* $2n = 6x = 48$ somatik kromozom sayılarına sahiplerdir (Sheidai vd., 2009). Bu cinse ait *Astragalus* türlerinin çok farklı kromozom sayılarına ve poliploidiye sahip olduğu temel kromozom sayılarından belirlenebilir. Bununla ilgili yapılan literatür taramalarına göre, *Astragalus flavocreatus* $2n = 24$ (Davina ve Gomez-Sosa, 1993), *Astragalus chrysochlorus*, $2n = 16$ (Aytaç, 1997), *Astragalus clarianus Jeps.* $2n = 22$ (Liston, 1990), *Astragalus coriaceus Hemsl.*, $n = 11$, *Astragalus crotalariae* $2n = 24$ (Spellenberg, 1981), *Astragalus cruckshanksii* $2n = 28$ (Dopchiz vd., 1995) *Astragalus cicer L.* için üç farklı kromozom sayısına $2n = 32, 48, 64$ (Latterell ve Townsend, 1994; Pavlova ve Kozhuharov, 1993; Zhu ve Ohashi, 2000) ulaşılmıştır (Gedik vd., 2019).

Nohut gevenin morfolojik ve fizyolojik özellikleri bakımından diğer baklagil ve yem bitkileri ile karşılaştırıldığında pek çok avantajı bulunmaktadır (Le ve Carlyle, 2019). Araştırmacılar, baklagil ve buğdaygiller arasında besin maddesi, ışık ve suyun rekabet yönünden önemli olduğunu ve bu rekabetin dengeli devam ettirilebilmesinin ancak geliştirilmiş otlama metodu ve biçim uygulamaları, yeterli gübreleme ile mümkün olabileceğini açıklamışlardır (Hunt ve Wagner 1963). Yapılan araştırmalarda iyi bir kök gelişiminin, fide rekabet yeteneği ile çok yakından ilgili olduğunun ve uzun köklü bitkilerin hızlı gelişme özelliğine sahip olmaları halinde toprak yüzeyini çabuk kapladıklarını ve bunun rekabet açısından önemli bir özellik olduğunu belirtmektedir (Rhodes 1968). Yapılan bir çalışmada çimler ve forblarla aynı tarlaya ekilen *Astragalus cicer*'in biyokütlesinde artış çimler ve forblar biyokütlesinde ise azalma görülmüştür (Le ve Carlyle, 2019). Çimenlerin ve forbların biyokütlesi azalmanın *Astragalus cicer*'in genel bitki biyokütlesindeki artışın *Astragalus cicer*'in çimen ve forblarla rekabetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tarlalardaki *Astragalus cicer*'in hakimiyeti, çimenleri ve forbların güneş ışığına erişimlerini engelleyen bir gölgelik alan oluşturması bu gelişmeye bağlanabilir (Posler vd., 1993; Aniszewski, 2010). Mera bitkisi olarak uygun olan nohut geveninin, rizom oluşturması sebebiyle otlamaya çok dayanıklı olduğunu ifade etmektedir (Ünal ve Fıncioğlu, 2002). *Astragalus cicer*, yüksek protein içeriği, soğuğa toleransı nedeniyle bir yem mahsulü olarak değerlendirilir (Acharya vd., 2006). Yonca ve baklagiller bünyesinde selenyum içerirken nohut geveni selenyum içermediğinden hayvanlar için toksik etki oluşturmamaktadır (Karakurt, 2004). Böylece yonca ve baklagillerin aksine otlayan hayvanları şişirme gibi herhangi bir fizyolojik sorunu yaratmamaktadır (Acharya vd., 2006). Nohut geveninin iklim ve toprak şartlarına karşı gösterdiği geniş adaptasyon kabiliyeti, bitkinin kıraç, sulu şartlarda her bölgede yetiştirilebilme imkânı vermektedir (Karakurt, 2004). Suni mera tesisinde karışımlarda kullanılacak iyi bir baklagil yem bitkisi olarak ve aynı zamanda da bozulmuş meraların iyileştirilmesine yönelik yapılacak ıslah çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir (Ünal, 2000; Ünal ve Fıncioğlu, 2002).

2.1.1 Astragalus cinsi ve *Astragalus cicer* L. türünün taksonomisi ve coğrafi dağılımı

Astragalus 2.500'den fazla türle çiçekli bitkiler içerisinde en fazla üyesi bulunan taksonomik grubu oluşturur (Çizelge 2.1). Bu cins, esas olarak kuzey yarımkürede ve Güney Amerika'da dağıtılan küresel ölçekte adaptif yayılımın dikkate değer bir örneğidir. Astragalus'a ait en fazla tür, Güney-Batı Asya'nın İran-Türkiye bölgesinde (1000-1500 tür), Çin-Himalaya bölgesinde (500 tür), batı Kuzey Amerika'da (yaklaşık 400-450 tür) ve Güney Amerika'da And Dağlarında (yaklaşık 100 tür) dağılım göstermektedir. Ek olarak, birçok Astragalus türü, Kuzey ve Güney Amerika'nın Pasifik kıyıları boyunca Akdeniz iklim bölgelerinde ve Güney Avrupa ve Kuzey Afrika'da dağılmıştır (Osalo vd., 2003).

Türkiye, Astragalus türleri bakımından zengin bir ülkedir (Kıvçak 1956). Türkiye florasında Astragalus cinsi 202 endemik tür ve 475 taksonla temsil edilmektedir. Türkiye, cinsin önemli bir çeşitlendirme merkezidir. Bu türler en çok İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde yayılmıştır (İlçim ve Behçet, 2016). Kuraklığa ve soğuğa dayanıklı yapıya sahip çok yıllık bitkiler Türkiye'de genellikle taşlı yerlerde, steplerde, özellikle Orta ve Doğu Anadolu'da doğal olarak yetişmektedir (Karakurt, 2004). Erzurum'un Kuzeydoğusu ve İspir arası alanda 2200-2250 m yüksekliklerde *Astragalus cicer*, *A. densifolius* ve *A. coadunatus* gibi kuraklığa ve soğuğa dayanıklı yapıya sahip çok yıllık bitki türlerine rastlanmıştır (Kıvçak 1956).

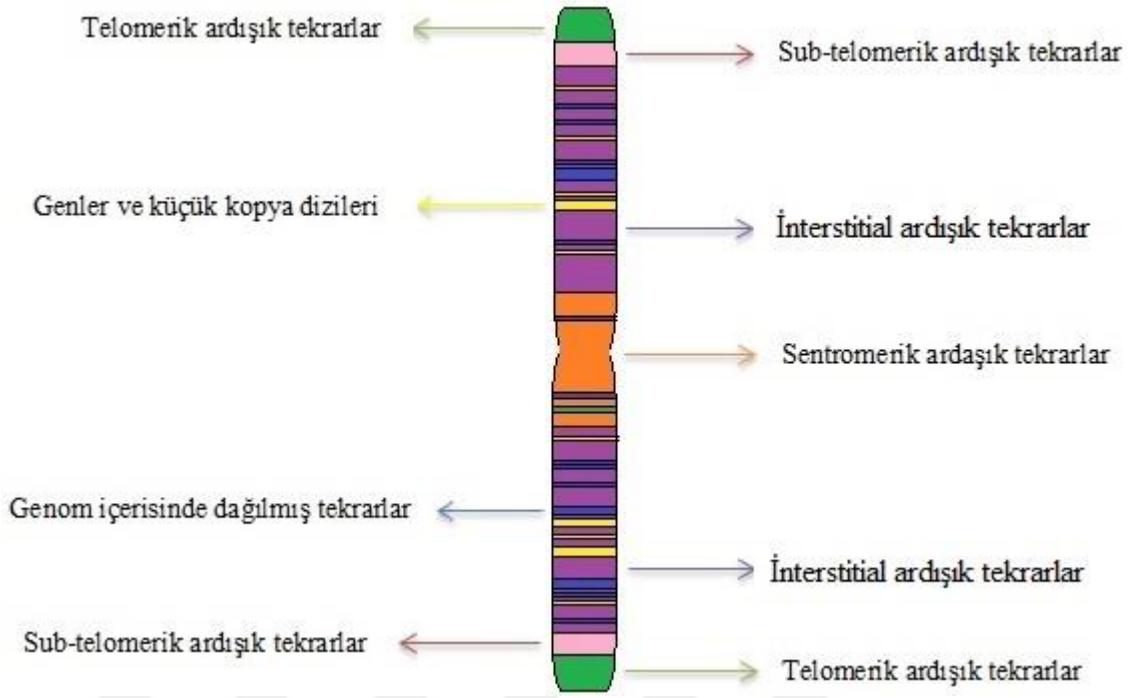
Çizelge 2.1. *Astragalus cicer* L. türünün taksonomik açıdan genel gösterimi (USDA PLANTS Database, 2011)

Sınıf	Bilimsel Adı
Kingdom (Alem)	<i>Plantae</i> (Bitkiler)
Subkingdom (Altalem)	<i>Tracheobionta</i> (Vascular plants) (Damarlı bitkiler)
Superdivision (Şube)	<i>Spermatophyta</i> (Seed plants) (Tohumlu bitkiler)
Division (Altşube)	<i>Magnoliophyta</i> (Flowering plants) (Çiçekli bitkiler)
Class (Sınıf)	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotyledons) (Çift çenekli bitkiler)
Subclass (Altsınıf)	Rosidae
Order (Takım)	<i>Fabales</i>
Family (Aile)	<i>Fabaceae / Leguminosae</i> (Pea Family) (Bezelye Ailesi)
Genus (Cins)	<i>Astragalus</i> L. (Milkvetch)
Species (Tür)	<i>Astragalus cicer</i> L. (Chickpea milkvetch)

Astragalus cinsinin bir üyesi olan *Astragalus cicer L.* nohut geveni olarak da bilinmektedir. Avrupa kıtasına özgü çok yıllık poliploid ($2n= 32, 48, 64$) bir baklagildir (Acharya vd., 2006; Latterell ve Townsend., 1994). Nohut geveninin doğal dağılımı, Finlandiya'dan Kuzey İspanya'ya ve doğu Rusya'ya kadar uzanan bir alanda serin ve nemli yerlerde yetişmektedir (Stroh vd., 1973; Townsend 1971). Nohut geveni; adaptasyon kabiliyeti yüksek, kışa dayanıklı, değişik toprak yapılarına uyumlu bir yem bitkisi olarak tanımlanmaktadır (Miller ve Hoveland 1995). Yıllık yağışı 350 mm'den daha az olan kurak bölge şartlarında başarı ile yetiştirilen nohut geveninin memleketimizin İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu gibi kurak bölge şartlarında yem ve mera bitkisi olarak kullanılabileceğini bildirmektedir (Bakır vd., 1980).

2.2 Tekrarlayan DNA Elementleri

Çoğu bitkinin çekirdek genomunun büyük bir kısmı, farklı tekrarlayan DNA elementlerinden oluşur. Bu dizi unsurlarını incelemek, farklı türler arasındaki genom boyutu varyasyonunun doğasını ve sonuçlarını anlamamız ve bitki genomlarının büyük ölçekli organizasyonunu ve evrimini incelemek için çok önemlidir. Tekrarlayan DNA dizilerinin aileleri, dizi homolojisi derecelerine, türler arasındaki dağılımlarına ve genomik ve fiziksel organizasyonlarına göre farklılaşmaktadır (Kubis vd., 1998, Harrison ve Heslop-Harrison, 1995). Daha büyük yapılı bitki genomlarında, tekrarlayan DNA dizileri DNA'nın en az %20'sini ve en çok %90'ından fazlasını temsil eder. Bireysel dizi sınıfları, toplam genomun yaklaşık %10'unu temsil edebilir, ancak özellikleri açısından büyük farklılıklar gösterir. Belirli bir dizi, bir taksonomik aile içindeki birçok türde mevcut olabilir veya esasen türe özgü olabilir. Bu tür sonuçlar, bazı tekrarlayan dizilerin hızla geliştiğini, diğerlerinin ise korunabileceğini göstermektedir (Ananthawat-Jónsson ve Heslop-Harrison, 1992).



Şekil 2.1. Bitki kromozomları üzerinde tekrarlayan dizilerin genel dağılımı. Farklı tipteki tekrarlayan dizilerin dağılımı, bitki kromozomu üzerinde farklı renklerle renklendirilerek şematik olarak temsil edilmektedir. Turuncu renk, sentromerik ardışık tekrarları; yeşil renk, telomerik ardışık tekrarları; pembe renk, sub-telomerik ardışık tekrarları; mor renk, interstitial ardışık tekrarları; mavi renk, genom içerisinde dağılmış tekrarları; sarı renk ise genler ve düşük kopya dizileri temsil etmektedir (Beridze T., 1986, Mehrotra ve Goyal, 2014 makalesinden uyarlanmıştır).

Tekrarlayan DNA, ökaryotik genomların önemli bir organizasyon bileşenini temsil eder ve transpoze olabilen elemanlar (TE) gibi genom boyunca dağılmış dizileri ve satelit DNA (satDNA) gibi art arda tekrarlanan dizileri içerir (Charlesworth vd., 1994; Plohl vd., 2012). Tekrarlayan DNA elementleri, genomik organizasyonları ve kromozomlar üzerindeki lokalizasyonları ile ayırt edilen iki ana gruba ayrılabilir (Kubis vd., 1998). Çizelge 2.3'te tekrarlayan DNA dizilerinin genel sınıflandırması sunulmuştur. Ardışık (tandem) tekrarlar genellikle kromozomun sentromer, telomer, subtelomer ve interstitial (sentromer ve telomer arasındaki bölge) gibi bölgelerinde lokalize olurken, transpozonlar genom boyunca hareket ederek kromozom üzerinde dağılmış olarak bulunan elementlerdir (Iglesias ve Moazed, 2017).

Çizelge 2.2. Tekrarlayan DNA elementlerinin genel sınıflandırması

Tekrarlayan DNA Elementleri	
Ardışık Tekrarlar	Dağınık Tekrarlar
i. Satelit DNA	i. Transpozonlar
- Minisatelit tekrarlar	- LTR Retrotraspozonlar
- Mikrosatelit tekrarlar	- DNA Transpozonlar
ii. Ribozomlar DNA (rDNA)	

Tekrarlayan DNA dizileri, ökaryotik genomların önemli bir bileşenidir ve genom boyutunun yaklaşık olarak en az %20'sini en fazla %90'lık bir bölümünü oluşturmaktadırlar (Harrison ve Heslop Harrison, 1995; Mehrotra ve Goyal, 2014). Yapılan çalışmalarda tekrarlayan DNA dizilerinin genomu kapsayan yüzde oranlarına örnek verilecek olursa (Çizelge 2.3), toplam genom büyüklüğü 3,2 GB insan genomunun %50'sini (International Human Genome Consortium, 2001), toplam genom büyüklüğü 175 MB olan *Drosophila melanogaster* dişi bireylerinin %33,7'sini erkek bireylerinin %57'sini (Bennett vd., 2003; Celniker vd., 2002), toplam genom büyüklüğü 466 MB olan *Oryza sativa*'nın (indica) %42'sini (Yu vd., 2002), toplam genom büyüklüğü 420 MB olan *Oryza sativa*'nın (Japonica) %45'ini (Goff vd., 2002), toplam genom büyüklüğü 2,5 GB olan *Zea mays*'in %77'sini (Meyers vd., 2001), toplam genom büyüklüğü 1,1 GB *Glycine max*'ın %59'unu (Schmutz vd., 2010), toplam genom büyüklüğü 2,3 GB olan kamelyanın (*Camellia japonica*) %73'ünü (Heitkam vd., 2015), haploid genom büyüklüğü 5,1 GB olan arpanın (*Hordeum vulgare L.*) %84'ünü (Mayer vd., 2012), toplam genom büyüklüğü dişi bireylerinde 5,73 GB erkek bireylerinde 5,85 olan *Silene latifolia* genomun %60'nı (Macas vd., 2011) toplam genom büyüklüğü 1,4 GB zeytin (*Olea europea L.*) genomunun yaklaşık %72'ini (Barghini vd., 2014), toplam genom boyutu yaklaşık 3,59 MB olan *Vallisneria spinulosa*'nın %60'ını (Feng vd., 2017), toplam genom büyüklüğü 3,81 GB olan *Luzula elegans* genomunun %61'ini (Heckmann vd., 2013), toplam genom büyüklüğü 167.59 MB olan *Musa acuminata*'nın %35,43'ünü, toplam genom büyüklüğü 179,99 MB olan *Musa itinerans*'ın %38,95'ini (Wu vd., 2016), *Fabaceae* türlerinde %55 ile 83'lük kısmını (Macas vd., 2015) tekrarlayan DNA dizileri oluşturmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak genom içerisinde tekrar elementlerinin protein kodlayan DNA elementlerinden daha fazla yer aldığı sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 2.3. Bazı organizma türlerinde tekrarlayan DNA elementlerinin genom içerisindeki kapsam yüzdesi

Organizmalar	Genom Boyutu	Tekrar Elementlerini Genomda Yer Alma Yüzdesi (%)	Referans
Homo sapiens	3,2 GB	%50	International Human Genome Consortium, 2001
<i>Drosophila melanogaster</i>	175 MB	%33,7 dişi %57 erkek	Bennett vd., 2003; Celniker vd., 2002
<i>Oryza sativa (indica)</i>	466 MB	%42	Yu vd., 2002
<i>Oryza sativa (Japonica)</i>	420 MB	%45	Goff vd., 2002
<i>Zea mays</i>	2,5 GB	%77	Meyers vd., 2001
<i>Glycine max</i>	1,1 GB	%59	Schmutz vd., 2010
<i>Camellia japonica</i>	2,3 GB	%73	Heitkam vd., 2015
<i>Hordeum vulgare L.</i>	5,1 GB	%84	Mayer vd., 2012
<i>Silene latifolia</i> (dişi)	5,73 GB	%60	Macas vd., 2011
<i>Silene latifolia</i> (Erkek)	5,85 GB	%60	Macas vd., 2011
<i>Olea europea L.</i>	1,4 GB	%72	Barghini vd., 2014
<i>Vallisneria spinulosa</i>	3,59 MB	%60	Feng vd., 2017
<i>Luzula elegans</i>	3,81 GB	%61	Heckmann vd., 2013
<i>Musa acuminata</i>	167,59 MB	%38,95	Wu vd., 2016
<i>Fabaceae</i> türleri	-	%55-83	Macas vd., 2015

Genetiğin ilerlemesiyle birlikte, çeşitli tipte moleküler markörlerin geliştirilmesi, polimorfizmin doğrudan DNA düzeyinde tanımlanmasına izin vermiş ve büyük ölçüde fenotipik analizin sınırlamalarının üstesinden gelmiştir. (Alzate-Marin vd., 2005). Mikrosatelitler veya basit dizi tekrarları (SSR'ler) ve minisatelitler veya değişken numaralı ardışık tekrarları (VNTR'ler) gibi eş-baskın markörler, heterozigot bir bireyin her iki alelinin tespiti, yüksek polimorfik bilgi içerikleri (PIC'ler), yüksek tekrarlanabilirlik, tekniğin hızı ve basitliği, düşük işletim maliyeti ve çözme gücü gibi çeşitli avantajlar sunmaktadırlar (Oliveira vd., 2006).

2.2.1 Ardışık tekrarlar

Çoğu yüksek yapılı bitki genomu, yüksek oranda tekrarlayan DNA dizilerini içermektedir. Bu nedenle tekrarlayan DNA dizileri, bitki kromozom yapısına önemli bir katkıda bulunmaktadır. Türler arasındaki toplam DNA içeriğindeki varyasyon, çoğunlukla tekrarlanan DNA içeriğindeki varyasyondan kaynaklanmaktadır (Flavell vd., 1986). Ardışık tekrarlar bir veya birkaç tanımlanmış kromozomal bölgede tekdüze bir şekilde birbirine bitişik olarak sıralanmış kodlanmayan DNA dizileri içeren birimlerdir (Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012). Ardışık tekrarlar kendi içinde; satelit tekrarlar, minisatelit, mikrosatelitler ve ribozomal DNA (rDNA) elementleri olarak sınıflanmaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Ardışık tekrarlayan DNA elementlerinin sınıflandırılması ve yaklaşık monomer dizi uzunlukları

Ardışık Tekrar Dizisi	Tekrar Uzunluğu	Açıklama	Referans
Mikrosatelit	~2-8	Trinükleotit düzensizliği	Charlesworth vd., 1994; Slamovits ve Rossi, 2002;
Minisatelit	~10-60	Telomerik Tekrarlar	Ogunbayo, 2012; Shapiro ve Sternberg, 2005
Satelit	~100-1000	Sentromerik tekrarlar	Ogunbayo, 2012; Shapiro ve Sternberg, 2005
Ribozomal DNA (rDNA)	~10.000 bç ve üzeri	Ribozom RNA gen tekrarı	Harrison-Heslop-Harrison, 1995; Shapiro ve Sternberg, 2005

2.2.1.1 Mikrosatelit tekrarlar

Mikrosatelitler, şu ana kadar incelenen her organizmanın genomu boyunca dağılmış, 1 kb'dan küçük dizilerde bulunan 9 bazdan küçük ardışık tekrarlardır. Aynı zamanda basit dizi tekrarları (SSR'ler) veya kısa ardışık tekrarlar (STR'ler) olarak da bilinmektedir (Richard vd., 2008). Belirli bir mikrosatelit lokusundaki tekrar eden birimlerin sayısı genel olarak 5 ile 40 arasında değişmektedir, ancak daha uzun tekrar serileri şeklinde de bulunabilmektedir. Mikrosatelitler, düzenleyici diziler dahil hem protein kodlayan hem de kodlamayan bölgelerde bulunabilmektedir (Legendre vd., 2007; López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012).

Genom içindeki mikrosatelit dizilerinin oranı genellikle omurgasız ve mantarlardan, bitkiler ve omurgalılara doğru artış eğilimi göstermektedir. Örneğin, *Caenorhabditis elegans* ve *Saccharomyces cerevisiae* genomundaki mikrosatelit oranı tahminen sırasıyla %0,21 ve %0,30 iken, bitkilerdeki bu oran *Z. mays* için %0,37 ve *Arabidopsis thaliana* için %0,85 oranında değişmektedir (Toth vd., 2000; Morgante vd., 2002) Balık türleri olan *Fugu rubripes* ve *Tetraodon nigroviridis* genomundaki mikrosatelit oranı tahminen sırasıyla %2,12 ve %3,21'dir ((Elgar vd., 1999; Crollius vd., 2000).

Mikrosatelitlerin karakteristik bir mutasyon davranışı vardır. Mutasyon oranları, genomun diğer bölümlerindeki ortalama mutasyon oranlarından 10 ila 100.000 kat daha fazladır (Gemayel vd., 2010). Mikrosatelit dizilerdeki mutasyonlar sadece nokta mutasyonlarından değil, daha çok tekrar eden birimlerin sayısındaki varyasyondan kaynaklanmaktadır. Yani, bir popülasyondaki farklı bireyler, her mikrosatelit lokusunda tekrar sayısı bakımından farklılık göstermektedir ve bu nedenle, mikrosatelit lokusları tipik olarak oldukça polimorfizm göstermektedir (Morgante vd., 2002).

Mikrosatelitler, doğal olarak kararsızdır, ancak mutasyon oranları, tekrar eden birimlerin sayısına, tekrar saflığına ve tekrar biriminin uzunluğuna bağlı olarak farklı mikrosatelitler arasında değişiklik gösterir (Legendre vd., 2007). Bu değişkenlikte en önemli faktör, tekrarlayan birimlerin sayısıdır. Daha fazla tekrarlayan birim, daha kararsız bir durum gösterir, çünkü muhtemelen daha uzun lokusların DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşme olasılığı çok daha yüksektir. Ayrıca, daha uzun lokuslar arasındaki rekombinasyon, daha kısa lokuslar arasındaki rekombinasyona göre daha sık meydana gelmektedir. Son olarak, daha uzun tekrar birimleri (örneğin tetranükleotid tekrarları) içeren mikrosatelit dizileri, daha kısa tekrar birimlerinden (örneğin dinükleotid tekrarları) daha hızlı evrimleşmektedir. Genel olarak, mikrosatelitlerin mutasyonel süreci, lokuslar ve aleller arasındaki farklılıklarla birlikte karmaşık ve heterojen hal göstermektedir (Ellegren, 2004).

Yukarıda açıklanan mikrosatelitlerin özellikleri ve bunların evrimleri, popülasyonlar içindeki genetik değişkenlik seviyelerinin tahmini için önemli bir kaynak oluşturarak aralarındaki genetik ilişkiler üzerinde analizlerin yapılmasını sağlamaktadır. Bu veriler, popülasyonlarda genetik çeşitliliği ve akrabalık derecesini tahmin etmek için oldukça önem taşımaktadır. Mikrosatelitlerin lokus başına allel sayısı ve allel frekansları bize

popülasyon verileri hakkında bilgi vermektedir. Bu verilerle, popülasyonlar arasındaki veya bireyler arasındaki genetik mesafeler tahmin edilebilmekte ve her popülasyon için filogenetik ve yapısal analizler yapılabilmektedir (López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012).

2.2.1.2 Minisatelit tekrarlar

Minisatelitler, 9 ve üzeri nükleotit uzunluğunda olan birimlerin ardışık tekrarlanmasından oluşmaktadır. Mikro ve minisatelit boyutları, benzer moleküler mekanizmalarla farklılaşır, ancak bunlar yalnızca tekrar eden birim boyutlarına değil, aynı zamanda ökaryotik genomlardaki dağılımlarına ve potansiyel işlevlerine göre 2 farklı ardışık tekrar türü olarak sınıflandırılmaktadır. Minisatelit DNA, insan, *C. elegans* ve *T. nigroviridis* kromozomlarının alt telomerik bölgelerinde bulunurken, *A. thaliana*'da bu ardışık tekrarlar perisentromerik bölgede kümelenme eğilimindedir (Vergnaud ve Denoeud, 2000; Crollius vd., 2000). *S. cerevisiae* kromozomlarında ise hiçbir belirgin sentromerik veya subtelomerik dağılım gözlenmemiştir (Richard ve Dujon, 2006). *Candida glabrata* mayası ve *Aspergillus fumigatus* mantarı üzerinde yapılan son çalışmalar, hücre duvarı genlerinde ve potansiyel hücre yüzeyi proteinlerinde bulunan minisatelitleri ortaya çıkardı ve bu patojenlerde çeşitlilik oluşturarak onları patojenitede rol oynamak için iyi adaylar haline getirdiği tespit edilmiştir (Levdansky vd., 2007). *S. cerevisiae*'de tri ve heksanükleotid mikro uydu tekrarları, genellikle transkripsiyon faktörlerini ve gen ifadesinin düzenleyicilerini kodlayan genlerin açık okuma çerçevelerinde (ORF'lerinde) bulunmaktadır (Levdansky vd., 2007; Young vd., 2000).

2.2.1.3 Satelit DNA (satDNA) tekrarları

Satelit DNA (satDNA) olarak adlandırılan, yüksek miktarda, art arda düzenlenmiş DNA tekrarları içeren diziler karmaşık ökaryotik genomlarda oldukça yaygındır. Mikro ve minisatelit tekrarların aksine, monomerleri on ila binlerce nükleotit uzunluğundadır ve sıklıkla 100 MB kadar uzanan ardışık diziler oluşturur (Charlesworth vd., 1994; Schmidt ve Harrison, 1998; Kubis vd., 1998; Macas vd., 2002). Transpoze olabilen elemanlarla birlikte satDNA'lar, türler arası genom boyutundaki farklılıklarda önemli

ölçüde katkıda bulunur ayrıca bazı türlerin toplam DNA'sının %50'sinden fazlasını oluşturur (López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012).

SatDNA'lar, sentromer ve telomerler gibi hayati yapıların bir parçası olan yapıcı heterokromatin bölgeleri oluşturan perisentromerik, alt telomerik ve intersititial bölgeler gibi kromozomlarda çeşitli yerlerde bulunabilmektedir (Charlesworth vd., 1994; López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012; Brajkovic vd., 2012; Pavlek vd., 2015; Louzada vd., 2020). Bununla birlikte, satDNA konumu heterokromatin bölgeler ile sınırlı değildir. Bazı satDNA'lar farklı türlerde ökromatik bölgeler boyunca dağınık bir şekilde bulunabilmektedir (Kuhn vd., 2012; Feliciello vd., 2015). Yapılan araştırmalar sonucunda çok sayıda kanıt, satDNA'ların sentromer işlevinde, heterokromatin oluşumu ve korunmasında ayrıca kromozom eşleşmesinde anahtar rollere sahip olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, kritik kromozomal yapılarla ilişkilerine rağmen, satDNA aileleri, yakından ilişkili türler arasında bile şaşırtıcı bir dizi varyasyonu sergileyebilir. Bu varyasyonlar, son derece dinamik davranışlarından kaynaklanır ve kısa evrim dönemlerinde dizi kompozisyonunda ve dizi boyutunda hızlı değişikliklere yol açmaktadır ve bu da türleşmeyle sonuçlanabilmektedir (López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012).

2.2.1.4 Ribozomal DNA (rDNA) tekrarları

Tüm ökaryotlar genomlarında ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri, ribozomal RNA (rRNA) bölgeleri ve daha hızlı gelişen intergenik boşluk bölgeleri (intergenic spacers, IGS) olmak üzere evrimsel olarak korunmuş art arda düzenlenmiş tekrarlanan diziler bulunmaktadır. Genomdaki yüksek kopya gösterimi ve değişken IGS ile bağlantılı korunmuş kodlama bölgelerinin özel düzenlemesi nedeniyle, rDNA, farklı taksonomik gruplarda tekrarlayan dizilerin moleküler evriminin araştırılması ve filogenetik çalışmalar için önemli bir rol üstlenmiştir (King vd., 1993; Saini ve Jawali, 2009). Bitkilerde iki rDNA sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflardan ilki 18S, 5.8S ve 25S (veya 26S) rRNA kodlama bölgelerinden oluşan 45S rDNA (veya 35S), diğerini ise 5S rRNA kodlama bölgesinden oluşmuş 5S rDNA tekrarları oluşturmaktadır. 5S rDNA ve 45S rDNA'yı temsil eden genomik lokuslar çoğunlukla baştan sona ardışık tekrarlar olarak düzenlenmektedirler ve bu tekrarlar transkripsiyon yapmayan ara veya bağlayıcı bölgeler

ile birbirinden ayrılarak, kromozomların bir veya daha fazla bölgesinde lokalize olabilmektedirler. (Hemleben vd., 2004; Tucker vd., 2010; Matyášek vd., 2016).

45S rDNA dizileri RNA polimeraz I tarafından, 5S rDNA dizileri ise RNA polimeraz III tarafından transkripsiyona uğramaktadır. Ribozomal DNA bölgeleri (rDNA), bitki genomlarının yaklaşık %10'nuna tekabül etmektedir. Uzun zamandır filogenetik, taksonomik ve evrimsel çalışmalarda sitolojik markör olarak kullanılmaktadır. (Volkov vd., 2017).

2.2.2 Dağınık tekrarlar

Dağınık tekrarlar, genomdaki tekrarlayan DNA dizilerinin başka bir sınıfıdır. Genomun yaklaşık %35-45'ini oluşturdukları bildirilmiştir (Batzer vd., 2002; Richard vd., 2008). Yer değiştirebilir öğeler veya mobil elementler, 1940'larda, mısırdaki değişken lokusların kökeni ve davranışı üzerine yaptığı araştırmalar sırasında McClintock tarafından keşfedilmiştir (McClintock, 1950). Bu keşfin ardından, transpoze olabilen elementlerin retrotranspozon ve DNA transpozonlar olarak iki ana sınıfa ayrılmıştır (Çizelge 2.5). Bununla birlikte, transpozonun karakteristikleri, genomun diğer yerlerinde çoğalma yeteneklerinde gösterilmiştir, bazı bilim adamlarının, kopyalarında kullanılan aktarım modu ve yerleştirme mekanizmalarının değişiklik göstermesinden dolayı transpozonların farklı sınıflandırması gerektiği önerilmiştir (Saha vd., 2008a; Vukich vd., 2009).

Çizelge 2.5. Dağınık tekrarlayan DNA elementlerinin sınıflandırılması

Dağınık Tekrarlar	
DNA Transpozonlar i. TIR ii. MITE	Retrotranspozonlar i. LTR Retrotraspozonlar - Gypsy - Copia - LARD - TRIM ii. LTR olmayan retrotranspozonlar - LINEs - SINEs

Retrotranspozonlar ayrıca uzun terminal tekrarları (LTR'ler), retrotranspozonlar ve LTR olmayan retrotranspozonlar olarak sınıflandırılmıştır (Havecker vd., 2004; Ohshima vd., 2005). LTR retrotranspozonu, Gypsy, Copia, LARD ve TRIM'i içermektedir. LTR retrotranspozonu, RNA ara maddeleri yoluyla kopyalanmakta ve mobilize edilmektedir. Ayrıca sırasıyla eksi-sarmallı ve artı-sarmallı hazırlama bölgelerini içeren 5 've 3' transkribe olmayan bölgeleri (UTR'ler) içeren bazı ortak karakteristik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Saha vd., 2008b). Gypsy, Copia, büyük retrotranspozon türevleri (LARD'lar) ve minyatür terminal tekrarlı retrotranspozon (TRIM'ler), uzun terminal tekrarları (LTR'ler) ve dahili açık okuma çerçeveleri (ORF'ler) ile karakterize edilen LTR retrotranspozon olarak karakterize edilmektedirler (Kalendar vd., 2004; Vukich vd., 2009). Uzun dağılık nükleer elementler (LINE'lar) ve kısa dağılık nükleer elementler (SINE'ler), sırasıyla polimeraz II (pol II) ve polimeraz III (pol III) tarafından kopyalanan LTR olmayan retrotranspozonlar (uzun olmayan terminal tekrarları) olarak karakterize edilmektedirler (Saha vd., 2008a).

DNA transpozonları, terminal ters çevrilmiş tekrar (TIR), minyatür-ters çevrilmiş tekrar elementi (MITE) sınıflandırılmıştır. Bu elementler, onları birbirinden ayıran çeşitli karakteristik özelliklere sahiptir. Terminal ters çevrilmiş tekrar (TIR), transpozazı kodlayan açık okuma çerçevesi ile karakterize edilir. Minyatür-tersine çevrilmiş tekrar elemanı (MITE), kodlamayan dizinin varlığı ile kodlamama kapasitesi ile karakterize edilir, bu nedenle otonom elemanlar tarafından trans olarak kodlanmış transpozaza dayanmalıdır (Saha vd., 2008a).

2.3 Sentromer ve Sentrometik Tekrar Dizileri

Kromozomların üzerinde yer alan sentromer ökaryot hücre bölünmesinde ve kromozom fonksiyonunun anlaşılmasında önemli bir role sahiptir. Sentromerler, ökaryotlarda mitoz ve mayoz sırasında kutuplara doğru hareketin gerçekleşmesinde görev alan özel kromozom bölgeleridir ve hücre bölünmesinde kromozomun doğru bir şekilde ayrışmasını sağlamaktadırlar (Henikoff vd., 2001). Genel olarak, bir sentromer, her metafaz kromozomunun heterokromatini içinde belirgin bir daralma göstermektedir. Mikrotübül boyunca kromozomların bağlanması ve hareketine, hücre bölünmesi sırasında sentromerlerde oluşan protein yapıdaki kinetokorlar aracılık etmektedir

(Talbert vd., 2002). Kinetekorlar, motor proteinler ile etkileşimde bulunarak kromozomların üretilmesi ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Yu vd., 2000).

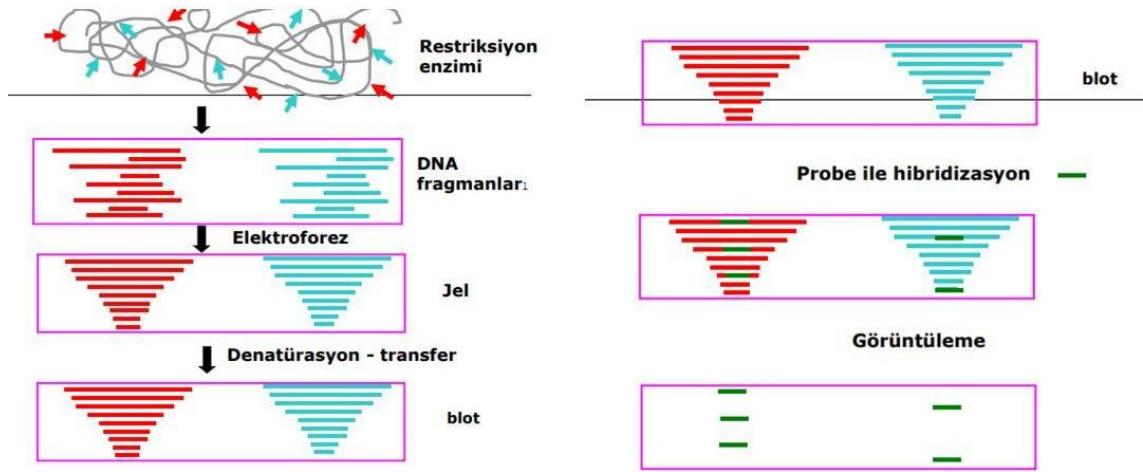
Bitkilerde ve hayvanlarda sentromerlerin çoğunluğunun altında yatan temel DNA bileşenleri, kromatin immünopresipitasyon (ChIP) verileriyle de desteklenen satelit tekrarlarıdır (Nagaki vd., 2003, Zhong, 2002, Lee, 2005). Sentromer yapısı ve işlevi kromozom ayırımında korunmuş olmasına rağmen, bu bölgedeki DNA dizileri paradoksal olarak değişkendir (Henikoff vd, 2001; Talbert vd., 2004; Plohl vd., 2014). Sentromerlerin birincil DNA dizileri, çeşitli model organizmalar arasında ayırt edilebilir bir korumaya sahip değildir ve yakından ilişkili türler arasında önemli ölçüde ayrılabilir (Willard, 1998). Örneğin *Arabidopsis thaliana*'da, sentromerin birincil bileşenleri olan 180 bç satelitler, akrabaları *A. griffithiana*'da ($2n = 2x = 32$) 164 bç ile 178 bç arasında ve *A. pumila*'da ($2n = 2x = 32$) 167 bç ile 178 bç arasında değişiklik göstermektedir. Sentromerik DNA'nın şaşırtıcı çeşitliliği ve hızlı evrimi diğer bitkilerde de tespit edilmiştir (Xia vd., 1993; Page vd., 2001; Heslop-Harrison vd., 2003; Lee vd., 2005). Çeltikte, baskın bileşenler olarak, toplam CentO (155 bç uydu tekrarı) ve CRR (Centromeric Retrotransposon of Rice) miktarı farklı kromozomlar arasında 60 kb ile 2 Mb arasında değişiklik göstermektedir. CentO, 155 bç ve 164 bç uzunluklarında iki farklı alt aileye ayrılabilir ve bu ilk ailede tek bir 10 bç'lik eklemenin sonucu olarak temelde farklılık gösterir. Her bir alt ailede, konsensüs dizilerine göre tek baz değişiklikleri, eklemeler veya çıkarmalar içeren birçok varyant bulunmaktadır (Cheng vd., 2002). Aşağıda verilen çizelgede (Çizelge 2.6) bazı organizma türlerinde keşfedilen sentromerik tekrarlayan DNA dizileri yer verilmektedir.

Çizelge 2.6. Temsili organizmalarda sentromerik tekrarlayan DNA elementleri (Wang vd., 2009 referans alınarak oluşturulmuştur)

Organizma	Tekrarlayan DNA: Boyut ve Açıklama	Referans
<i>Arabidopsis arenosa</i>	166–179 bç ardışık tekrar	Kamm vd., 1995
<i>Arabidopsis thaliana</i>	180 bç ardışık tekrar	Murata vd., 1994
<i>Arabidopsis halleri</i>	180 bç ardışık tekrar	Heslop-Harrison vd., 2003
<i>Arabidopsis suecica</i>	178 bç ardışık tekrar	Heslop-Harrison vd., 2003
<i>Brassica napus</i>	176 bç ardışık tekrar	Xia vd., 1993
<i>Brassica rapa</i>	176 bç ardışık tekrar	Koo vd., 2011
<i>Brassica campestris</i>	178 bç ardışık tekrar	Harrison and Heslop-Harrison, 1995
<i>Brassica oleracea</i>	171 bç ardışık tekrar	Harrison and Heslop-Harrison, 1995
<i>Oryza sativa</i>	CentO: 155 bç ardışık tekrar;	Cheng vd., 2002; Wu vd., 2004; Zhang vd., 2004
<i>Oryza rhizomatis</i>	CentO-C1: 126 bç ve CentO-C2: 366 bç	Lee vd., 2005
<i>Zea mays</i>	CentC: 156 bç ardışık tekrar; Cent4: 740 bç ardışık tekrarı kromozom 4'e özgü	Ananiev vd., 1998; Nagaki vd., 2003; Page vd., 2001; Alfenito vd., 1993
<i>Glycine max</i>	GmCent-1 (92 bç) ve GmCent-4 (411 bç) sentromere özgü ardışık tekrar	Tek vd., 2010
<i>Astragalus sinicus</i>	20 bç ardışık tekrar	Tek, 2011
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sentromere özgü ardışık tekrarlar (5-12 bç) 5-mer 10-mer	Talbert vd., 2018

2.4 Southern Hibridizasyon

Southern hibridizasyon, 1975 yılında Ed Southern tarafından geliştirilen bir tekniktir. İsmi yaratıcısı Ed Southern'ın soy isminden alan bu teknik moleküler genetikte kullanılan ilk hibridizasyon yöntemidir. Bu yöntemde ilk olarak izole edilen DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilmekte ve belirli sayı ve uzunlukta DNA fragmantleri oluşturulmaktadır. Elde edilen DNA fragmantleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılarak önce yüksek pH ile denatüre edilip ardında blot yöntemi ile naylon veya nitroselüloz filtre üzerine geçirilmektedir. İşaretli denatüre edilmiş ve incelenecek bölgeye özgü prob hazırlanmaktadır ve filte üzerinde tutulan fragmantler ile uygun koşullar sağlanarak hibridize edilmektedir. Bu işlemden sonra filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilmektedir. Prob yalnızca kendisine tümleyici bazları içeren DNA fragmenti ile hibridize olarak otoradyogram sonucu bu bandın üzerinde gözlenebilecektir (Thieman ve Palladino, 2013).



Şekil 2.2. Southern Hibridizasyon tekniğinin genel mekanizması (Thieman ve Palladino, 2013).

Southern hibridizasyon tekniği moleküler karakterizasyon çalışmaları için bilim insanlarının sıkça kullandığı güvenilir bir tekniktir. Geniş bir kullanım çerçevesine sahip olan bu analiz yöntemi ile transgenlerin kopya sayısı, ekleme lokuslarının sayısı, ekleme bölgesini çevreleyen komşu bitki genomik DNA dizileri, transformasyon plazmit omurga dizinin varlığı veya yokluğu ve eklenen DNA'nın sağlamlığı hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu tahlillerin kombinasyonu, olay karakterizasyonu ve seçimi için sağlam bir çerçeve oluşturmaktadır (Zastrow- Hayes vd., 2015)

2.5 Tez Çalışmasının Amaç ve Hedefleri

Bu tez çalışmasında; nohut geveni (*Atragalus cicer L.*) bitkisinin sentromer bölgesinde bulunan DNA tekrar dizilerinin anlaşılması ve detaylı analizine yönelik klon temelli tekrar dizilerinin tanımlanması, ribozomal DNA'ların (5S ve 45S) varlığının tespit edilmesi, dizileme sonucunda yapılan biyoinformatik analiz ile belirlenmesi ve sentromerik satelit tekrarların polimeraz zincir reaksiyonu ve Southern Hibridizasyon tekniklerinin entegre edilerek karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu yöntemler ile nohut geveni genomundaki sentromerik DNA dizilerinin nükleotid dizi özellikleri, olası benzerlikleri ve değişkenlikleriyle birlikte genomdaki organizasyon ve dağılımın gösterilmesi amaçlanmıştır. Nohut geveni sentromerik DNA dizisine özgü primerler tasarlanmış ve PZR uygun parametreler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ve transformasyon sonucunda oluşan rekombinant DNA klonların plazmid

izolasyonu gerçekleştirilmiş ve plazmid içinde insert DNA fragmentinin olup olmadığının saptanması için transforme olmuş tek koloni hücreler seçilerek koloni PZR gerçekleştirilmiştir. Insert DNA fragmentleri dizilemeye gönderilmiştir ve dizi analizi sonucu biyoinformatik yöntemler ile nohut geveni sentromerinde bulunan satelit tekrarlar tanımlanmıştır. Ayrıca Southern Hibridizasyon tekniği ile nohut geveninin sentromerik tekrarlayan DNA dizilerinin ve Ribozomal DNA'larının (5S ve 45S) karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tezimizin ıktıları, nohut geveninin sentromerik yapısını oluşturan ardışık DNA tekrarlarına ve sentromerin dinamiğine ışık tutacaktır. Böylece nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) sentromerine özgü DNA tekrar dizisi çalışmaları için ciddi bir bilgi açığını kapatacaktır. Ayrıca diğer bitki veya hayvan sentromerik tekrarlayan DNA dizileri ile karşılaştırılması yapılarak tüm ökaryotlarda sentromer dinamiğinin anlaşılması için önemli bir referans teşkil edecektir.

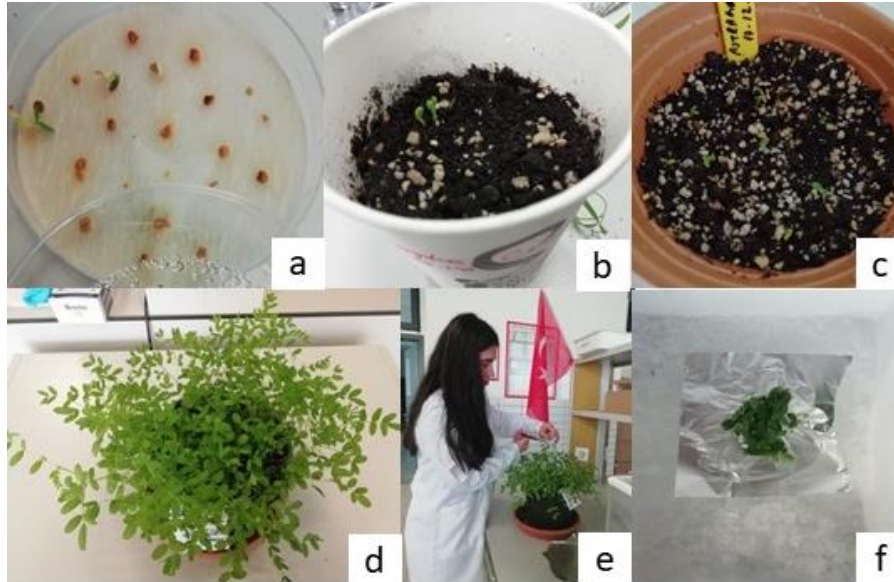
BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) bitkisi iklim odası ve sera koşullarında yetiştirilmiştir. Tohum sterilizasyonu 1 ml %70 etanol ile 1 dk., 1 ml ddH₂O ile 30 sn. 3 kez yıkama yapılarak sağlanmıştır. Petri kutusunda nemli filtre kâğıdı üzerinde düzenli aralıklarla yerleştirilen steril tohumlar 23°C'lik sıcaklıkta %60 rutubet ortamında çimlendirilmiştir. Çimlenme yaklaşık olarak 2 günde gerçekleşmiştir. Çimlenen tohumlar küçük saksılara alınarak köklendirilmiştir. Köklenen fideler daha sonra büyük saksılara aktarılarak bir kısmı serada bir kısmı iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bitkinin genç ve taze yaprakları buz üzerinde toplanılarak -80°C soğutucuda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bitkinin yetiştirilmesi ve materyalin toplanması. Tohumların filtre kağıdında çimlendirilmesi (a), çimlenenlerin küçük saksıya aktarılması (b), köklenenlerin büyük saksıya aktarılması (c), bitkinin genç yapraklarının kesilmesi (d-e) ve genç yaprakların buzda muhafaza edilerek toplanması (f) şekilde gösterilmiştir

3.2 Metot

3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

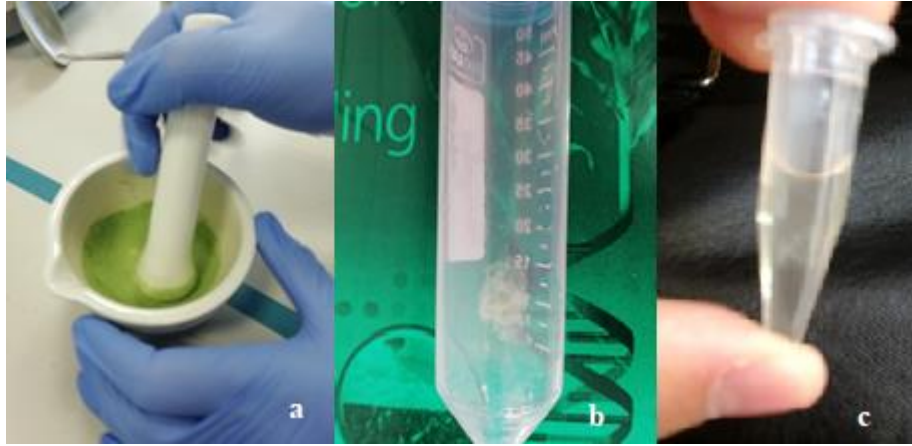
Nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) bitkisinin genç ve taze yaprakları toplanarak -80°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bitkinin genç yapraklarından toplam genomik DNA'yı izole etmek için yüksek oranda bozulmamış DNA elde edilebilen standart CTAB metodu üzerinden uyarlamalar yapılarak elde edilen protokol kullanılmıştır (Xin ve Chen, 2006).

Nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) bitkisinin genç ve taze yaprakları toplanarak -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bitkinin genç yapraklarından toplam genomik DNA'yı izole etmek için yüksek oranda bozulmamış DNA elde edilebilen standart CTAB metodu üzerinden uyarlamalar yapılarak elde edilen protokol kullanılmıştır (Xin ve Chen, 2006).

Genomik DNA izolasyonu için dondurulmuş 5 g yaprak dokusu sıvı azot kullanılarak havanda parçalanarak toz hale getirilene kadar öğütülmüştür. Daha sonra toz hale getirilen yaprak özütü 5 ml falkon tüplerine aktarılarak üzerine CTAB ayrıştırma tampon solüsyonu (%2 CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, %2 β-merkaptoetanol) eklenerek karıştırıcıda 5 dk. çalkalanarak homojen bir hale getirilmiştir. Bu homojen karışım 65 °C'de 45 dk. 65 RPM'de su banyosunda bekletilerek inkübe edilmiştir. 45 dk. sonunda sıcak su banyosundan alınan tüpün içerisine kloroform-izoamilalkol (24:1) eklenerek 25 dk. boyunca 63 RPM hızda çalkalayıcıda homojen hale getirilmiştir. Bu aşama sayesinde protein, yağ, DNA gibi bileşenlerin ayrışımı sağlanmaktadır. Karışım 20 dk. 6000 RPM hızda santrifüj edilmiş ve açık yeşil görünümü en üst sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Sıvı faz üzerine CTAB çöktürme tampon solüsyonu (%1 CTAB, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA) (1.33 hacim) eklenerek tekrar 20 dk. boyunca 6000 RPM hızda santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra, tüpün üst kısmında kalan üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine %70 etanol eklenerek 30 sn. santrifüj yapıp etanol tüpten uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüp içerisinde kalan etanolün kuruyup uçması için 10-15 dk. bekledikten sonra pelet yüksek tuz oranına sahip TE içerisinde (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M NaCl) çözdürülmüştür. Çözülen pelet üzerine 10 µl RNase A (10

mg/ml) eklenip pipetleme yapıldıktan sonra 37 °C’de 45 dk. inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında etanol (2.5 hacim) eklenerek 5 dk. boyunca belli aralıklarla tüp karıştırılarak inkübe edilmiştir. Ardından 15 dk. santrifüj yapılarak gDNA çöktürülmüştür. Çöktürülen gDNA 3 defa %70 etanol ile yıkanmıştır ve kurumaya bırakılmıştır. Alkolü uzaklaştırılan gDNA 500 µl distile su ile çözündürülmüştür. Örnekler -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Nohut geveninin (*Astragalus cicer L.*) genç yapraklarından izole edilen genomik DNA’nın saflık ve konsantrasyon tayini amacıyla %0,8’lik agaroz jele 10 µl örnek yüklenerek elektroforez cihazında (Takara, Mupid One Sistem) 1× Tris-asetik asit-EDTA (TAE) solüsyonu içinde yürütülerek agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Genomik DNA moleküler ağırlığının ve uzunluğunun kontrolü için standart 1 kb markör (Thermo Scientific, GeneRuler™) kullanılmıştır. Agaroz jel EtBr (Etidyum Bromür) solüsyonunda 10 dk. bekletilmiş ve jel görüntülemesi Bio-Rad UV transilüminatör cihazı ile yapılmıştır. Ardından nanodrop cihazı (Quawell, V6.08 Q500) ile 1 µg/ml’deki DNA konsantrasyonu hesaplanmıştır (3940 µg/ml) ve saflığı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Yapraktan genomik DNA izolasyonunu gösteren önemli aşamalar. Materyalin sıvı azot kullanılarak öğütülmesi (a), izopropanol eklenmesi ile bulutsu DNA yapısının gözlenmesi (b) ve distile su ile DNA’nın çözündürülmesi (c)

3.2.2 Sentromerik tekrarlayan DNA dizilerinin PZR amplifikasyonu

Nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) kromozomlarının sentromerik DNA dizisi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yardımıyla çoğaltılmıştır. İzole edilen 1µl (100ng/µl)

genomik DNA, 0.25 µl (5U/µl) Premix Ex Taq polimeraz enzimi (Takara, RR001A), 1 µl (20mM) ileri ve geri primer (Çizelge 3.1), 4 µl dNTPs (2.5mM), 5 µl 10× Ex Taq tamponu (Mg⁺² içerir) ve ddH₂O ile 50 µl toplam hacme tamamlanmıştır. Elde edilen karışımdan uygun döngü ve sıcaklıklar ayarlanarak ardışık tekrar dizisinin DNA ile çoğaltılması gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. *Astragalus sinicus* sentromerik tekrarlayan DNA dizilerinin korunmuş bölgelerinden tasarlanan ileri ve geri primer dizileri (Tek vd., 2011)

Primer ismi	5'-3' dizisi	Uzunluk (bç)	F/R	Bağlanma Sıcaklıkları (T _m)
AsCeB1f	5' GTC CCA TTT CCT ACT AG 3'	17	F	50 °C
AsCeB1r	5' GTA GGG AGT GAG ACG AT 3'	17	R	52 °C

Her bir reaksiyon için 30 döngüden oluşan hedef DNA dizinin çoğaltılması (Sensoquest Thermocycler) gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon için 6 basamaklı bir PZR programı hazırlanmıştır. İlk denatürasyon basamağı 94,0 °C sıcaklıkta 2 dk., ikinci denatürasyon 94,0 °C 30 sn., primerin bağlanması için 47,0 °C sıcaklıkta 30 sn., dizinin uzaması için 68,0 °C sıcaklıkta 1 dk. ve son uzama olarak 68,0 °C 5 dk. olarak programlandırılmıştır. Reaksiyonun muhafaza edilmesi için PZR programı 4 °C sıcaklıkta tamamlanmıştır.

3.2.3 Agaroz jelden PZR ürününün saflaştırılması

Jelden geri kazanım Li vd. (2010), tarafından açıklanan silika matriks protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Uygun büyüklükteki PZR ürünü, agaroz jelden kesilmiş ve yaklaşık 100 mg ağırlığındaki jel parçası ependorf tüpe aktarılarak üzerine 300 µl sodyum iyodür (6M NaI) eklenmiştir. Jel ısıtıcıda 70 °C'de 3 dk. eritilmiştir. Eriyen jelin içerisine 10 µl silika matriks eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir. Bu şekilde PZR ürününün matrikse bağlanması sağlanmıştır. Ardından 16 sn. 12.000 RPM hızında santrifüj yapılarak tüpün üst kısmında bulunan süpernatant peletten uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve %50 ETOH). Ardından tekrar 16 sn. hızlı santrifüj yapılarak peletten süpernatantın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bunun sonucunda pelet agaroz parçalarından temizlenmiştir. Yıkama solüsyonu kullanılarak yapılan bu işlem iki defa gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra tüp içerisine 20 µl distile su eklenmiş ve ısıtıcıda 70 °C'de 2 dk. boyunca bekletilmiştir.

Böylece matriks ve DNA kompleksinin birbirinden ayrıştırılması sağlanmıştır. Son aşamada 2 dk. santrifüj yapılmış ve tüpün üst kısmında sıvı içerisinde bulunan saf PZR ürünü alınarak yeni tüpe aktarılmıştır.

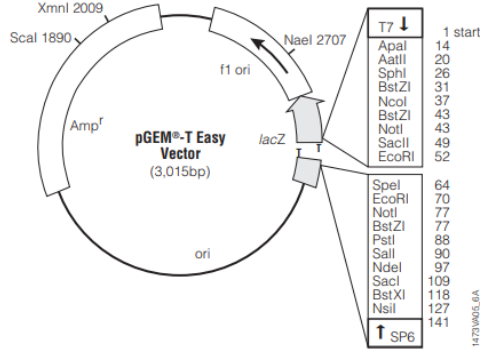
3.2.4 Elektrokompotent hücre hazırlama

Elektrokompotent hücre, Dower vd. (1988), optimize ettiği protokole uygun olarak hazırlanmıştır. Elektroporasyon tekniğinin kullanılmasının temel nedeni kimyasal transformasyona göre daha yüksek verimliliğe sahip olmasıdır. 2 ml'lik mini kültürü hazırlanan XL1-blue bakteri suşu bir gece 37 °C 165 RPM'de inoküle edilmiştir.

Dört adet 100 ml'lik LB besi ortamı erlene yarım saat arayla elde edilen mini kültürlerden 1 ml alınarak ekim yapılmıştır ve 37 °C 165 RPM'de üremeye bırakılmıştır. Her yarım saat arayla üremeye bırakılan ilk 100 ml'lik kültürün 600 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Spektrofotometrik değeri 0.5-0.7 nm olduğu zaman üremeye son verilmiştir. Dört adet 100 ml hacimli kültürler 20 dk. buzda bekletilmiştir. Ardından kültürler 50 ml hacimli falkon tüplere aktararak 15 dk. 4 °C 4000 xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 25 ml soğuk distile su eklenerek pelet çözündürülmüştür. Bu yıkama işleme 4 defa tekrarlanarak elde edilen toplam pelet bir falkon tüpte biriktirilmiştir. En son elde edilen toplam pelet üzerine 1 ml %10'luk gliserol eklenerek pelet çözündürülmüştür. Pelet çözündürüldükten sonra, 100 µl çekilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. -80 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.5 Ligasyon

Ligasyon, pGEM-T Easy vektör (A1360, Promega, 2019; Madison, WI, USA) kitindeki protokol esas alınarak gerçekleştirilmiştir. İstenilen sentromerik tekrarları içeren DNA fragmentlerinin vektöre bağlanması için 0.5 µl (3 u/µl) T4 DNA ligaz enzimi, 2.5 µl 2× Rapid ligasyon tamponu, 0.5 µl 3015 bç büyüklüğünde pGEM-T easy vektör DNA (100ng) (Şekil 3.3), 1.5 µl (3×) DNA fragmenti kullanılarak toplam 5 µl olacak şekilde ligasyon karışımı pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Ligasyon reaksiyonunun daha fazla transformant elde etmek için +4 °C sıcaklıkta 1 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 3.3. pGEM-T easy vektörünün boyutu ve çoklu klonlama bölgesini kesen restriksiyon enzimlerini gösteren harita (Promega)

3.2.6 Bakteriye transformasyon

Bakteri hücrelerine hedef DNA'nın aktarılması işlemi elektrotransformasyon yöntemi ile yapılmıştır (Dower vd, 1988). Ligasyon sonucu hedef DNA'yı içeren karışım 5 dk. buzda önceden erimesi sağlanan 100 µl'lik elektrokompotent hücrelerine aktarılmıştır. Ardından doğrudan 0,1 cm elektrot boşluklu (kahverengi kapak) transformasyon küvetine (Biorad, 2019; Gene Pulser®/MicroPulser™) aktarılmış ve elektroporasyon yöntemiyle transformasyon cihazı (Biorad, 2019; Gene Pulser Xcell™) kullanılarak hedef DNA bakteri hücrelerine transforme edilmiştir. Transforme edilen hücreler önceden hazırlanmış 1 ml'lik SOC besiyeri içeren tüplere (100 ml SOB besiyeri (10 g tripton, 2.5 g maya özütü, 0.25 g NaCl, 5 ml 1 M MgSO₄) ve 2 ml %20 glukoz) aktarılıp 37 °C sıcaklıkta 165 RPM hızında 45 dk. inkübe edilmiştir.

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

3.2.7 Plazmid DNA izolasyonu

Her bir tüpe 2 ml'lik LB besi ortamı içerisinde 2 µl ampisilin olacak şekilde sıvı kültür hazırlanmıştır. Ekimi önceden yapılmış rekombinant koloniden kürdan ile tek koloni

seçimi yapıp sıvı kültür içeren tüpe bırakılmış 165 RPM hızında 1 gece inkübatörde plazmidlerin büyümesi sağlanmıştır.

Büyüyen kültürden ve %50 gliserolden 1:1 oranında tüplere aktarılıp -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. İleride karşılaşılabilecek muhtemel sorunları önlemek amaçlı stok hazırlanmıştır. Kalan kültür buza alınıp santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kültürü pelet haline getirmek için 3 dk. 13500 RPM hızda santrifüj yapılmıştır. Üzerine 100 µl resüspanسیون solüsyonundan (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Na₂EDTA, 50mM %20 glukoz, 100 µl RNase A (stok 10mg/ml), ddH₂O) eklenmiş ve vorteks yardımıyla pelet solüsyonda çözdürülmüştür. Çözülen pelet üzerine 100 µl Lisis solüsyonundan (10N NaOH, %10 SDS, ddH₂O) eklenmiştir. Üzerine 100 µl potasyum asetat eklenmiş ve nazıkçe karıştırılıp bekletilmiştir. Bu aşamada bulutsu bir yapı gözlenmiştir. Bulutsu yapı askıda kaldığı gözlemlendikten sonra 10 dk. 1000 RPM hızında santrifüj yapılmıştır. Süpernatant yeni tüplere aktarılıp üzerine 500 µl sodyum iyodür (6 M NaI) eklenmiştir. DNA'nın çökmesini sağlayan silika matriks çözeltisinden 25 µl eklenerek 5 dk. belirli aralıklarla tüp karıştırılarak oda sıcaklığına bırakılmıştır. DNA'nın matrikste iyice tutunması için 16 sn. 12000 RPM hızda santrifüj yapılarak tüpün üst kısmında bulunan süpernatantın peletten uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alt faz üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve %50 EtOH) ve 16 sn. hızlı santrifüj yapılarak yeniden süpernatantın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama solüsyonu kullanılarak yapılan bu işlem iki kere gerçekleştirilmiştir. Hızlı santrifüj yapıp kalan sıvı mikropipetle çekilerek yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. Peletin kuruması beklenip üzerine 15 µl distile su eklenerek 70 °C sıcaklıkta 2 dk. boyunca arada belirli aralıklarla çözdürülerek silika matriks ve DNA'nın ayrıştırılması sağlanmıştır. Silikanın çökmesi için 2 dk. santrifüj sağlanmıştır. Üst fazda kalan saf DNA alınarak yeni tüpe aktarılmıştır. Rekombinant DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jele 5 µl yüklenerek elektroforez cihazında (Takara, Mupid One Sistem) 1× TAE solüsyonu içinde yürütülmüştür. Fragmentin moleküler ağırlığının ve uzunluğunun tespit edilmesi için standart 1 kb markör (GeneRuler™, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Agaroz jel sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir. Örnekler -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

3.2.8 Koloni PZR ve dizileme

Plazmid içinde insert DNA fragmentinin olup olmadığının saptanması için transforme olmuş tek koloniler seçilerek pGEM-T easy vektörüne özgü M13 primerleri ile (Çizelge 3.2) uygun döngü ve sıcaklıkta PZR cihazında çoğaltma (Sensoquest Thermocycler) yapılmıştır. DNA örnekleri %0,8 agaroz jele 5 µl yüklenerek elektroforez cihazında 1× TAE solüsyonu içinde yürütülmüştür. Fragmentin moleküler ağırlığının ve uzunluğunun tespit edilmesi için standart 1 kb markör kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Koloni PZR için kullanılmış olan standart M13 primerlerin dizisi

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

PCR programı reaksiyon içeriğinde 0.25 µl (25 ng/µl) izole edilen plazmid örneği, 0.5 µl (2.0 mM) dNTP, 2.5 µl (10×) PCR tamponu, 0.5'er µl ileri ve geri M13 primerleri, 0.5 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve 20.0 µl ddH₂O eklenerek toplamda 25 µl olacak şekilde bir reaksiyon hazırlanmıştır. Bu reaksiyon için 6 basamaklı bir PCR programı hazırlanmıştır. İlk denatürasyon basamağı 94,0 °C sıcaklıkta 2 dk., ikinci denatürasyon 94,0 °C sıcaklıkta 30 sn., primerin bağlanması için 55,0 °C sıcaklıkta 30 sn., dizinin uzaması için 70,0 °C sıcaklıkta 5 dk. ve son uzama olarak 70,0 °C sıcaklıkta 10 dk. olarak programlanmıştır. Reaksiyonun muhafaza edilmesi için PCR programı 4 °C sıcaklıkta tamamlanmıştır. Toplam döngü sayısı 30 olacak şekilde düzenlenmiştir. Insert DNA fragmentinin boyutunun tespit edilmesi için 1× TAE solüsyonunda %0,8 agaroz jel elektroforezi kullanılarak 1 kb markör DNA ile yürütmesi yapılmıştır. Agaroz jel EtBr solüsyonunda 10 dk. bekletilmiş ve Bio-Rad UV transilüminatör cihazı ile görüntülemesi yapılmıştır. İçlerinde insert olan klonlar seçilmiştir.

DNA dizi bilgisinin elde edilmesi amacıyla nohut geveni türünün sentromerik ardışık tekrar dizilerini içeren 10 insert klon ileri ve geri M13 primerleri ile toplam 10 okuma yapılması için BM laboratuvar sistemleri firmasından hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Sentromerik ardışık tekrar dizileri tespit edilen klonlar Accent olarak isimlendirilmiştir.

3.2.9 Verilerin değerlendirilmesi ve biyoinformatik analizi

Hizmet verimi şeklinde gerçekleştirilen dizilerin M13 vektör ve spesifik ileri ve geri primerlerin (Çizelge 3.2) nükleotit tanıma bölgelerinden arama yapılarak, sentromerik tekrarlayan dizilerin genomik DNA dizi bilgisine Geneious (Kearse vd., 2012) programı kullanılarak ulaşılmıştır. Nohut geveni genomundaki sentromerik tekrarlayan dizilerin tespiti dotplot analizi YASS (Yet Another Similarity Searcher): genomic similarity search tool programı (Noe ve Kucherov, 2005) kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri ışığında NCBI Nucleotid BLAST programında tarama yapılarak hangi türlerle dizi benzerliği olduğu bulunmuştur.

3.2.10 Dot blot

Dot blot yöntemi için *Astragalus cicer L. 77ac* klonu Prob DNA olarak, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) kiti protokolü referans alınarak 3.2.11 deki protokoldeki gibi hazırlanmıştır. Daha sonra membran üzerine sırasıyla 1 µl gDNA eklenir ardından yanına (3000 ng/ µl) 1 µl gDNA+10 µl low TE karışımından eklenir (300 ng/ µl) onun yanına 1 µl (1 µl gDNA+10 µl low TE karışımından (300 ng/ µl)) +10 µl TE karışımından eklenir (30 ng/ µl) sonrasında 1 µl (1 µl (1 µl gDNA+10 µl low TE karışımından +10 µl low TE (30 ng/ µl)) +10 µl low TE karışımından eklenir (3 ng/ µl) ve son olarak 1 µl (1 µl (1 µl (1 µl gDNA+10 µl low TE karışımından +10 µl low TE (3 ng/ µl)) +10 µl low TE karışımından eklenir (0,3 ng/ µl). Sonuç olarak farklı konsantrasyonlardan *Astragalus cicer* genomik DNA'sı (3000 ng/ µl, 300 ng/ µl, 30 ng/ µl, 3 ng/ µl) membranda yan yana konulmuştur. Aynı seyreltme işlemi prob içinde uygulanmıştır. Sırasıyla membran üzerine gDNA'nın alt sırasına 200 ng/ µl, 20 ng/ µl, 2 ng/ µl, 0.2 ng/ µl konsantrasyona sahip prob DNA eklenir. Bu işlemin ardından prob kontrolü için sırasıyla 3.11.5 anlatılan belirleme aşaması ve 3.11.6'da anlatılan karanlık oda metodu ile sonuç elde edilmiştir.

3.2.11 Southern hibridizasyon analizi

3.2.11.1 DIG-DNA labelling (probe hazırlama)

Prob DNA, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) kiti protokolü referans alınarak hazırlanmıştır. Ependorf tüpüne 2 µl ddH₂O ve 6 µl insert olarak seçilmiş plazmit DNA'sı (CentAc77 klonu; 1000 ng/µl) eklenmiştir. DNA 10 dk. kaynar su (90-100 °C) içerisinde denatüre edilerek hızlı bir şekilde buza aktarılmıştır. DNA 5 dk. buzda bekletilmiştir. DNA ve DIG-High Prime 1 kullanmadan önce hızlı santrifüj yapılmıştır. DNA ve 2 µl DIG-High Prime 1 birleştirilerek karıştırılıp hızlı santrifüj yapılmıştır. 37 °C bir gece (20 saat kadar) inkübe edilmiştir. Ertesi gün karışımın üzerine 0.5 µl 500 mM EDTA (pH 8) eklenerek enzimin etkinliği durdurulmuştur. Elde edilen prob kullanılabildiği kadar -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

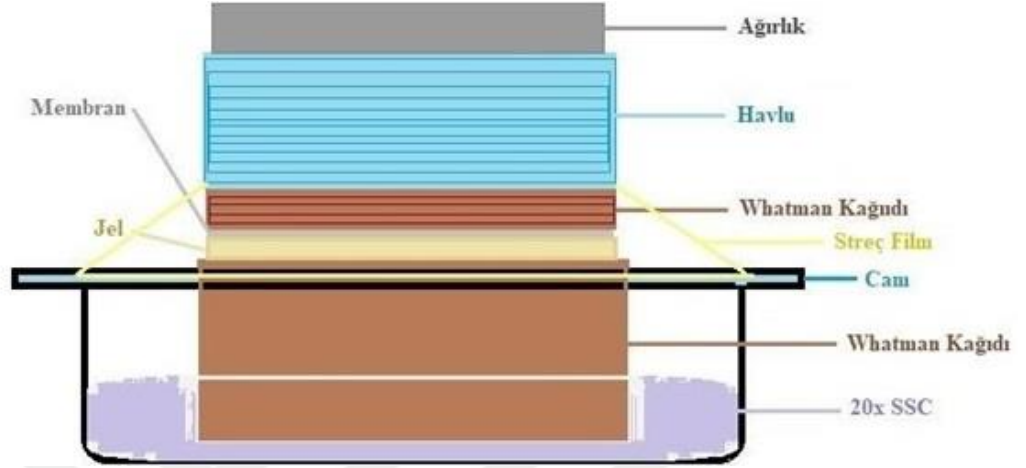
3.2.11.2 DNA'nın membrana kapiller transferi

Çizelge 3.3. DNA'nın membrana kapiller aktarımında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

Kullanılan Solüsyonlar	Denaturation Buffer (1L)	Neutralization Buffer (1L)	20× SSC (1L)
İçerikleri	1.5M NaCl 87.66 g 5M NaOH 20.00 g ddH ₂ O ile 1 L tamamlanır.	1.5M NaCl 87.66 g 0.5M Tris-base 60.50 g pH=7.5 ddH ₂ O ile 1 L tamamlanır.	3.0M NaCl 175.30 g 0.3M Tri-sodium citrate 82.20 g pH=7 ddH ₂ O ile 1 L tamamlanır.

TaqI, EcoRI, BamHI, HindIII, KpnI, Sau3A I (Bsp143 I), MboI, HpaII, MspI restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan total hacmi 50 µl gDNA, %0,8'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jeldeki DNA fragmentleri ilk olarak 10 dk. 100 V yürütüldü Ardından aynı jel elektroforezin voltaj ve saat ayarları değiştirilerek 5 saat 25V yürütülerek DNA fragmentlerin bç uzunluğuna göre jeldeki ayrımı sağlanmıştır. Agaroz jel 20 dk. etidyum bromür ile boyanmıştır. Distile su ile 10 dk. yıkandıktan sonra Transillüminatör cihazında agaroz jelin görüntüsüne bakılmıştır. Görüntü kaydedildikten sonra agaroz jel tekrar 5 dk. ddH₂O ile yıkanır 2×15 dk. 70

RPM’de jel Denaturation solüsyonu içinde çalkalanmıştır. Ardından agaroz jel 70 RPM’de ddH₂O ile 5 dk. yıkanmıştır. Daha sonra agaroz jel 2×15 dk. 70 RPM’de Neutralization solüsyonu içinde nötralize edilmiştir. Ardından agaroz jel 10 dk. 70 RPM’de 20× SSC ile dengelenmiştir.



Şekil 3.4. Agaroz jeldeki DNA'nın membrana kapiller aktarımı (Kaynak: uyarlanarak yapılmıştır)

Şekil 3.4'te gösterildiği gibi plastik kap üzerine dikdörtgen cam preparat yerleştirilmiştir. Cam preparatın üzerine kapın içine dökülecek olan 20× SSC ye temas edecek uzunlukta whatman kâğıdı kesilmiş ve cam preparatın üzerine yerleştirilmiştir. Whatman kâğıdı 20X SSC ile ıslatılmış ve oluşan hava kabarcıklarını engellemek amacıyla oklava ile whatman kâğıdı üzerinde ileri geri sürtünme hareketleri yapılmıştır. Ardından jel büyüklüğünde kesilen whatman kağıtları (5 adet) üzerine konur tekrar 20× SSC ile ıslatılmış ve hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Agaroz jel ters bir biçimde whatman kağıdının üzerine yerleştirilmiştir. Ayrıca, membran 20× SSC ile ıslatılmış ve ıslatılan membran agaroz jelin üzerine konulmuştur. Membranın üzerine tekrar whatman kağıtları konulmuş ve 20× SSC ile tekrar ıslatılır ve tekrar oklava ile hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Whatman kağıtları üzerine 6-7 cm uzunluğunda kâğıt havlular yerleştirilmiştir. Ardından kâğıt havlularının üzerine yaklaşık 800 g ağırlığında ağırlık konulmuştur. Ardından plastik kutuya yaklaşık 100 ml 20× SSC eklenmiş ve kutunun etrafı streç film ile sarılmıştır. Oda sıcaklığında 1 gece aktarım için bekletilmiştir.

3.2.11.3 DNA'nın membrana sabitlenmesi

İnkübatör cihazı 80 °C ayarlanmıştır. Petriye tabanını kaplayacak şekilde 2× SSC dökülmüş ve membran petrideki 2× SSC batırılıp çıkarılarak ıslatılmıştır. Ardından DNA membrana 80 °C'de 70 dk. sabitlenmiştir.

3.2.11.4 Hibridizasyon protokolü

Çizelge 3.4. Hibridizasyon aşamasında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

Kullanılan Solüsyonlar	Hibridizasyon Solüsyonu (40ml)	Yıkama Solüsyonu (400ml)	2× SSC (1L)
İçerikler	20× SSC'den 10 ml alınır (5× SSC için) %10 SDS'den 80 µl alınır (%0.02 SDS için) 0.4 g Blocking Reagent tartılır (%1 Blocking Reagent için) %30 N-Lauroylsarcosine'den 134 µl alınır (%0.1N-Lauroylsarcosine için) ddH ₂ O ile 40 ml tamamlanır.	20× SSC'den 40 ml alınır %10 SDS'den 4 ml alınır ddH ₂ O ile 400'e tamamlanır (356 ml)	3.0M NaCl 17.53g 0.3M Tri-sodium citrate 8.22g pH=7 ddH ₂ O ile 1 L tamamlanır.

2× SSC hibridizasyon şişesine eklenmiş ve 65 °C 'de ısıtılmıştır. Ardından hibridizasyon şişesinin içerisine membran eklenmiş ve membranın yıkanması sağlanmıştır. 2× SSC hibridizasyon şişesinden uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan 10 ml hibridizasyon solüsyonu (5× SSC, %0.02 SDS, %1 Blocking Reagent, %0,1 N-Lauroylsarcosine), içerisinde membran olan hibridizasyon şişesine eklenmiştir.

Hibridizasyon cihazında 65 °C 'de maksimum hızda bir saat bekletilmiştir. Prob sıcak su içerisinde 10 dk. boyunca denatüre edilir ve 5 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. 10 ml hibridizasyon solüsyonu bulunan membran üzerine 10µl prob eklenmiştir. Ardından hibridizasyon cihazında 65 °C 'de maksimum hızda hibridizasyon solüsyonu ve prob karışımı ile membran bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hibridizasyon cihazından alınan şişe içerisindeki hibridizasyon solüsyonu ve prob karışımı falkon tüpe aktarılıp -20 °C 'de muhafaza edilmiştir. İçerisinde sadece membran bulunan şişeye 20 ml 2× SSC+ %0,1 SDS eklenmiş ve 65 °C 'de maksimum RPM de 5 dk. boyunca

hibridizasyon cihazında yıkanmıştır. Ardından 20 ml 2× SSC + %0,1 SDS hibridizasyon şişesinden uzaklaştırılmıştır. Hibridizasyon şişesinde bulunan membran üzerine tekrar 2× SSC + %0,1 SDS dökülmüştür ve 65 °C 'de maksimum RPM de 15 dk. hibridizasyon cihazında yıkanmıştır. Ardından 20 ml 2× SSC + %0,1 SDS hibridizasyon şişesinden uzaklaştırılmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

3.2.11.5 Belirleme aşaması

Çizelge 3.5. Belirleme aşamasında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

Kullanılan Solüsyonlar	Maleic Acid Buffer (1l)	Washing Buffer (1l)	Detection Buffer (1l)	Blocking Solution (50ml)	Antibody Solution (10ml)
İçerikler	0.1M Maleic acid 11.6 g 0.15M NaCl 8.7 g NaOH 7.7 g pH=7.5 (20°C) ddH ₂ O 1 l tamamlanır.	Maleic acid buffer 100ml (0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl, NaOH, pH=7.5 (20°C) %0,3 Tween20 75µl	0.1M Tris-HCl 12.114 g 0.1M NaCl 5.84 g pH=9.5 (20°C) ddH ₂ O 1 l tamamlanır.	10× Blocking buffer 5ml Maleic Acid buffer 45ml	1'e 10.000 oranında Anti-Digoxigenin-AP 1µl × Blocking Solüsyonda n 10 ml eklenerek solüsyon hazırlanır.

Hibridizasyon sonrası hibridizasyon şişesi içindeki prob falkon tüpe aktarılmıştır ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Ardından membran kapalı bir kaba aktarılarak üzerine 30 ml washing buffer eklenmiştir. 5 dk. oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde ortalama 70 RPM hızda washing buffer ile yıkaması yapılmıştır. Washing buffer kaptan uzaklaştırılmıştır. Membran üzerine 30 ml blocking solüsyon eklenir ve oda sıcaklığında 30 dk. 70 RPM'de bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Blocking solüsyon kaptan uzaklaştırılmış ve ardından kaba taze hazırlanmış 10 ml antibody solüsyonu eklenmiştir 30 dk. oda sıcaklığında 70 RPM'de inkübe edilmiştir. Antibody solüsyonu kutudan uzaklaştırılmıştır. Membran üzerine 30 ml washing buffer eklenmiş ve 2x15 dk. oda sıcaklığında 70 RPM'de yıkaması yapılmıştır. Washing buffer kaptan uzaklaştırılmış ardından membran 5 dk. oda sıcaklığında 70 RPM'de 10 ml detection buffer ile inkübe edilmiş ve detection buffer kaptan uzaklaştırılmıştır. Ardından streç film klasör üzerine serilmiş ve membran üstüne yerleştirilip üzerine 7-8 damla (~160µl) CSPD ready-to-use

damlatılmıştır. Bu işlemden sonra streç film ile membranın üzeri kapatılmış ve CSPD read-to-use hafif el hareketleri ile membranın tüm yüzeyine homojen olarak dağıtılmıştır. Membran etrafında kalan fazla sıvı partikülleri peçete yardımı ile emilmiştir. Bu aşamadan sonra karanlık odaya geçilmiş ve geri kalan tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Klasör içindeki membran üzerine X-ray film yerleştirilmiştir. Klasörün kapağı kapatılmış ve membran üzerine yerleştirilen film 3.5 ve 24 saat süren iki pozlamaya tabii tutulmuştur.

3.2.11.6 Karanlık oda metodu ile film görüntüsü eldesi

Çizelge 3.6. X-Ray Film banyosu için kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	KONIX Developer (stok)	KONIX Fixer (stok)	ddH ₂ O
İçerikleri	D ₁ (5 l) D ₂ (0.5 l) D ₃ (0.5 l) ddH ₂ O (14 l) Total Hacim=20 l developer solüsyonu	F ₁ (5 l) F ₂ (1 l) ddH ₂ O (14 l) Total Hacim=20 l fixer solüsyonu	Otoklavlanmış distile su

1 l (litre) developer solüsyonu hazırlamak için bir kap içerisine 700 ml su eklenmiştir. Üzerine stok D1 kimyasalından 250 ml eklenip homojen bir yapı elde edene kadar karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın üzerine 25 ml stok D2 kimyasalından eklenmiş ve tekrar homojen bir yapı elde edene kadar karıştırılmıştır. Son olarak bu karışımın üzerine 25 ml stok D3 kimyasalından eklenerek tüm karışım homojen bir yapı oluşturana dek karıştırılmıştır. Ardından 1 l fixer solüsyonu hazırlanmıştır. Ayrı bir kap içerisine 700 ml su eklenmiştir. Üzerine stok F1 kimyasalından 250 ml eklenip homojen bir yapı elde edene kadar karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın üzerine 50 ml stok F2 kimyasalından eklenmiş ve tekrar tüm karışım homojen bir yapı elde edilene dek karıştırılmıştır.



Şekil 3.5. Karanlık oda içerisinde film eldesi (pembe kapta developer solüsyonu, mavi kapta fixer solüsyonu, yeşil kapta ise ddH₂O bulunmaktadır)

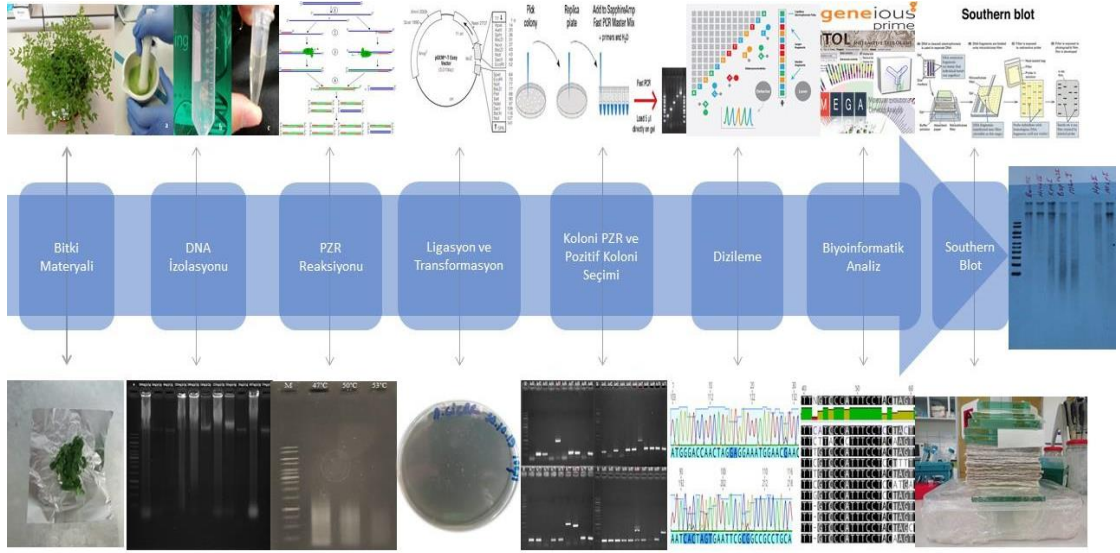
Karanlık bir oda içerisinde bulunan 3 adet kaptan 1. kaba developer (1 l) solüsyonu, 2. kaba 1 l fixer solüsyonu 3.kaba ise ddH₂O eklenmiştir. Pozlaması tamamlanan X-ray filmi 8 sn. developer solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından film developer bulunan 1. kaptan tahta maşa yardımı ile çıkartılıp fixer solüsyonu bulunan 2. kaba eklenmiştir. Film 45-60 sn. arası görüntü sabitlenene kadar fixer solüsyonunda bekletilmiştir. Sonrasında film 2. kaptan ayrı bir tahta maşa yardımı ile alınıp su bulunan 3. kaba aktarılmış ve filmin yıkaması sağlanmıştır. Bu işlem film üzerinde bulunan fazla solüsyon ve istenmeyen kalıntılardan kurtulmak amacıyla yapılmıştır. Son olarak film su bulunan 3. kaptan çıkarılmış ve kurutulmaya bırakılmıştır (Şekil 3.5). Kurutulan film aydınlık ortama alınarak çıplak gözle görüntü analizi yapılmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR

4.1 İş Akışı ve Planı

Tez çalışma süresince çalışmaların nasıl yürütüldüğü ve sonuçların nasıl elde edildiğine dair bir iş akış diyagramı oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Genel iş akışını kısaca özetleyecek olursak ilk olarak nohut geveninin genç ve taze yapraklarından genomik DNA izole edilmiştir. Daha sonra nohut geveninin sentromerik ardışık tekrar dizilerine özgü primer çifti tasarlanmıştır. Genomik DNA'sı elde edilen nohut geveni tasarlanan primerlerle PZR yapılarak çoğaltılmıştır. Hedef DNA'yı içeren bölgelerin ligasyonları kurulmuş ve elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilerek vektöre aktarılmıştır. Vektöre aktarılan hedef DNA'lar üreyerek klon oluşturmaları için ampisilinli agar tabağına ekilmiştir. Ekimi yapılan tabaklardan rekombinant olduğu düşünülen tek koloniler seçilerek inkübasyonu tabii tutulmuştur. Ardından plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen plazmid içerisinde insert DNA fragmentinin olup olmadığının tespit edilmesi adına koloni PZR yapılmıştır. İnsert olduğu düşünülen 10 örnek seçilerek dizilemeye gönderilmiştir. Gelen dizi sonuçlarına göre sentromerik ardışık tekrar eden bölgelerin analizi yapıp biyoinformatik yöntemlerle tür içi ve türler arası kıyaslamalar yapılmıştır. Elde edilen biyoinformatik verilerin ışığında southern hibridizasyon tekniği kullanılarak sentromerik ardışık tekrar dizilerinin varlığı ispat edilmiştir.



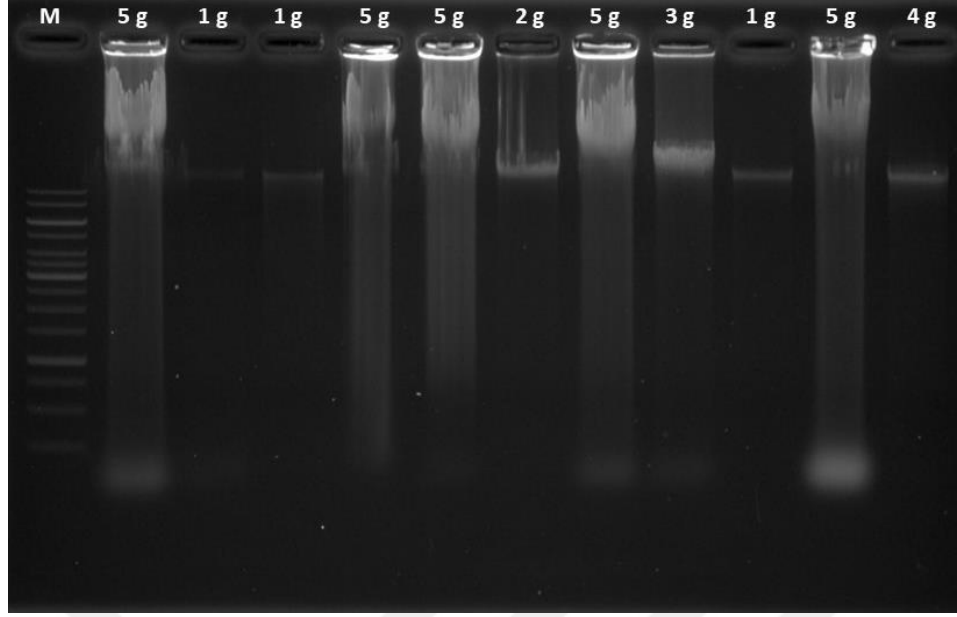
Şekil 4.1. Genel metodolojiyi gösteren akış diyagramı

4.2 Nohut Geveni Bitkisinin Çimlendirme ve Yetiştirilmesi

Bitki materyali çimlendirme işlemi pamuk ve filtre kâğıdı olmak üzere iki farklı ortamda yapılmıştır. Çimlenme oranının filtre kağıdında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

4.3 Nohut Geveninde Genomik DNA İzolasyonu

Standart CTAB metodu ile genomik DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA (gDNA) %0,8'lik agaroz jelde 100 V'da 25 dk. yürütülmüştür. Jel görüntülemesi sonucunda DNA örneklerinin PZR için uygun saflıkta, net bantlar verdiği görülmüştür. Çimlendirilip toprağa aktarılan ve taze yaprak elde edilen *Astragalus cicer* L. türünde farklı yaprak ağırlığında gDNA izolasyonu yapılmış ve farklı konsantrasyonda genomik DNA elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı ağırlıkla yapraklardan izole edilen ve farklı konsantrasyonlara sahip nohut geveni (*Astragalus cicer L.*) bitkisinin genomik DNA jel görüntüsü

İzolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyonunu Nanodrop cihazında ölçülmüştür. Gösterilen konsantrasyon değerleri ilk ölçüm değerleridir (Çizelge 4.1). Nümerik değerlerin jel görüntüsünde gözlenen parlaklıklar ile orantılı bir sonuç olduğu gözlemlenmiştir. Örnekler PZR için yaklaşık 100 ng olacak şekilde seyreltilmiştir.

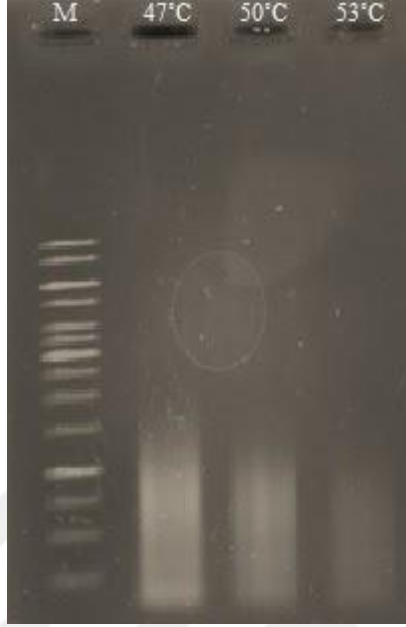
Çizelge 4.1. *Astragalus cicer L.* bitkisinin genç yapraklardan farklı ağırlıklarda elde edilen genomik DNA izolasyonlarının Nanodrop ölçümleri. Kırmızı kare içerisine alınan gDNA ile çalışmalar yürütülmüştür

gDNA Örnek Numaraları	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kullanılan Yaprak Miktarı (g)	5	1	1	5	5	2	5	3	1	5	4
gDNA Konsantrasyon Değeri (ng/ µl)	3940	60	68	2354	1984	158	1255	326	26	4037	579

4.4 Sentromerik Tekrarlayan DNA Dizilerinin PZR İle Çoğaltılması

Nohut geveni türünün gDNA örneği alınarak primer bağlanma sıcaklıkları (3. basamak) 53-50 ve 47 °C olacak şekilde gradient PZR yapıp uygun sıcaklık belirlenmek istenmiştir. DNA fragmentleri %0,8 agaroz jelde 100 V'da 25 dk. yürütülmüştür. Optimizasyon için kullanılan türlerin PZR jel görüntülerine bakıldığında denenen

sıcaklıklar arasında primer bağlanma sıcaklığı en ideal 47 °C sıcaklıkta PZR'ın konsantre bir smear verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bu görüntünün nedeni ise sentromerik tekrarlayan DNA dizisinin monomer uzunluğunun 20 bç olmasıdır.

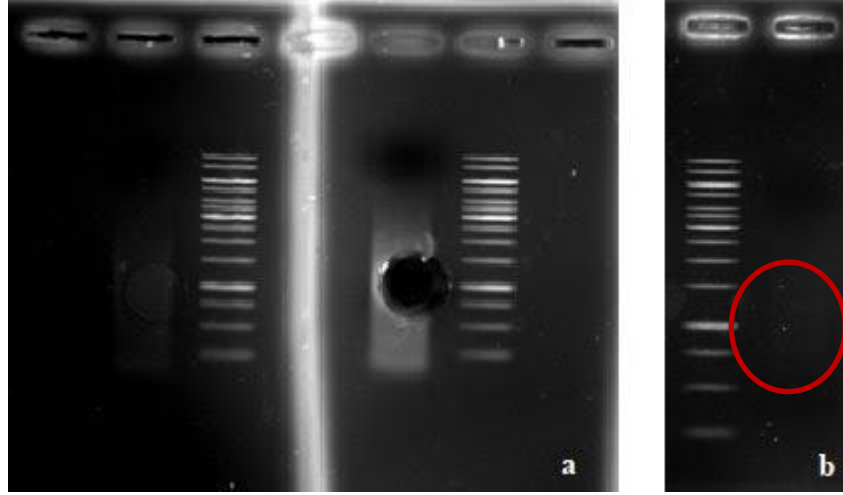


Şekil 4.3. Nohut geveni 47-50 ve 53 °C primer bağlanma sıcaklıkları kullanılarak PZR çoğaltılması sonucunun elde edilen DNA fragmentlerinin agaroz jel görüntüsü (M: markör, 1 kb)

Agaroz jel görüntüsü sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre (Şekil 4.3), 47 °C 'de 250-2000 bç arasında, 50 °C 'de 250-1500 bç arasında, 53 °C 'de 250-1000 bç arası uzunluğundaki DNA parçası PZR ile çoğaltıldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuca binaen 47 °C primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı kabul edilerek PZR çalışmalarına bu doğrultuda devam edilmiştir.

4.5 Agaroz Jelden PZR Ürününün Saflaştırılması

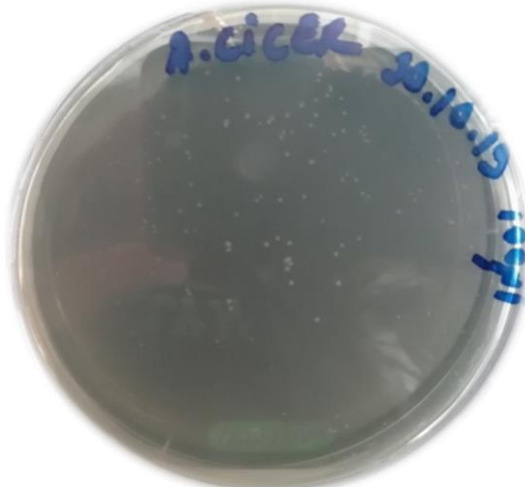
Li vd. (2010), tarafından açıklanan silika matriks protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 1000 bç uzunluğundaki PZR DNA ürünü, agaroz jelden uzaklaştırılarak saf olarak elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Agaroz jelden 1000 bç uzunluğundaki PZR ürününün saflaştırılması (a) ve saflaştırılma işleminden sonra 1000 bç uzunluğundaki PZR ürünün agaroz jel görüntüsü (b)

4.6 Bakteriyel Transformasyon

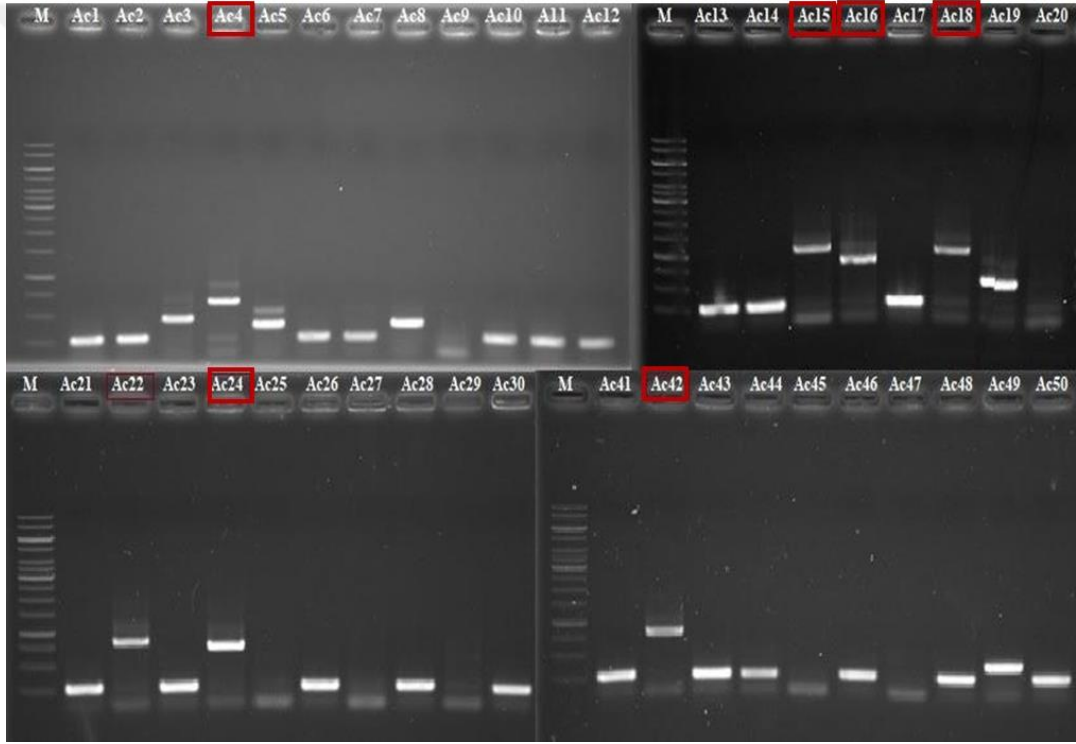
pGEM-T Easy vektörü ile kurulan ligasyon sonrası yapılan transformasyon ürününden tek koloni elde etmek için LBA tabağına yayma ekim yapılmıştır. Nohut geveni türünde yapılan ekim başarıyla gerçekleştirilmiştir tek koloniler gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



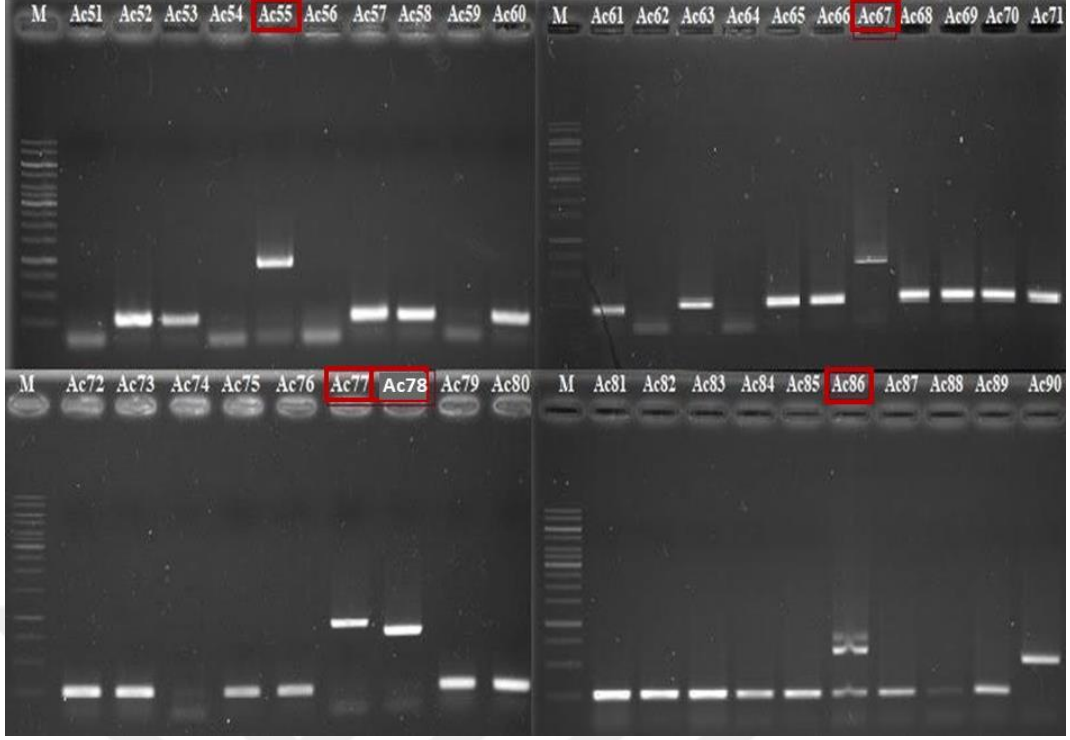
Şekil 4.5. Transformasyon sonucu büyüyen tek rekombinant kolonileri gösteren tabak

4.7 Nohut Geveni Türünde İnsert DNA Parçasının Varlığının Saptanması

Seçilen koloni kültürlerinin kopyalanması için replika tabak tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ile tek koloni seçilip yeni ampisilinli tabaklara kürdan ile aktarılmıştır. Kürdanda kalan kültür her bir reaksiyon tüpü içinde karıştırılarak M13 primerleri ile PZR yapılmıştır. Yeni tabaklara aktarılan koloniler 37 °C sıcaklıkta 1 gün üremesi beklenmiştir. İnsert genomik lokusu içeren koloniler plazmid izolasyonu yapılarak dizilemeye hazır hale getirilmiştir. Bazı koloniler de doğrudan plazmid izolasyonu yapıp koloni PZR ile çoğaltılıp insert genomik lokusu içerip içermedikleri belirlenmiştir (Şekil 4.6.- 4.7).



Şekil 4.6. Koloni PZR sonuçlarının jel görüntüsü (kırmızı ile kare içine alınan klonlar insert klonlardır)



Şekil 4.7. Koloni PZR sonuçlarının jel görüntüsü (kırmızı ile kare içine alınan klonlar insert klonlardır)

4.8 Verilerin Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analiz

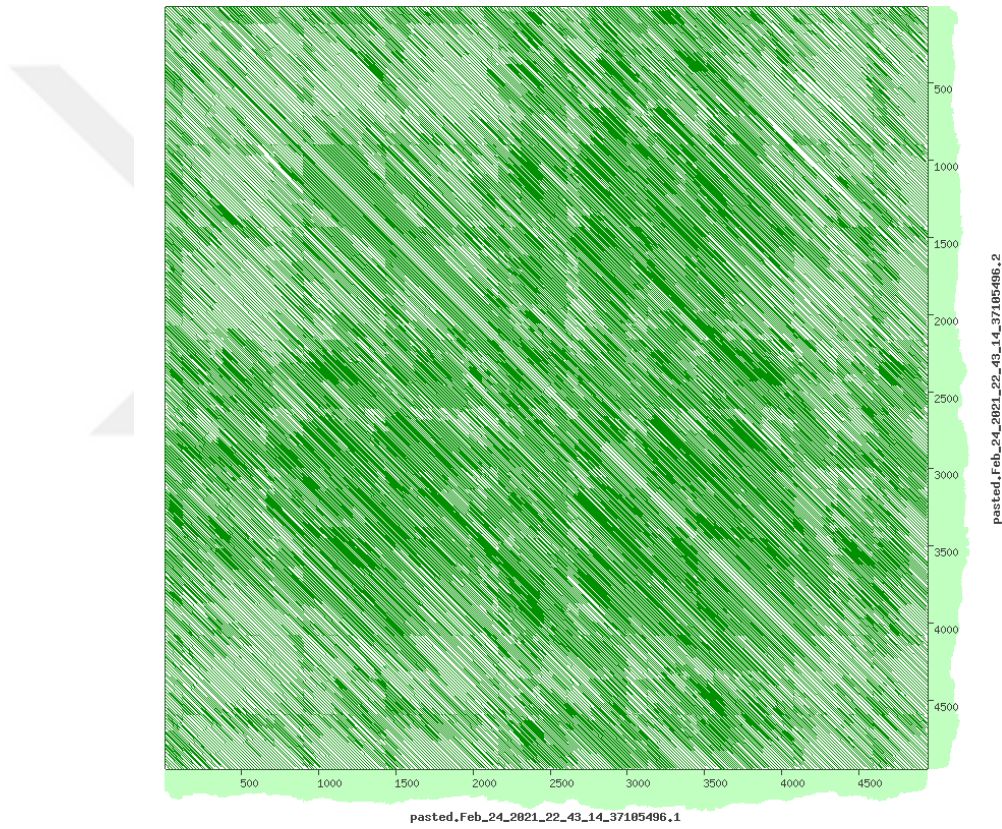
Hizmet alımı olarak elde edilen dizilerin M13 primerleri ve tekrar dizisine spesifik primerleri nükleotit tanıma bölgelerinden arama yapılarak, sentromerik tekrarlayan dizilerin genomik DNA dizi bilgisine Geneious (Kearse vd., 2012) programı kullanılarak ulaşılmıştır. Elde edilen dizi bilgileriyle NCBI Nucleotid BLAST programında tarama yapılarak hangi türlerle dizi benzerliği olduğu bulunmuştur. Sonuçlar doğrultusunda *Astragalus sinicus* CentAs ile dizi bilgilerinin yüksek oranda benzer olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Analizi yapılan dizileme sonuçlarının total uzunluğunu, M13 (ileri, geri) primerlerinden uzaklaştırılmış klonların net uzunluğunu ve NCBI Blast veri sonuçlarını gösteren çizelge (Tek vd., 2011).

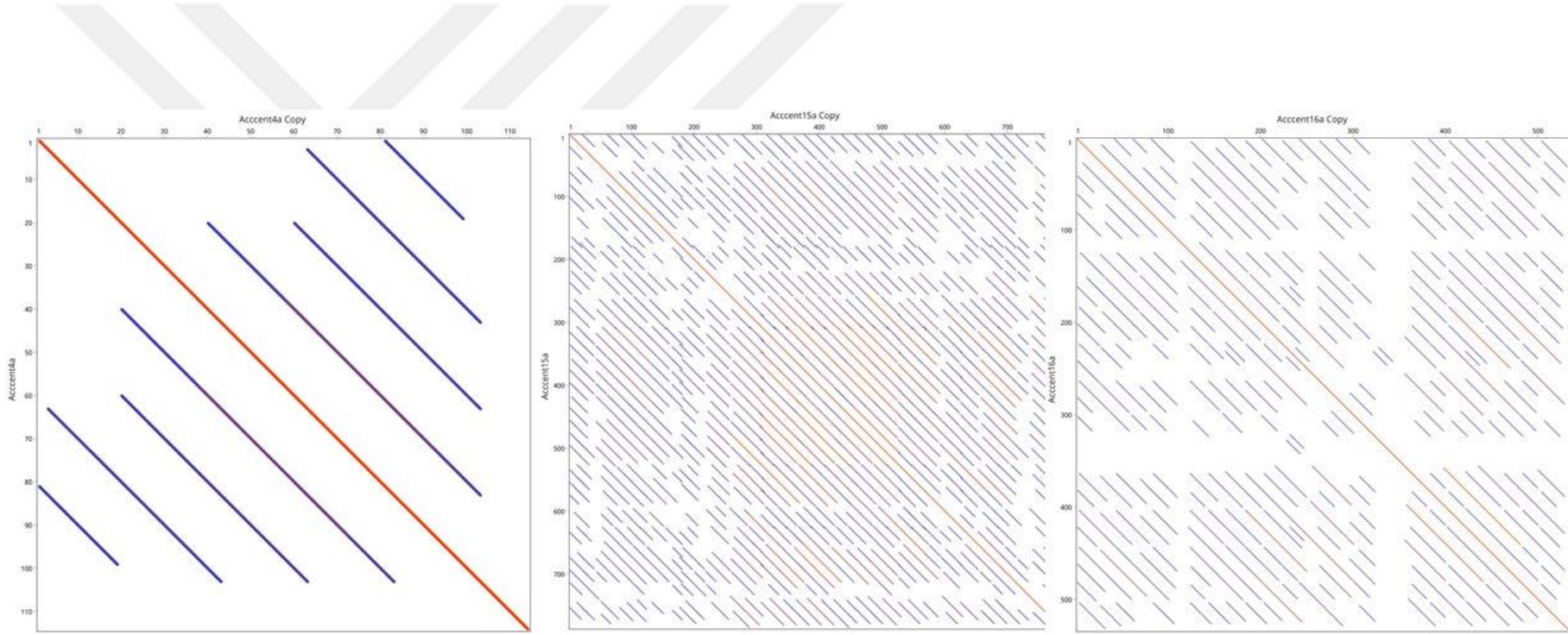
Klon adı	Trimli	Trimsiz	Ham klon uzunluğu	Reverse primer	Forward primer	Klon net uzunluğu (bç)	NCBI Blast Sonucu (<i>Astragalus sinicus</i> ile benzer)
>Acccent4	114	323	1583	+	+	116bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent15	786	993	1528	+	+	788bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent16	534	741	1645	+	+	535bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent18	732	941	1570	+	+	733bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent24	440	647	1593	+	+	441bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent42	523	731	1528	+	+	524bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent67	324	528	1800	--	+	324 bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent77	624	832	1548	+	+	625bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent78	516	723	1526	+	+	516bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31
>Acccent86	353	560	1513	+	+	354bç	CentAs20 CentAs27 CentAs31

Nohut geveni genomundaki sentromerik tekrarlayan dizilerin tespiti dotplot analizi YASS programı (Noe ve Kucherov, 2005) ve Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.8-9-10-11-12).

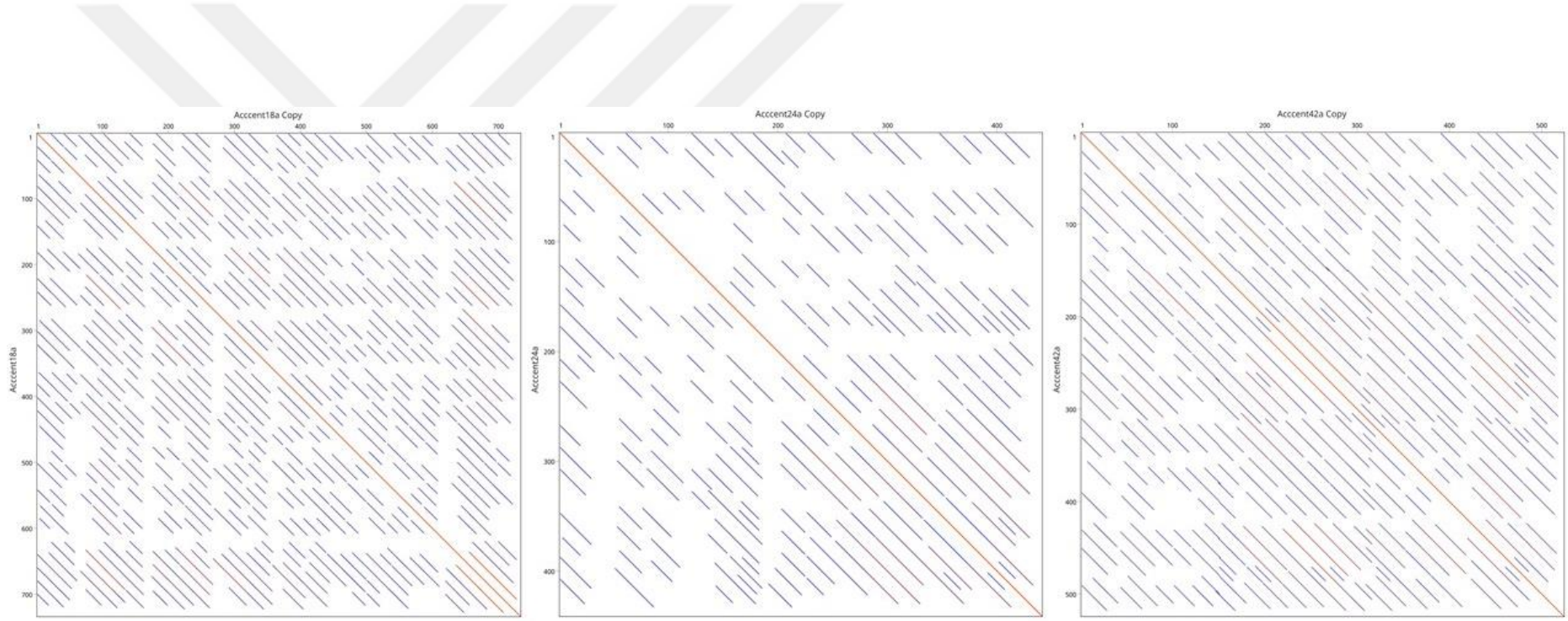
NCBI nükleotit BLAST (BLAST-n) sonucunda elde ettiğimiz veriler nohut geveni sentromerik ardışık tekrar dizilerinin *Astragalus sinicus* bitkisinin sentromerik tekrar dizisiyle benzer olduğunu kanıtlamıştır (Çizelge 4.2). Bunun üzerine Geneious Prime programı kullanılarak *Astragalus sinicus* CentAs20 CentAs27 CentAs31 referans alınarak *Astragalus cicer* L. klonları ile çoklu dizi hizalamaları yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda *Astragalus sinicus* sentromerik tekrar monomerine %95 benzerlikte olan 20 bç monomer uzunluğunda TTCGTCCCATTTCCTCCTAG dizisinin *Astragalus cicer* L. sentromerinde kendini ardışık olarak tekrar ettiği bulunmuştur (Şekil 4.13-14-15-16).



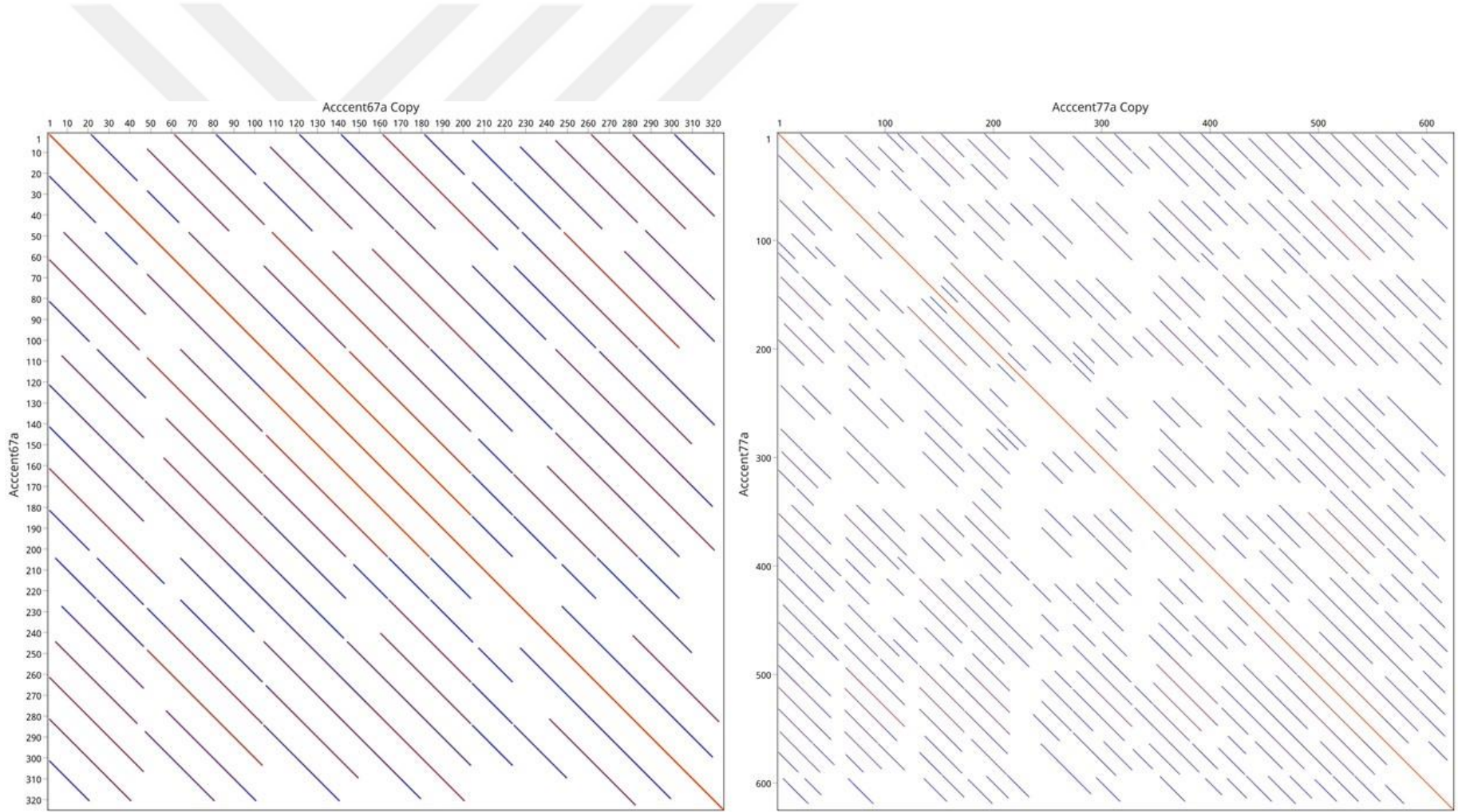
Şekil 4.8. YASS genomic similarity search tool programı ile 10 klonun Dizilerin dotplot ile tekrarlayan dizilerinin karşılaştırmaları (Noe ve Kucherov, 2005). Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir



Şekil 4.9. Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) dizilerin dotplot ile ikili karşılaştırmaları. Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir (Soldan sağa doğru klonlar sırasıyla CentAc4, CentAc15, CentAc16)



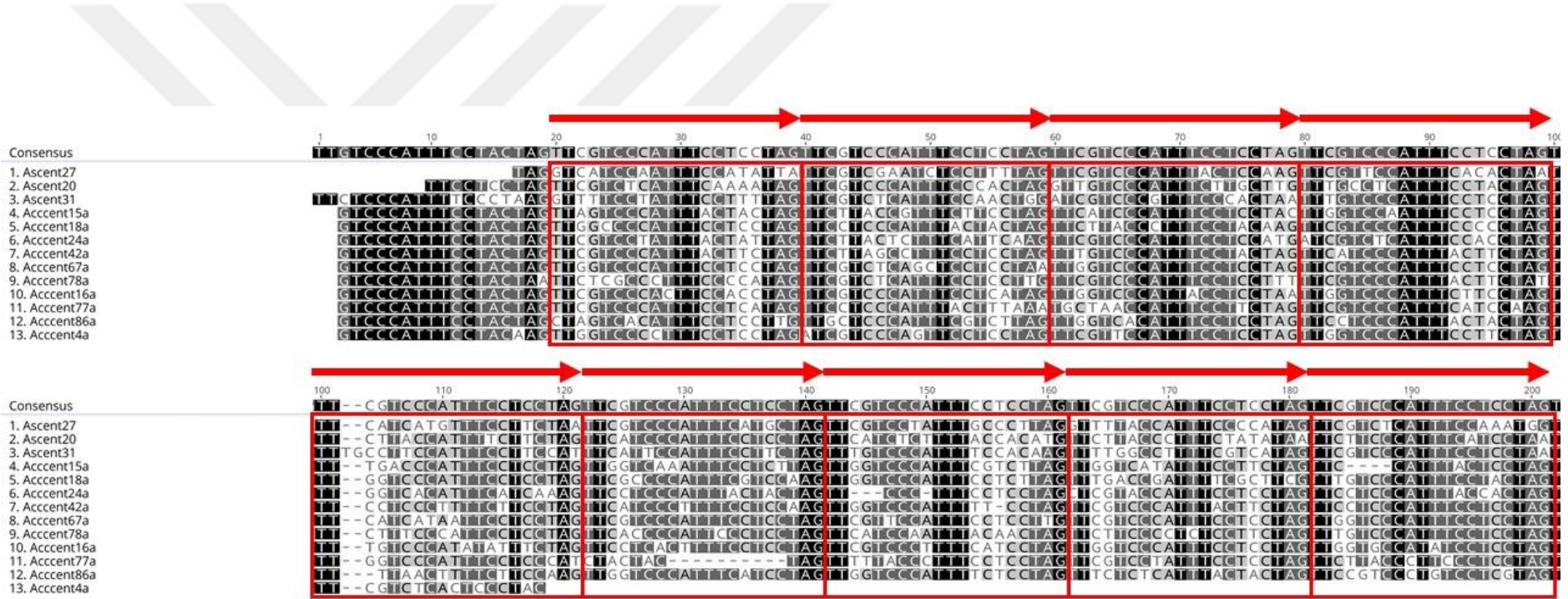
Şekil 4.9. (Devamı) Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) dizilerin dotplot ile ikili karşılaştırmaları. Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir (Soldan sağa doğru klonlar sırasıyla CentAc18, CentAc24, CentAc42)



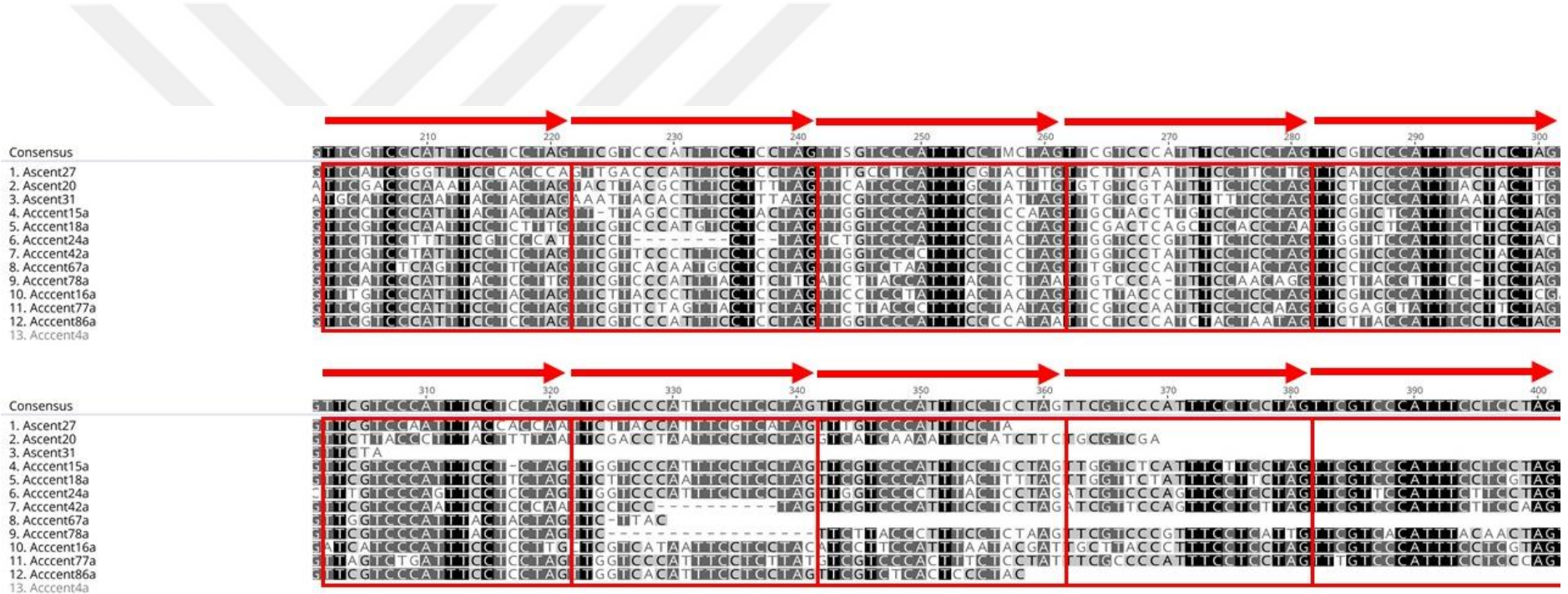
Şekil 4.9. (Devamı) Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) dizilerin dotplot ile ikili karşılaştırmaları. Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir (Soldan sağa doğru klonlar sırasıyla CentAc67, CentAc77)



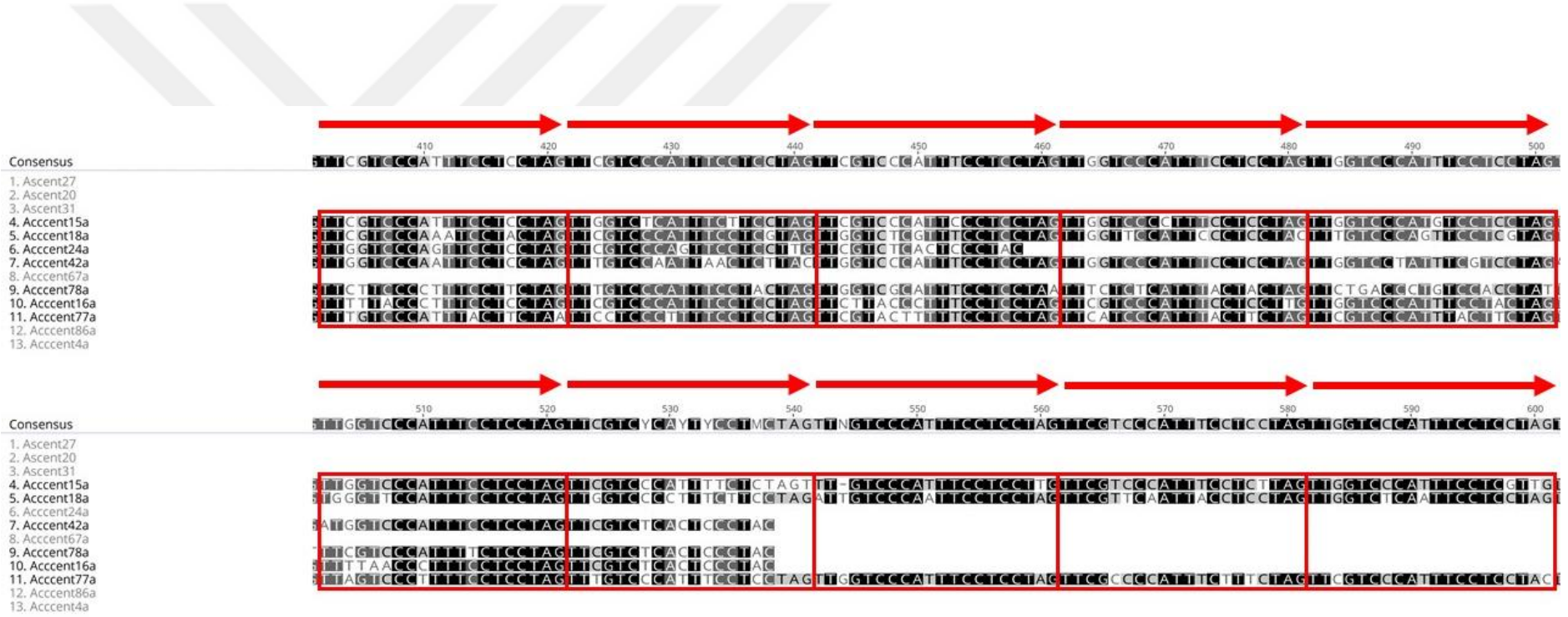
Şekil 4.9. (Devamı) Geneious Prime programı (Kearse vd., 2012) dizilerin dotplot ile ikili karşılaştırmaları. Dotplot hizalamasında, paralel ve üst üste geçmiş noktalar dizilerin yüksek oranda birbirine benzer olduğunu göstermektedir (Soldan sağa doğru klonlar sırasıyla CentAc78, CentAc86)



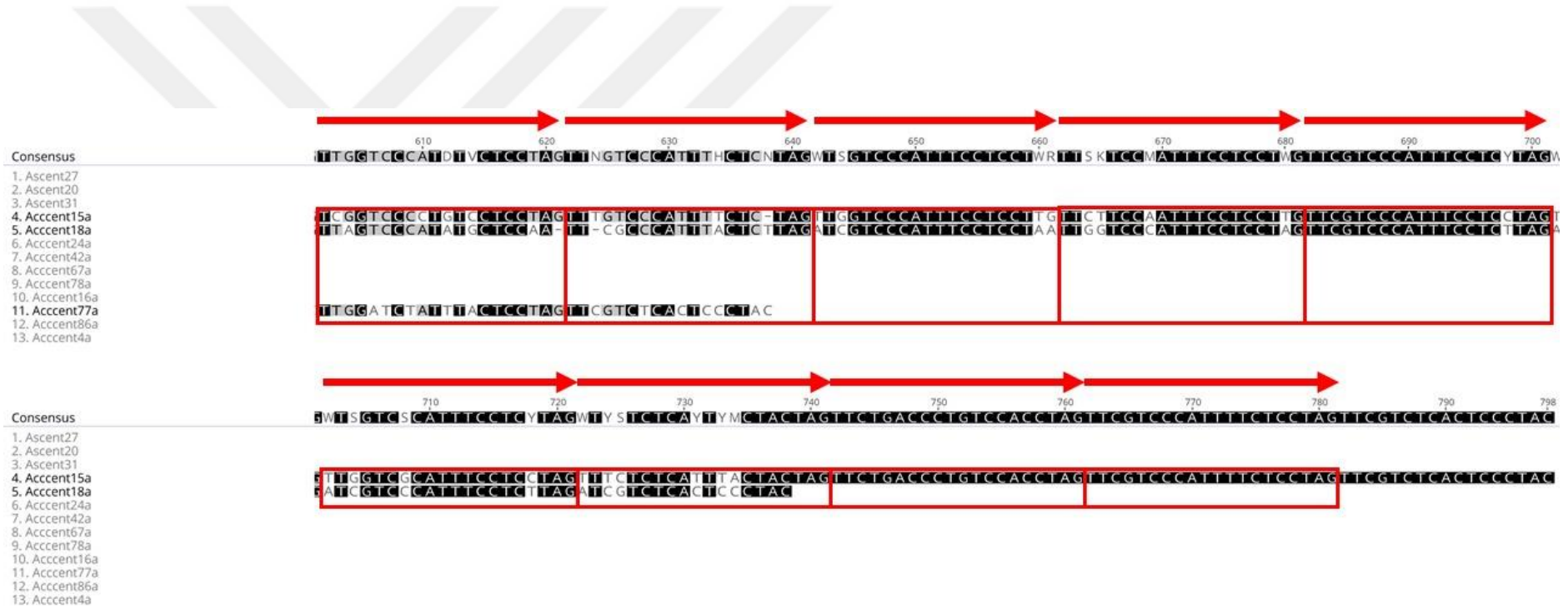
Şekil 4.10. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm *Astragalus cicer* L. klonlarının ve *Astragalus sinicus* da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda *Astragalus cicer* L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamamın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir



Şekil 4.11. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm *Astragalus cicer* L. klonların ve *Astragalus sinicus* da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda *Astragalus cicer* L. sentomerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamamın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir

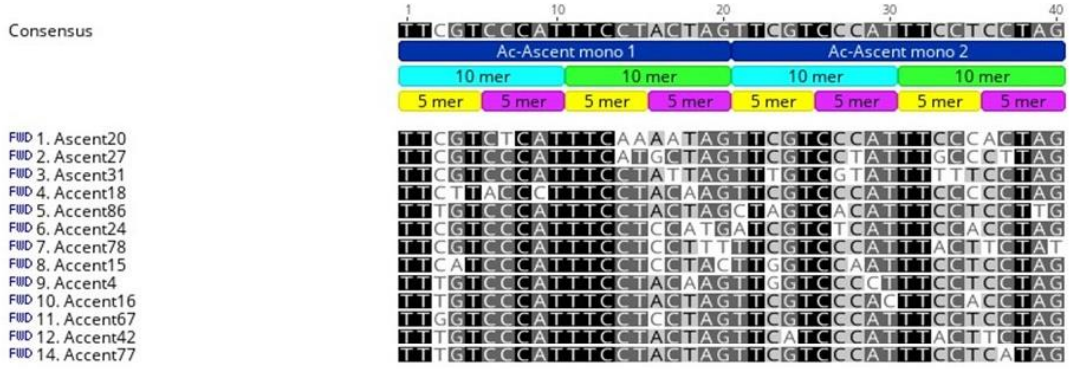


Şekil 4.12. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm *Astragalus cicer* L. klonların ve *Astragalus sinicus* da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda *Astragalus cicer* L. sentromerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir



Şekil 4.13. Geneious Prime programı aracılığıyla tüm *Astragalus cicer* L. klonlarının ve *Astragalus sinicus* da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda *Astragalus cicer* L. sentromerine özgü 20 bç'lik ardışık tekrar dizilerinin analizi (Kearse vd., 2012). Baştan sona bir oryantasyonda düzenlenen dejenere 20 bç monomerler, hizalamanın üstündeki oklarla işaretlenmiştir. Korunan bloklar siyah ve gri olarak gölgelenirken farklı diziler beyaz renkte gösterilir.

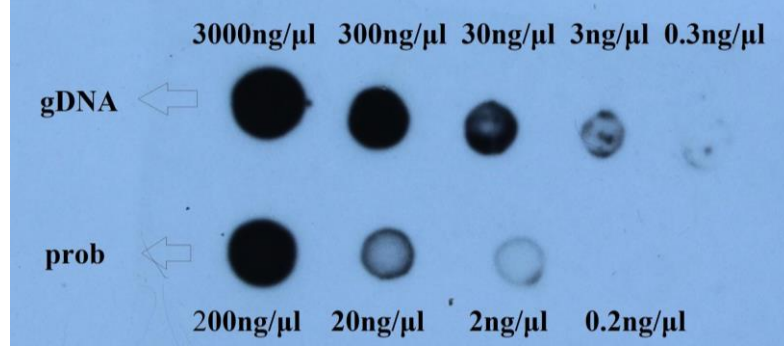
Geneious Prime programı aracılığıyla tüm *Astragalus cicer L.* klonların ve *Astragalus sinicus* da tespit edilen CentAs20, CentAs27, CentAs31 sentromerik tekrar dizilerinin çoklu hizalaması sonucunda *Astragalus cicer L.* sentomerine özgü TTCGTCCCATTTCCTCCTAG dizi bilgisine sahip 20 bç'lik ardışık tekrar dizisi ile *Astragalus sinicus* TTCGTCCCATTTCCTACTAG dizi bilgisine senromerik ardışık tekrar dizi monomerlerinin %95 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Çoklu hizalama sonrası *Astragalus cicer* ve *Astragalus sinicus* 20 bç monomerlerinde tespit edilen 10-mer ve 5-merler

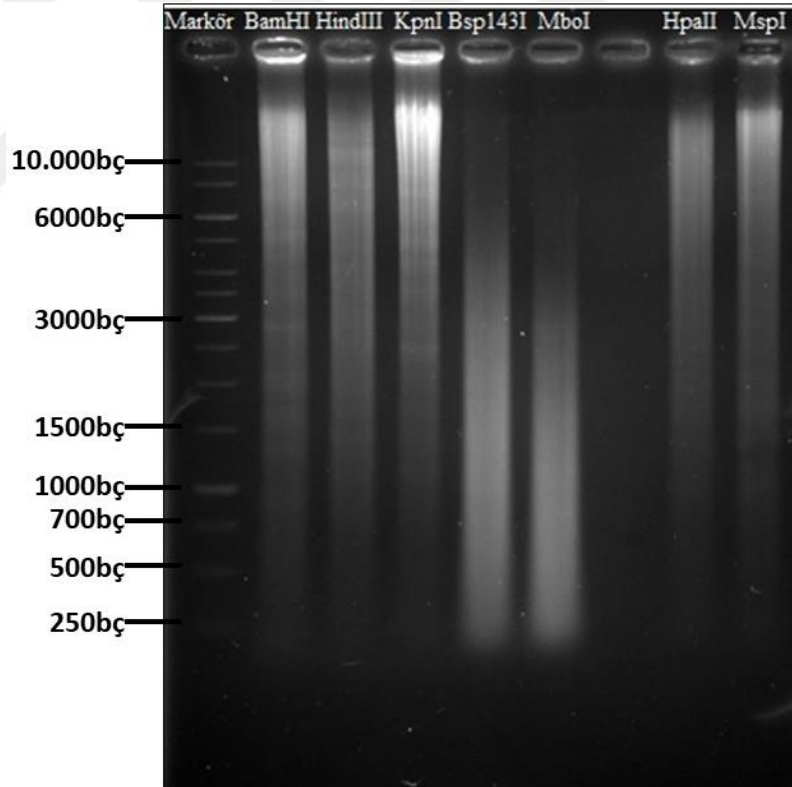
4.9 Southern Hibridizasyon

Southern hibridizasyon yönteminde ilk olarak izole edilen DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve belirli sayı ve uzunlukta DNA fragmentlerinin oluşumu sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılan bu fragmentler (Şekil 4.19) önce yüksek pH'lı kimyasallar ile denatüre edilip hibridizasyon yöntemi ile nitroselüloz filtre üzerine geçirilmiştir. İşaretli denatüre edilmiş ve incelenecek bölgeye özgü prob, filte üzerinde tutulan fragmentler ile uygun koşullar sağlanarak hibridize edilmiştir. Ardından filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilmiştir. Prob yalnızca kendisine tümleyici bazları içeren DNA fragmenti ile hibridize olarak ve otoradyogram sonucu bu bandın üzerinde gözlemlenmiştir.

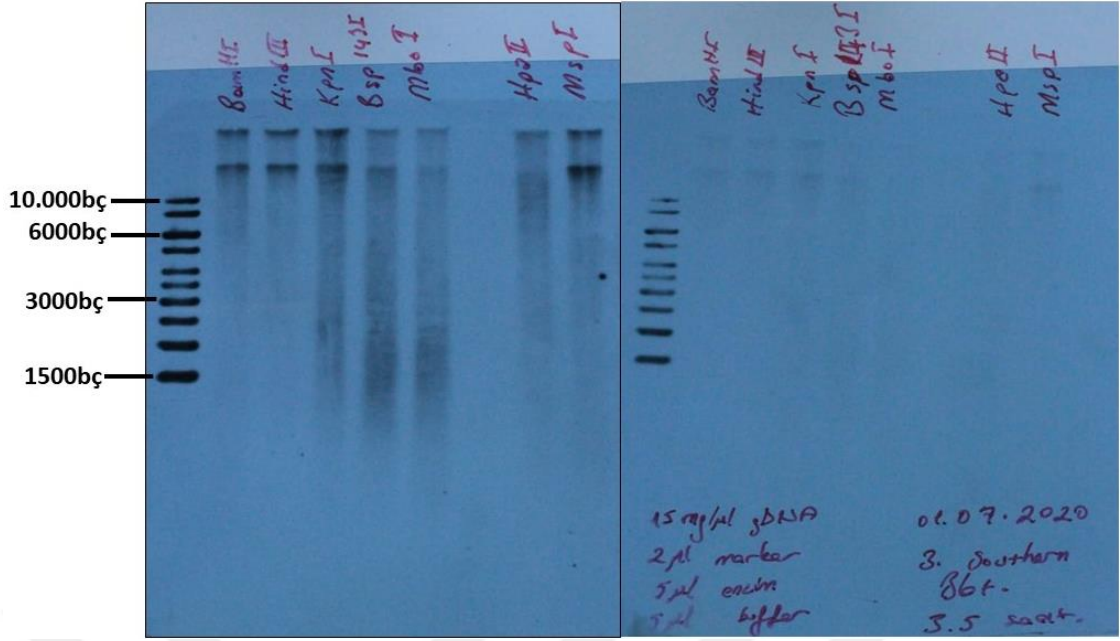


Şekil 4.15. Dot blot tekniği ile prob kontrolü

Southern hibridasyon yapılmadan önce klonumuzdaki tekrar dizilerinin varlığından emin olmak amacıyla ön bir çalışma yapılmıştır. Elde ettiğimiz Dot blot sonucunda klon dizilerinin yüksek oranda tekrar dizisi içerdiği kanıtlanmıştır. Şekil 4.15’de Ac77 klonu ile farklı miktarla yapılan dot blot sonucu verilmektedir.



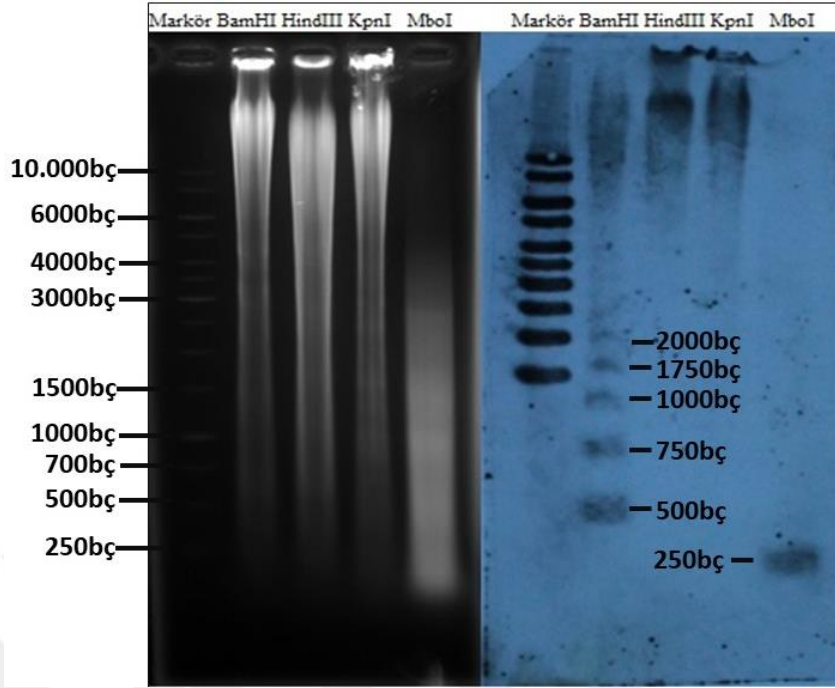
Şekil 4.16. Nohut geveni gDNA’sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü



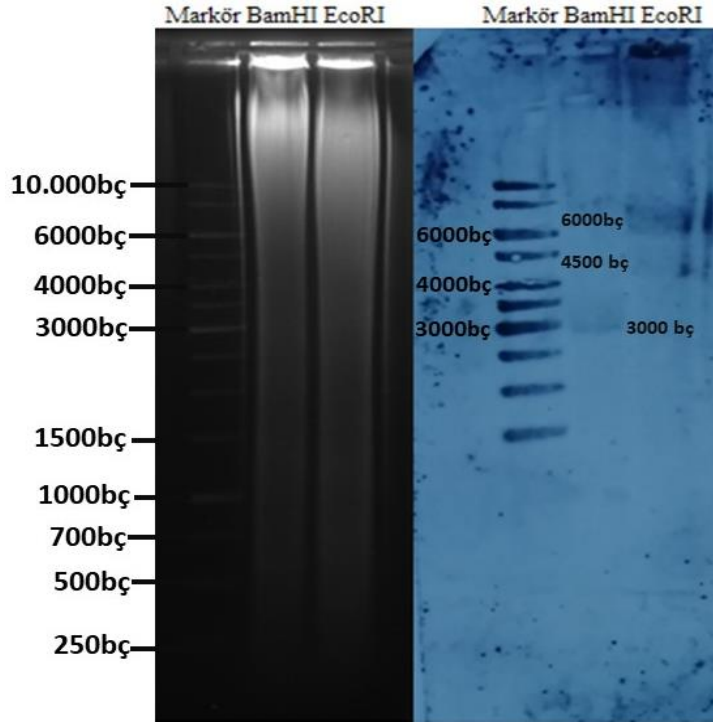
Şekil 4.17. Karanlık oda metodu ile Ac77 klonu prob olarak kullanılarak merdivenvari ardışık ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü. Soldaki film görüntüsünde karanlık odada membrandan filme görüntü aktarımı 20 saatte gerçekleşmiştir. Sağdaki film görüntüsünde ise membrandan filme görüntü aktarımı 3,5 saatte gerçekleştirilmiştir

Birçok kez farklı proplar kullanılarak nohut geveni sentromerik ardışık tekrar bölgeleri karakterize edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu teknikte kullanılan proplar, DNA konsantrasyonu miktarı ve teknikte değişen farklı parametreler sonucunda elde edilen en iyi sonuç teze veri olarak konulmuştur (Şekil 4.17). Southern hibridizasyon film sonucumuzda da gözlemlediğimiz üzere nohut geveni sentromerik tekrar dizileri 20 bç monomer uzunluğuna sahip olup birbiri ardına farklı uzunluktaki monomerlerin bir arada bulunmasından kaynaklı merdivenvari bir görüntü elde edilmiştir. Monomerimizin 20 bç uzunluğunda olması tekrarların birbiri ardına çok yakın gözlemlenmesine neden olmuştur.

Astragalus cicer'da mevcut bulunan sentromerik tekrar dizileri ve aynı zamanda 5S ve 45S rDNA elementleride analiz edilmiştir. 5S rDNA prob olarak kullanılıp *Astragalus cicer* gDNA'sı BamHI ve MboI enzimi ile kesildiğinde ~250 bç olacak şekilde monomer katları halinde ardışık olarak tekrar eden bir desen saptanmıştır (Şekil 4.18). 45S rDNA prob olarak kullanılıp *Astragalus cicer* gDNA'sı BamHI ve EcoRI ile kesim yapıldığında sırasıyla ~3000 bp ve ~4500 bp monomer büyüklükleri tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Nohut geveni gDNA'sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü (a) ve Karanlık oda metodu ile 5S prob kullanılarak merdivenvari ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü (b)



Şekil 4.19. Nohut geveni gDNA'sının Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu %0,8 konsantrasyonluk agaroz jel görüntüsü (a) ve karanlık oda metodu ile 45S prob kullanılarak merdivenvari ardışık tekrarların tespit edildiği X-Ray film görüntüsü (b)

Çizelge 4.3. Southern hibridizasyon analizinde kullanılan membranlar ve parametreleri

Kullanılan membranlar	gDNA miktarı	Restriksiyon enzimleri	Agaroz jel denatürasyonu (1.5M NaCl 5M NaOH)	Jelden membrana aktarımda kullanılan SSC konsantrasyonu	Membran fiksasyonu	Kullanılan prob	Hibridizasyon	Membran yıkaması (20X SSC %10 SDS)	X-Ray film görüntüsü
1. Membran	10µg	TaqI, EcoRI	2x15 dk. 70 RPM	2x SSC	80°C 70dk.	Ac77	65°C 1 gece	65°C'de 10dk. 65°C'de 2x15dk.	3,5 ve 20 saatlik görüntü
2. Membran	15µg	BamHI, HindIII, KpnI, Bsp143I, MboI, HpaII, MspI	2x15 dk. 70 RPM	20x SSC	80°C 70dk.	Ac77 Ac15 5S	65°C 1 gece	65°C'de 10dk. 65°C'de 2x15dk.	-Ac77 probu ile 3,5 ve 20 saatlik görüntü -Ac15 probu ile 20 saatlik görüntü -5S probu ile 20 saatlik görüntü
3. Membran	15µg	EcoRI, Bsp143I, MboI, HpaII, MspI	2x15 dk. 70 RPM	20x SSC	37°C 5 saat	Ac15	65°C 1 gece	65°C'de 10dk. 65°C'de 2x15dk.	3,5 saatlik görüntü 1 gecelik görüntü
4. Membran	15µg	EcoRI, Bsp143I, MboI, HpaII, MspI	2x15 dk. 70 RPM	20x SSC	37°C 5 saat	Ac4	65°C 1 gece	65°C'de 10dk. 65°C'de 2x15dk.	3,5 saatlik görüntü 1 gecelik görüntü
5. Membran	15µg	EcoRI, Bsp143I, MboI, HpaII, MspI	2x15 dk. 70 RPM	20x SSC	37°C 5 saat	Ac77	65°C 1 gece	65°C'de 10dk. 65°C'de 2x15dk.	3,5 saatlik görüntü 1 gecelik görüntü
6. Membran	240µg	BamHI, HindIII, KpnI, MboI	2x30 dk. 70 RPM	20x SSC	80°C 70dk.	Ac15 5S	65°C 1 gece	37°C'de 2x5 dk.	-Ac15 probu ile 2 günlük görüntü -5S probu ile 2 günlük görüntü
7. Membran	240µg	BamHI, EcoRI	2x30 dk. 70 RPM	20x SSC	80°C 70dk.	18S	65°C 1 gece	37°C'de 2x5 dk.	-18S probu ile 2 günlük görüntü

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki genomlarındaki tekrarlayan DNA dizilerinin yüksek oranları ve çeşitliliği, ayrıntılı analizleri ve açıklamaları için önemli metodolojik zorluklar vardır. Bitki genomlarındaki tekrarlayan DNA dizilerinin kapsamlı olarak incelenen model genomların çoğunda bile sınırlı bir şekilde karakterize edilen tekrarların önemli bir yeri vardır. Türler arasında tekrarların analizi yapılırken bu analiz zorlukları daha da belirgin hale gelir. Bu tür çalışmalar, bitkinin evrimsel dinamiklerini aydınlatmak ve bitki genomu boyutu, organizasyonu, ifadesi ve evrimi üzerindeki etkilerini anlamak için önemlidir.

Tekrarlayan DNA dizilerinin aileleri, dizi homolojisi derecelerine, türler arasındaki dağılımlarına, genomik ve fiziksel organizasyonlarına göre farklılaşmaktadır (Kubis vd., 1998, Harrison ve Heslop-Harrison, 1995). Buna binaen tekrarlayan DNA elementleri, genomik organizasyonları ve kromozomlar üzerindeki lokalizasyonları ile ayırt edilen iki ana gruba ayrılmıştır (Kubis vd., 1998). Bu iki ana gruptan birinde tekrarlayan DNA elementleri genomda ardışık olarak bulunurken diğer grupta tekrarlayan DNA elementleri genom boyunca geniş ölçüde dağılmış hâlde bulunmaktadır (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Biscotti vd., 2015). Genomda bulunan dağınık DNA dizileri, özellikle transpozon elementler, tüm genom boyunca geniş ölçüde dağılmış mobil (hareketli) DNA dizileridir (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012). Ardışık tekrarlar ise bir veya birkaç tanımlanmış kromozomal bölgede tekdüze bir şekilde birbirine bitişik olarak sıralanmış kodlanmayan DNA dizileri içeren birimlerdir (Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012). Ardışık tekrarlar, satelit tekrarları, minisatelit ve mikrosatelitler ve ribozomal DNA (rDNA) elementlerini içermektedirler.

Tekrarlayan DNA dizileri türlerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu elementlerin dizi veya kopya numaralarında görülen farklılıklar nedeniyle genom çeşitliliği, genomlar arası uzaklaşma ve bunun sonucu olarak türleşme meydana gelebilmektedir (Karafiátová, 2014). Asma (*Vitis*) genomunun tanımlanması üzerine yapılan çalışmada uygun RFLP markörlerini belirlemek amacıyla tekrarlayan

DNA dizilerinin farklı sınıflarının kullanılmıştır. Sonuç olarak tür içi ve türler arası DNA polimorfizmi gözlemlendiği belirtilmiştir (Thomas vd., 1993). Tekrarlayan DNA dizilerinin bir sınıfı olan mikrosatelitler aynı zamanda önemli bir moleküler markör grubunu oluşturur. Moleküler markörler polimorfik bölgelerin tanımlanmasını sağlar. Böylece bireyler arası seleksiyona katkı sağladığından dolayı bitki ıslahında önemli yer tutmaktadırlar (Yorgancılar vd., 2015). Mikrosatelitler yüksek derecede polimorfizm gösterdiği için arpa (Ramsay vd., 2000), buğday (Song vd., 2005), fasulye (Yu vd., 2000), ayçiçeği (Tang vd., 2002) gibi bitki genomlarında genetik haritalamalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Satelit DNA'lar, sentromer ve telomerler gibi hayati yapıların bir parçası olan yapıcı heterokromatin bölgeleri oluşturan perisentromerik, subtelomerik ve interstitial bölgeler gibi kromozomlarda çeşitli yerlerde bulunabilir (Charlesworth vd., 1994; López-Flores ve Garrido-Ramos, 2012; Brajkovic vd., 2012; Pavlek vd., 2015; Louzada vd., 2020). Yapılan araştırmalar sonucunda çok sayıda kanıt, satDNA'ların sentromer işlevinde, heterokromatin oluşumu ve bakımında ve kromozom eşleşmesinde anahtar rollere sahip olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, kritik kromozomal yapılarla ilişkilerine rağmen satDNA aileleri, yakından ilişkili türler arasında bile şaşırtıcı bir dizi varyasyonu sergileyebilir. Bu DNA dizi varyasyonları, son derece dinamik davranışlarından kaynaklanır ve kısa evrim dönemlerinde dizi kompozisyonunda ve dizi boyutunda hızlı değişikliklere yol açar ve bu da türleşmeye yol açabilmektedir (Wang vd., 2009). Örneğin *Arabidopsis thaliana*'da, sentromerin birincil bileşenleri olan 180 bç satelitler, akrabaları *A. griffithiana*'da ($2n = 32$) 164-bç ile 178-bç arasında ve *A. pumila*'da ($2n = 32$) 167-bç ile 178-bç arasında değişkenlik göstermektedir. Sentromerik DNA'nın şaşırtıcı çeşitliliği ve hızlı evrimi diğer bitkilerde de tespit edilmiştir (Xia vd., 1993; Page vd., 2001; Heslop-Harrison vd., 2003; Lee vd., 2005).

İlginç bir şekilde, bu tez çalışmasında *Astragalus cicer* akrabası olan *Astragalus sinicus* satDNA ailelerin dizi varyasyonu sergilemediği ve bu dizilerin iki akraba tür içinde korunduğunu keşfedilmiştir. *Astragalus sinicus* sentromerine lokalize olan CentAs olarak isimlendirilen sentromerik DNA tekrarları 20 nükleotitlik TTCGTCCCATTTCCTACTAG dizi bilgisine sahip bir monomer boyutuyla AT açısından zengin bir ardışık tekrar içermektedir (Tek vd., 2011). Yaptığımız tez çalışması neticesinde *Astragalus cicer* L. sentromerinde benzer şekilde 20 bç monomer boyutunda AT açısından zengin ardışık tekrar eden bir sentromerik dizi keşfedilmiştir.

Tekrar eden bir birim için yaptığımız dot-plot karşılaştırmaları ve dizi hizalaması sonucunda TTCGTCCCATTTCCTCCTAG dizi bilgisine sahip 20-bç monomer ortaya çıkarılmıştır. Yapılan Southern hibridizasyon moleküler tekniği ile elde ettiğimiz merdivenvari görüntü dizi hizalamaları ve PZR sonuçları ile mukayese edildiğinde ardışık tekrar dizilerimizin varlığını kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.20). Bu kanıtlara binaen keşfettiğimiz ardışık sentromerik DNA dizisini CentAc diye isimlendirilmiştir. İki akraba türün sentromer bölgelerinde bulunan 20 bç monomer ardışık tekrar dizilerine bakıldığında monomerlerin %95 benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.17) Bu verilerden yola çıkarak akraba türler arasında bu kısa ardışık sentromerik tekrar bölgelerinin varyasyona uğramadığı ve bu sentromerik satelit tekrar dizilerinin iki akraba tür içerisinde korunmuş olduğu tespit edilmiştir. Yukarıda bahsettiğimiz üzere sentromerin son derece dinamik davranışları olduğu; dizi kompozisyonunda ve dizi boyutunda hızlı değişikliklere yol açtığını bilinmektedir. Sentromer bu denli dinamik bir yapıya sahipken akraba türler arasında (*Astragalus cicer L.*, *Astragalus sinicus*) ardışık sentromerik tekrarların korunmuş olmasının altında yatan gizem nedir? Sorusunu gündeme getirmektedir.

Hayvan ve bitki sentromerlerindeki hızlı değişimin, sentromerin dinamik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir (Malik ve Henikoff 2001). Fakat yapılan bazı çalışmalarda spesifik olarak, 99-bç motifli, *Drosophila melanogaster* ve 20-bç monomerli *Astragalus sinicus* dahil olmak üzere çeşitli türlerde bulunan sentromer tekrarlarına benzer şekilde, A ve / veya T di- ve trinükleotitlerin 10 bç'lik periyodiklik gösterildiği keşfedilmiştir (Talbert vd., 2018; Tek vd. 2011; Mahajan vd., 2018) DNA çift sarmalının tek bir dönüşü ~10-bç'dir ve WW dinükleotitlerinde (W = A veya T) 10-bç periyodikliğe sahip diziler, sarmalın bükülme enerjisini azaltarak nükleozomların sarılmasını desteklemektedir (Struhl ve Segal 2013). Özellikle, neredeyse tüm pentamer (5-bç) ve dekamer (5-12 bç) *Drosophila melanogaster*; 20-bç *Astragalus sinicus* ve *Astragalus cicer L.* satelitlerinde bulunan WW dinükleotitlerinin 10-bç periyodikliği, nükleozom oluşumu için bir "itici güç" tür ve anafaz sırasında bükülme enerjisini en aza indirerek muhtemelen gerilim altında olabilecek nükleozomları stabilize etmektedir (Prytkova vd. 2011). WW ile başlayan 10-bç periyodikliklerine ve dizilerine ek olarak, sentromer açısından zenginleştirilmiş pentamerlerin ve dekamerlerin her bir yarısının ilginç bir özelliği, hemen hemen hepsinin NNTAG'dan sıfır, bir veya iki baz değişikliği ile türetilbilmesidir. Bu baz dizilimi muhtemelen rotasyonel aşamalardaki dizi

kısıtlamalarını yansıtmaktadır (Talbert vd., 2018). Sentromerlerde kısa tekrarlar yaygın olmasada, *Astragalus sinicus*'un 20-bç sentromerik tekrarı, *Drosophila*'nın 5- ve 10-bç tekrarları ve *Astragalus cicer* da tespit edilen 20-bç sentromerik tekrarı ile aynı önerilen işlevi görebilme ihtimali çok yüksektir (Tek vd. 2011).

Yaptığımız tez çalışmasında sentromerik tekrarlayan DNA dizilerine ek olarak ribozomal DNA (5S ve 18S) varlığında tespit edilmiştir. Bilindiği üzere tekrarlayan DNA elementlerinin genomdaki miktarlarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de Southern Hibridizasyon analizidir. Bu tez çalışmasında southern hibridizasyon yöntemi kullanılarak yalnızca *A. cicer*'da mevcut bulunan tekrar sentromerik tekrar dizisi ve aynı zamanda 5S ve 45S rDNA elementleride analiz edilmiştir. Soya genomik DNA'sının BamHI ile kesimi sonucunda, monomer boyutunun katları halinde tekrar eden merdivenvari bir görüntü gözlemlenmiştir (Gottlob-Mchu vd., 1990). Benzer şekilde yürüttüğümüz bu tez çalışmasında 5S rDNA bir prob olarak kullanıldığından ve *A. cicer* gDNA'sı BamHI enzimi ile kesildiğinde ~250 bp olacak şekilde monomer katları halinde ardışık olarak tekrar eden bir desen saptanmıştır. Asteraceae familyası üzerinde yapılan çalışmada ise farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak 45S ve 5S rDNA elementlerinin genom içerisindeki yapısı tespit edilmiştir (Garcia ve ark., 2010). Asteraceae türlerinde 5S rDNA tekrar dizisinin 500 bp uzunluğunda monomere sahip olduğu, 45S in ise ortalama 2000-3000 bp boyutunda monomeri olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde bu tez çalışmasında BamHI ve EcoRI ile kesim yapıldığında sırasıyla ~3000 bp ve ~4500 bp monomer büyüklükleri tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler ışığında, rDNA elementlerinin doğası gereği ardışık olarak tekrar ettiği literatür bilgileri ile paralel bir şekilde kanıtlamıştır.

Tekrarlayan DNA elementlerinin genomdaki miktarı, dağılımı ve işlevleri genom yapısının daha iyi anlaşılabilmesinde önemli ipuçları vermektedir (Richards and Ausubel 1988, Tek vd. 2011). Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmaları verileri de nohut geveni sentromerik bölgelerinin tanımlanması poliploid orijini hakkında ve poliploidiyi oluşturan genomların dinamikleri hakkında ciddi ipuçları vermektedir. Son yıllarda, sentromer modifikasyonu sayesinde bitki ıslah çalışmalarında haploid bitki üretiminin son derece etkili ve her bitki de kullanılma potansiyeline işaret edilmektedir (Tek vd. 2015). Nohut geveni bitkisi üzerinde amaçla yaptığımız çalışmada moleküler yöntemlerden olan PZR ve Southern hibridizasyon yöntemi kullanılarak, nohut geveni

genomunda sentromerik DNA dizilerinin nükleotit dizi benzerlik ve farklılıklarının genom üzerindeki dağılımı gösterilmiştir. Elde ettiğimiz veriler nohut geveni çalışmaları için önemli bir bilgi açığını kapatacak aynı zamanda genom yapısı için referans teşkil edecek bir çalışma olmuştur. Bu çalışmalar söz konusu bitki ve hayvanların sentromer yapısı için referans çalışmalar oluşturmaktadır.



KAYNAKLAR

Acharya, S.N., Kastelic, J.P., Beauchemin, K.A. and Messenger, D.F., "A review of research progress on cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.)." *Can. J. Plant Sci.* 86, 49-62, 2006.

Adega, F., Guedes-Pinto, H. and Chaves, R., "Satellite DNA in the karyotype evolution of domestic animals—clinical considerations." *Cytogenetic and Genome Research* 126 (1-2), 12-20., 2009.

Alfenito, M. R. and Birchler, J. A., "Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence." *Genetics* 135 (2), 589-597, 1993.

Alzate-Marin, A.L., Cervigni, G.D., Moreira, M.A. and Barros, E. G., "Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja." *Fitopatologia brasileira* 30 (4), 333-342, 2005.

Ananiev, E.V., Phillips, R.L. and Rines, H.W., "Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (22), 13073-13078, 1998.

Ananthawat-Jónsson, K. and Heslop-Harrison, J.S., "Species specific DNA sequences in the Triticeae." *Hereditas* 116 (1-2), 49-54, 1992.

Aniszewski, T., "Canopy behavior of three milkvetch (*Astragalus*) species in acclimation to a new habitat." *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* 52 (1), 45-54. 2010.

Aytaç, Z., "The revision of the section *Dasyphyllium* Bunge of the genus *Astragalus* L. of Turkey", *Turkish Journal of Botany*, 21(1), 31-57, 1997

Azani, N., Bruneau, A., Wojciechowski, M. F. and Zarre, S., “Miocene climate change as a driving force for multiple origins of annual species in *Astragalus* (Fabaceae, Papilionoideae).” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 137, 210-221, 2019.

Bakır, Ö., Eraç, A. ve Özkaynak, İ., Nohut Geveni (*Astragalus cicer L.*) Botanik Özelliği ve Tarımsal Değeri”, *Merkez İkmal Müdürlüğü Basımevi*, Ankara, 1980.

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

Batzer, M. A. and Deininger, P. L. “Alu repeats and human genomic diversity”, *Nature reviews genetics* 3 (5), 370-379, 2002.

Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H. J. and Johnston, J.S., “Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb.”, *Annals of Botany* 91, 547–557, 2003.

Beridze T., Satellite DNA, *Springer-Verlag*, Berlin, 1986.

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

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

Brajkovic, J., Feliciello, I., Bruvo-Mađarić, B. and Ugarković, Đ., “Satellite DNA-Like Elements Associated With Genes Within Euchromatin of the Beetle *Tribolium castaneum*”, *G3: Genes/Genomes/Genetics* 2 (8), 931-941. 2012.

Celniker, S. E., Wheeler, D. A., Kronmiller, B., Carlson, J. W., Halpern, A., Patel, S., Adams, M., Champe, M., Dugan, S. P. and Frise, E., “Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence”, *Genome Biol.* 3 (12), 2002.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. and Stephan, W., “The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes”, *Nature* 371 (6494), 215-220, 1994.

Cheng, Z., Dong, F., Langdon, T., Ouyang, S., Buell, C. R., Gu, M. and Jiang, J., “Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon”, *The Plant Cell* 14 (8), 1691-1704, 2002.

Crollius, H.R., Jaillon, O., Dasilva, C., Ozouf-Costaz, C., Fizames, C., Fischer, C., Bouneau, L., Billault, A., Quetier, F., Saurin, W., Bernot, A. and Weissenbach, J., “Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish tetraodon nigroviridis”, *Genome Research* 10 (7), 939-949, 2000.

Davina, J.R. and Gomez-Sosa, E., “Cariotipo de siete especies del género *Astragalus* (*Leguminosae*) de la Argentina”, *Bol. Soc. Argent. Bot.* 29, 197-201, 1993.

Dopchiz, L.P., E. Gomez-Sosa and L. Poggio, “Karyotype and nuclear DNA content of six species of *Astragalus* (*Leguminosae*)”, *Cytologia* 60, 329-335, 1995.

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

Elgar, G., Clark, M. S., Meek, S., Smith, S., Warner, S., Edwards, Y. J. and Brenner, S., “Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning”, *Genome research* 9 (10), 960-971, 1999.

Ellegren, H., “Microsatellites: simple sequences with complex evolution”, *Nature reviews genetics* 5 (6), 435-445, 2004.

Feliciello, I., Akrap, I. and Ugarković, D., “Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress”, *PLoS Genetics* 11 (8), 2015.

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

Figuroa, D. M. and Bass, H. W., “A historical and modern perspective on plant cytogenetics”, *Briefings In Functional Genomics* 9, 95-102, 2010

Flavell, R.B., Clarke, B.C., Robertson, A. and Jeffreys, A.J., “Repetitive DNA and chromosome evolution in plants”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 312 (1154), 227-242, 1986.

Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J. and Kovarik, A., “Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family”, *BMC plant biology* 10 (1), 1-18, 2010.

Garrido-Ramos, M. A., “Satellite DNA in plants: more than just rubbish”, *Cytogenetic and Genome Research* 146 (2), 153-170, 2015.

Gedik, O., Kürşad, M. and Kiran, Y., “Karyological studies on nine *Astragalus* L. taxa in Turkey”, *Tarım ve Doga Dergisi* 22 (1), 35, 2019.

Gemayel, R., Vences, M. D., Legendre, M. and Verstrepen, K.J., “Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences”, *Annual review of genetics* 44, 445-477, 2010.

Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P. and Varma, H., “A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)”, *Science* 296, 92-100. 2002.

Gottlob-McHugh, S. G. and Johnson, D. A., “Detection of a subfamily of genes within the soybean nodulin-A multigene family”, *Canadian journal of botany* 69 (12), 2663-2669, 1991.

Harrison, G. E. and Heslop-Harrison, J. S., “Centromeric repetitive DNA sequences in the genus Brassica”, *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 90 (2), 157-165, 1995.

Havecker, E. R., Gao, X. and Voytas, D. F., “The diversity of LTR retrotransposons”, *Genome biology* 5 (6), 1-6, 2004.

Heckmann, S., Macas, J., Kumke, K., Fuchs, J., Schubert, V., Ma, L., Novák, P., Neumann, P., Taudien, S., Platzer, M. and Houben, A., “The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization”, *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 73 (4), 555-565, 2013.

Hemleben, V., Volkov, R. A., Zentgraf, U. and Medina, F. J., “Molecular Cell Biology: Organization and Molecular Evolution of rDNA, Nucleolar Dominance, and Nucleolus Structure.”, in: K. Esser, U. Lüttge, W. Beyschlag., ve J. Murata (Ed.), *Progress in Botany: Genetics Physiology Systematics Ecology*, *Springer*, 2004.

Heitkam, T., Petrasch, S., Zakrzewski, F., Kögler, A., Wenke, T., Wanke, S. and Schmidt, T., “Next-generation sequencing reveals differentially amplified tandem repeats as a major genome component of Northern Europe’s oldest *Camellia japonica*”, *Chromosome Research* 23 (4), 791-806, 2015.

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

Heslop-Harrison, J.S., Brandes, A. and Schwarzacher, T., “Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of Arabidopsis species”, *Chromosome Res.* 11, 241-253, 2003.

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

Hunt, O. J. and Wanger, R. E., “Effects of phosphorus and potassium fertilizers on legume compositions of seven grass-legume mixtures.” *Agronomy Journal* 55 (1), 16-19, 1963.

Iglesias, N. and Moazed, D., “Heterochromatin: Silencing repetitive DNA”, *Elife* 6, e29503, 2017.

International Human Genome Consortium, “Initial sequencing and analysis of the human genome.” *Nature* 409, 860–921, 2001.

İlçim, A. and Behçet, L., “Astragalus topalanense (*Fabaceae*), a new species from Turkey”, *Turkish journal of botany* 40 (1), 74-80, 2016.

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

Kalendar, R., Vicient, C. M., Peleg, O., Ananthawat-Jonsson, K., Bolshoy, A. and Schulman, A. H., “Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes”, *Genetics* 166 (3), 1437-1450, 2004.

Kamm, A., Galasso, I., Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J. S., “Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species”, *Plant molecular biology* 27 (5), 853-862, 1995.

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

Karakurt E., “Ankara kıraç koşullarında nohut geveni (*Astragalus cicer* L.) hat ve çeşitlerinde ot verimi ile bazı tarımsal özellikler”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 10, 75, 2004.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. and Thierer, T., “Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data”, *Bioinformatics* 28 (12), 1647-1649, 2012.

Kıvçak M.S., “Astragalus-Geven”, *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University|Istanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 6, 76-79, 1956.

King, K., Torres, R. A., Zentgraf, U. and Hemleben, V., “Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of cucurbitaceae”, *Journal of Molecular Evolution* 36 (2), 144-152, 1993.

Koo, D. H., Hong, C. P., Batley, J., Chung, Y. S., Edwards, D., Bang, J. W. and Lim, Y. P., “Rapid divergence of repetitive DNAs in Brassica relatives”, *Genomics* 97 (3), 173-185, 2011.

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

Kubis, S., Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J. S., “Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes”, *Annals of Botany* 45-55, 1998

Kuhn, G. C. S., Küttler, H., Moreira-Filho, O. and Heslop-Harrison, J. S., “The 1.688 repetitive DNA of Drosophila: Concerted evolution at different genomic scales and association with genes”, *Molecular Biology and Evolution* 29 (1), 7-11, 2012.

Latterell, R. L. and Townsend, C. E., “Meiotic analysis of Astragalus cicer L. II. Polyhaploids”, *International Journal of Plant Sciences* 155 (4), 475-480, 1994.

Lee, H.R., Zhang, W.L., Langdon, T., Jin, W.W., Yan, H.H., Cheng, Z.K. and Jiang, J.M., “Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in Oryza species”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11793, 11798, 2005.

Le, K. D. and Carlyle, C. N., “A non-native agronomic legume (*Astragalus cicer* L.) alters multiple ecosystem-services in mixed prairie grassland”, *Biological Invasions* 21 (3), 935-946. 2019.

Legendre, M., Pochet, N., Pak, T. and Verstrepen, K. J., “Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability”, *Genome Research* 17 (12), 1787-1796, 2007.

Levdansky, E., Romano, J., Shadkchan, Y., Sharon, H., Verstrepen, K. J., Fink, G. R. and Osherov, N., “Coding Tandem Repeats Generate Diversity in *Aspergillus fumigatus* Genes”, *Eukaryotic Cell* 6 (8), 1380-1391, 2007.

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

Liston, A., “Chromosome counts in *Astragalus* (Fabaceae)”, *Madroño* 37, 59-60, 1990.

Louzada, S., Lopes, M., Ferreira, D., Adegas, F., Escudeiro, A., Gama-Carvalho, M. and Chaves, R., “Decoding the Role of Satellite DNA in Genome Architecture and Plasticity-An Evolutionary and Clinical Affair”, *Genes* 11 (1), 2020.

López-Flores, I. and Garrido-Ramos, M. A., “The repetitive DNA content of eukaryotic genomes”, *Genome Dynamics* 7, 1-28, 2012.

Macas, J., Mészáros, T. and Nouzová, M., “PlantSat: A specialized database for plant satellite repeats”, *Bioinformatics* 18 (1), 28-35, 2002.

Macas, J., Kejnovský, E., Neumann, P., Novák, P., Koblížková, A. and Vyskot, B., “Next generation sequencing-based analysis of repetitive dna in the model dioecious plant *Silene latifolia*”, *Plos One* 6 (11), e27335, 2011.

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

Mahajan, S., Wei, K. H.-C., Nalley, M. J., Gibilisco, L. and Bachtrog, D., “De novo assembly of a young *Drosophila* Y chromosome using single-molecule sequencing and chromatin conformation capture”, *PLOS Biology* 16 (7), 2018.

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

Matyášek, R., Dobešová, E., Húska, D., Ježková, I., Soltis, P. S., Soltis, D. E. and Kovařík, A., “Interpopulation hybridization generates meiotically stable rDNA epigenetic variants in allotetraploid *Tragopogon mirus*”, *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 85 (3), 362-377, 2016.

Mayer, K. F. X., Waugh, R., Langridge, P., Close, T. J., Wise, R. P., Graner, A., Matsumoto, T., Sato, K., Schulman, A., Muehlbauer, G. J., Stein, N., Ariyadasa, R., Schulte, D., Poursarebani, N., Zhou, R., Steuernagel, B., Mascher, M., Scholz, U. and Shi, B., “Writing and editing of the manuscript. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome”, *Nature* 491 (7426), 2012.

McClintock, B., “The origin and behavior of mutable loci in maize”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36 (6), 344-355, 1950.

Mehrotra, S., and Goyal, V., "Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function", *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12(4), 164-171.

Meyers, B. C., Tingey, S. V. and Morgante, M., “Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome”, *Genome Research* 11, 1660–1676, 2001.

Miller, D.A. and Hoveland, C.S., “Other temperate legumes”, *Forages* 1, 273-281, 1995.

Morgante, M., Hanafey, M. and Powell, W., “Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes”, *Nat Genet* 30, 194–200, 2002.

Murata, M., Ogura, Y. and Motoyoshi, F., “Centromeric repetitive sequences in *Arabidopsis thaliana*”, *Idengaku Zasshi* 69(4), 361-370, 1994.

Nagaki, K., Talbert, P. B., Zhong, C. X., Dawe, R. K., Henikoff, S. and Jiang, J., “Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres”, *Genetics* 163 (3), 1221-1225, 2003.

Noe, L. and Kucherov, G., “YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search”, *Nucleic acids research* 33 (suppl_2), W540-W543, 2005.

Ohshima, K. and Okada, N., “SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail”, *Cytogenetic and genome research* 110 (1-4), 475-490, 2005.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. and Vieira, M. L. C., “Origin, evolution and genome distribution of microsatellites”, *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2), 294-307, 2006.

Osaloo, S. K., Maassoumi, A. A. and Murakami, N., “Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences”, *Plant Systematics and Evolution* 2003.

Page, B.T., Wanous, M.K. and Birchler, J.A., “Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere”, *Genetics* 159, 291-302, 2001.

Pavlek, M., Gelfand, Y., Plohl, M. and Meštrović, N., “Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms”, *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 22 (6), 387-401, 2015.

Pavlova, D. K. and Kozuharov, S.I., “Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms”, *Fitologija* 44, 75, 1993.

Plohl, M., Meštrović, N. and Mravinac, B., “Satellite DNA evolution. In Repetitive DNA”, *Karger Publishers* 7, 126-152, 2012.

Plohl, M., Meštrović, N. ve Mravinac, B., “Centromere identity from the DNA point of view”, *Chromosoma* 123 (4), 313-325, 2014.

Posler, G. L., Lenssen, A. W. and Fine, G. L., “Forage yield, quality, compatibility, and persistence of warm-season grass—legume mixtures”, *Agronomy Journal* 85 (3), 554-560, 1993.

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

Prytkova, T. R., Zhu, X., Widom, J. and Schatz, G. C., “Modeling DNA-bending in the nucleosome: role of AA periodicity”, *The Journal of Physical Chemistry B*. 115 (26), 8638-8644, 2011.

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

Rhodes, I., “The growth and development of some grass species under competitive stress”, *The Journal of the British Grassland Society* 23 (4), 330-335, 1968.

Richards, E. J. and Ausubel, F. M., “Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*”, *Cell* 53, 127-136, 1988.

Richard, G. F. and Dujon, B., “Molecular evolution of minisatellites in hemiascomycetous yeasts”, *Molecular Biology and Evolution* 23 (1), 189-202, 2006.

Richard, G., F., Kerrest, A. and Dujon, B., “Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72 (4), 686-727, 2008.

Saha, S., Bridges, S., Magbanua, Z. V. and Peterson, D. G., “Computational approaches and tools used in identification of dispersed repetitive DNA sequences”, *Tropical Plant Biology* 1 (1), 85-96, 2008a.

Saha, S., Bridges, S., Magbanua, Z. V. and Peterson, D. G., “Empirical comparison of ab initio repeat finding programs”, *Nucleic acids research* 36 (7), 2284-2294, 2008b.

Saini, A. and Jawali, N., “Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications”, *Plant Systematics and Evolution* 280 (3), 187, 2009.

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

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B. and Jackson, S. A., “Genome sequence of the palaeopolyploid soybean”, *Nature* 463 (7278), 178-183, 2010.

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

Shapiro, J. A. and von Sternberg, R., “Why repetitive DNA is essential to genome function”, *Biological Reviews* 80 (2), 227-250, 2005.

Sheidai, M., Shahin, Z. and Jalal, I., “New chromosome number reports in tragacanthic Astragalus species”, *Caryologia* 62 (1), 30-36, 2009.

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

Smoliak, S. and Hanna, M. R., “Seedling competition of some forage legumes in mono- and mixed culture under greenhouse conditions”, *Canadian Journal of Plant Science* 57 (3), 897-903, 1977.

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

Spellenberg, R., “Chromosome numbers and their cytotaxonomic significance for North American Astragalus (Fabaceae)”, *Taxon* 463-476, 1976.

Spellenberg, R., “Chromosome numbers and their cytotaxonomic significance for North American Astragalus (Fabaceae)”, *Taxon*, 25, 463-472, 1981.

Stroh, J. R., Carleton, A. E. and Seamands, W. J., “Management of *Lutana cicer* milkvetch for hay, pasture, seed and conservation uses”, *Bulletin 666, Montana Agric. Exp. Sta.*, Montana State University, Bozeman, MT. 1973.

Struhl, K. and Segal, E., “Determinants of nucleosome positioning”, *Nature structural & molecular biology* 20 (3), 267, 2013.

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

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

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

Talbert, P. B., Kasinathan, S. and Henikoff, S., “Simple and complex centromeric satellites in Drosophila sibling species”, *Genetics* 208 (3), 977-990, 2018.

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

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

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

Tek, A. L., Stupar, R.M. and Nagaki, K., “Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding”, *Turk J Agric For* 39, 557- 562, 2015.

Thieman, W, J. and Palladino, M, A., *Biyoteknolojiye Giriş*, Editör Tekeoğlu, Mücella., *Palme Yayıncılık*, 2013.

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

Toth, G., Gáspári, Z. and Jurka, J., “Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis”, *Genome research* 10 (7), 967-981, 2000.

Townsend, C. E., “Self-compatibility studies with *Astragalus cicer* L.”, *Crop Sci.* 11, 769–770, 1971.

Townsend, C. E., “Breeding, physiology, culture, and utilization of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.)”, *Advances in Agronomy* 49, 253-308, 1993.

Tucker, S., Vitins, A. and Pikaard, C. S., “Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing”, *Current Opinion in Cell Biology* 22 (3), 351-356, 2010.

Ünal, S. ve Eraç, A., “Nohut geveni (*Astragalus cicer* L.) ayırık (*Agropyron* Gaertn.) ekimi karışım oranlarının yem verimi ve botanik kompozisyona etkileri üzerinde araştırmalar”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 9,32, 2000.

Ünal, S. ve Fırıncıoğlu, H. K., “Kıraç şartlarda yetiştirilen nohut geveni populasyonunda bazı fenolojik ve morfolojik özelliklerin belirlenmesi üzerine bir araştırma”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2002.

Vergnaud, G. and Denoeud, F., “Minisatellites: Mutability and genome architecture”, *Genome Research* 10 (7), 899-907, 2000.

Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Borisjuk, N. V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., and Hemleben, V., “Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*”, *BMC Plant Biology*, 17 (1), 21, 2017.

Vukich, M., Giordani, T., Natali, L. and Cavallini, A., “Copia and Gypsy retrotransposons activity in sunflower (*Helianthus annuus* L.)”, *BMC Plant Biology* 9 (1), 1-12, 2009.

Yorgancılar, M., Yakışır, E. and Erkoyuncu, M.T., "Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı", *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12,

2015. Wang, G., Zhang, X. and Jin, W., “An overview of plant centromeres”, *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 36 (9), 529-537, 2009.

Willard, H. F., “Centromeres: the missing link in the development of human artificial chromosomes”, *Current opinion in genetics & development* 8 (2), 219-225, 1998.

Wu, J., Yamagata, H., Hayashi-Tsugane, M., Hijishita, S., Fujisawa, M., Shibata, M. and Sasaki, T., “Composition and structure of the centromeric region of rice chromosome 8”, *The Plant Cell* 16 (4), 967-976, 2004.

Wu, W., Yang, Y.-L., He, W.-M., Rouard, M., Li, W.-M., Xu, M., Roux, N. and Ge, X.-J., “Whole genome sequencing of a banana wild relative *Musa itinerans* provides insights into lineage-specific diversification of the *Musa* genus”, *Scientific Reports* 6 (1), 2016.

Xia, X., Selvaraj, G. and Bertrand, H. “Structure and evolution of a highly repetitive DNA sequence from *Brassica napus*”, *Plant molecular biology* 21 (2), 213-224, 1993.

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

Yang J. and Li F., “Are all repeats created equal? Understanding DNA repeats at an individual level”, *Curr Genet* 63, 57-63, 2017.

Young, E. T., Sloan, J. S. and Van Riper, K., “Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics* 154 (3), 1053-1068, 2000.

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

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y. and Zhang, X., “A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)”, *Science* 296, 79–92, 2002.

Zastrow- Hayes, G. M., Lin, H., Sigmund, A. L., Hoffman, J. L., Alarcon, C. M., Hayes, K. R., Richmond, T. A., Jeddeloh, J. A., May, G. D. and Beatty, M. K., “Southern- by- Sequencing: a robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops”, *The Plant Genome* 8 (1), 2015.

Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, L., Li, Y., Lu, T., Lu, Y. and Han, B., “Structural features of the rice chromosome 4 centromere”, *Nucleic acids research* 32 (6), 2023-2030, 2004.

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

Zhu, X. Y. and Ohashi, H., “Systematics of Chinese *Oxytropis* DC. (Leguminosae)”, *Cathaya* 11-12, 1- 218, 2000.

EKLER

EK-A *Astragalus cicer L.* bitkisinden elde edilen klon dizi bilgisi.

>Accent4

GTCCCATTTCTACAAGTTGGTCCCCTTTCCTCCTAGATCGTCCCAGTTCCTC
CTAGTTCGTTCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTTCTAGTTCGTCTCA
CTCCCTAC

>Accent15

GTCCCATTTCTACTAGTTAGTCCCATTACTACTAGTTCTTACCGTTTCTTC
CTAGTTCATCCCATTTCCTCCTACTTGGTCCAATTTCCTCCTAGTTTGACCCA
TTTCCTCCTAGTTGGTCAAATTTCTCCTTAGTTGGTCCCATTTCGTCTTAGTT
GGTCATATTTCTTCTAGTTCCATTTACTCCTAGTTCCTCCCATTACTACTA
GTTTTAGCCTTTCCTACTAGTTGGTCCCATTTCCTCCAAGTTGCTACCTTGTC
CTCCTAGTTCGTCTCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCC
CATTTCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCTCATTCTCCTAGT
TCGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCTCATTCTT
CCTAGTTCGTCCCATTCCCTCCTAGTTGGTCCCCTTTCCTCCTAGTTGGTCCC
ATGTCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTTCTCTAGTTT
GTCCCATTTCCTCCTTGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCG
TTGTCGGTCCCCTGTCCTCCTAGTTTGTCCCATTTTCTCTAGTTGGTCCCATT
CCTCCTTGTCTTCCAATTTCTCCTTGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCC
GCATTTCTCCTAGTTTCTCTCATTACTACTAGTTCTGACCCTGTCCACCTA
GTTTCGTCCCATTTTCTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

>Accent16

GTCCCATTTCTACTAGTTCGTCCCCTTCCACCTAGTTCGTCCCATTTCCTC
ATAGTTGGTCCCATTACCTCCTAATTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTTGTCCCA
TATATTTCTAGTTCCTCACTTTTCCTCCTAGTTCGTCCCCTTTTCATCCTAGTTG
GTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTGCCATATCCTCCTAGTTTGTCCCATTTCCTA
CTAGTTCCTTACCCTTTCCTCCTAGTTTCCTCCTATTTACTACTAGTTCTTACCCT

TTCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTCGATCATCCCATTTCCTCCTTGCTCG
TCATAATTCTCCTACATCCTTCCATTTAATACGATTGCTTACCCTTTCCTCC
TAGTTCGTCCCATTTCCTCGTAGTTTTTACCCTTTCCTCCTAGTTCGTCCCATT
TCCTCCTAGTTCTTACCCTTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTTGTGGT
CCCATTTCCTACTAGTTTTAACCCTTTCCTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

>Accent18

GTCCCATTTCCTACTAGTTGGCCCCATTTCCTCCTAGTTCCTCCCATTACTA
CTAGTTCTTACCCTTTCCTACAAGTTCGTCCCATTTCCCCCTAGTTGGTCCCA
TTTCCTCCTAGTTCGCCCCATTTCGTCCAAGTTGGTCCCATTTCCTCTTAGTT
TGACCGATTTTCGCTTCGTTTGTCCCATTTCCTACTAGTTCGTCCCAATTCT
CTTTGTTTCGTCCCATGTCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGACTC
AGCTCCACCTAATTGGTCTCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTTCTAGT
TCTTCCAATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTACTTTTACTTGGTTCTATTTCCT
TCTAGTTCGTCCCATTTCCTCGTAGTTCGTCCCAAATCCTACTAGTTCGTCCC
ATTCCTCGTAGTTGGTCTCGTTTCCTCCTAGTTGGTTCATTCCCTCCTACTT
TGTCCCAGTTCCCTCGTAGTGGGTTCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCCTTTCTT
CCTAGATTGTCCCAATTTCCTCCTAGTTCGTTCAATTACCTCCTAGTTGGTCTC
AATTCTCCTAGTTAGTCCCATATGCTCCAATTCGCCATTACTCTTAGATC
GTCCCATTTCCTCCTAATTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCT
TAGATCGTCCCATTTCCTCTTAGATCGTCTCACTCCCTAC

>Accent24

GTCCCATTTCCTACTAGTTCGTCTATTTACTATTAGTTCTTACTCTTTCATTC
AAGTTCGTCCCATTTCCTCCATGATCGTCTCATTTCACCTAGTTGGTACAT
TTCATCAAAGTTCCCTCCCATTACTACTAGTTCCCTTTCCTCCTAGCTCGTAC
CATTTCCTCCTAGTTCCCTCCCATTACCCTAGTTCTTCCTTTTTTCGTCCCATT
TCCTCTTAGTCTGTCCCATTTCCTACTAGTTGGTCCCGTTTTCTCCTAGTTGG
TTCCATTTCCTCCTACTTTGTCCCAGTTCCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCT
AGTTGGTCCCCTTTACTCCTAGATCGTCCCAGTTCCCTCCTAGTTCGTTCCATT
TCTTCCTAGTTGGTCCCAGTTCCCTCCTAGTTCGTCCCAGTTCCCTCCTTGTTCG
TCTCACTCCCTAC

>Accent42

GTCCCATTTCCCTACTAGTTCGTCCCATTACTTCTAGTTCCTAGCCTTTCCTCC
TAGTTTGTCCCATTTCCTACTAGTTCATCCCATTACTTCTAGTTCCTCCCTTT
TCTTCCTAGTTCATCCCTTTTCCCTCCAAGTTGGTCCCATTTTTCTAGTTCGTG
CCATTTACTTCTAGTTCCTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCTATTTCCCTCCTAG
TTCGTTCCCTTTCCCTCCTAGTTGGTCCCCTTTCCCTCCTAGTTGGTCCCTATTTCC
TCCTAGTTCGTCCCATTTCCTACTAGTTCGTCCCAATTCCTCCCAATTCCTCC
TAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGATCGTTCCAGTTCCTCCTAGTTCGTCCCAT
TTCTTCCAAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTTGTCCAATTA ACTCTTACTTG
GTCCCATTTCCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCTATTTTCGT
CTAGATGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

>Accent67

GTCCCATTTCCCTACTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCTCAGCTCCTC
CTAATTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTCATCATA
ATTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTTCCATTTCCTCCTTGTTCC
GTCCCATTTCCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAGTTCATCTCAGTTCCTT
CTAGTTCGTCAACAATGCCTCCTAGTTGGTCTAATTTCCCTCCTAGTTTGTCCCA
TTTCCTACTAGTTCCTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCATTACTACTAGTT
CTTAC

>Accent77

GTCCCATTTCCCTACTAGTTCGTCCCATTTCCTCATAGTTCCTCCCATTACTTT
AAATGCTAACCATTTCCTTCTAGTTCGTCCCATTTCATCCAAGTTGGTCCCAT
TTCCCTCCCATCTACTACTAGTTTTTACCCTTTCCCTCCTAGTTCGTCCCTATTTCC
TCCTAGTTCTTACCCTTCCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTCGTCTC
AGTACTTCTAGTTCCTTACCCTTTCCCTAATAGTTCGTCCAATTTCCCTCCAAGT
TGGAGCTATTTCCCTTCTAGTTAGTCTGATTTCCCTCCTAGTTGGTCCCATTTC
TCTTATGTCGTCCCATTTCCTCCTATTTCCGCCCCATTTCCTCCTAGTTTGTCCC
ATTTCCCTCCCAGTTTGTCCCATTACTTCTAATTCCTCCCTTTTCCCTCCTAGTT
CGTACTTTTTCCCTCCTAGTTCATCCCATTACTTCTAGTTCGTCCCATTACTT
CTAGTTAGTCCCTTTTCCCTCCTAGTTTGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCA
TTTCCTCCTAGTTCGCCCCATTTCCTTCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTACTTG
GATCTATTTACTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

>Accent78

GTCCCATTTCCCTACTAATTCTCGCCCTTTCCCCATAGTTCGTCTCATTTCCTC
CTTGTTTCGTCCCATTTCCTCCTTTTTTCGTCCCATTACTTCTATTTCTTTCCCA
TTCCCTCCTAGTTCACCCCATTCCTCCTAGTTCATCCAATTTACAAGTTC
TTCCCTCTCCTTCTAGTTTGTCCCATTTCCTCCTAGTTCATCCCATTACTCC
TTGTTTCGTCCCATTACTTCTTGATCTTACCATTACTCTTAATTGTCCCATT
CCAACAGGTTCTTACCTTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTACTCCTAGTTCTTC
TTACCCTTTCCTCTAAGTTCGTCCCGTTTCCTCATTGTTTCGTACATTTACAA
CTAGTTCTTCCCCTTTCCTTCTAGTTTGTCCCATTTCCTACTAGTTGGTTCGCAT
TTCCCTCCTAATTTCTCTCATTACTACTAGTTCTGACCCTGTCCACCTATTT
GTCCCATTTTCTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

>Accent86

GTCCCATTTCCCTACTAGCTAGTCACATTTCCCTCCTTGTTGCTCCCATTTCGTC
TTAGTTGGTTCACATTTCCCTCCTAGTTCCTCCCATTACTACTAGTTTAACTT
TTCTTCCAAGTTGGTCCCATTTCATCCTAGTTGGTCCCATTTTCTCCTAGTTT
CTCTCATTACTACTAGTTCCGTCCCTGTCCCTCGTAGTTCGTCCCATTTCCTC
CTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTTGGTCCCATTTCCTCCTAATTCCTCCCA
TCTACTAATAGTTCTTACCATTTCCTCCTAGTTCGTCCCATTTCCTCCTAGTT
GGTTCACATTTCCCTCCTAGTTCGTCTCACTCCCTAC

ÖZ GEÇMİŞ

Gizem SUNKAR/....../..... tarihinde Adana'nın Yüreğir ilçesinde dünyaya gelmiştir. İlk, orta, lise eğitimini İstanbul / Çatalca'da tamamlamıştır. Daha sonra 2013 yılında Nevşehir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü kazanıp 2017 yılında mezun olmuştur. Yükseköğrenimini Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünde devam ettirmektedir.



