

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

YABANİ NOHUT (*Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum*) VE KÜLTÜR NOHUT (*Cicer arietinum* L.) TÜRLERİNİN TÜM KLOROPLAST GENOM SEKANS LAMA YÖNTEMİYLE KLOROPLAST DNA DİZİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ezgi MEHMETOĞLU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 27.07.2021

Bornova – İZMİR

2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Yabani Nohut (*Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum*) ve Kültür Nohut *Cicer arietinum* L. Türlerinin Tüm Kloroplast Genom Sekanslama Yöntemiyle Kloroplast DNA Dizilerinin Karşılaştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 20

İmzası

Adı-Soyadı

Ezgi MEHMETOĞLU

ÖZET

**YABANI NOHUT (*Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum*) VE
KÜLTÜR NOHUT (*Cicer arietinum* L.) TÜRLERİNİN TÜM
KLOROPLAST GENOM SEKANSLAMA YÖNTEMİYLE
KLOROPLAST DNA DİZİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

MEHMETOĞLU, Ezgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Temmuz 2021, 72 sayfa

Nohut dünya üzerinde yetişen en önemli baklagillerden biri olup, çoğu canlı için en temel besin kaynaklarından biridir. Bitkilerde bulunan, fotosentez gibi metabolik olaylardan sorumlu olan kloroplast (cp) organeli, bitki içerisinde çok sayıda kopya bulundurması ve evrimsel süreç boyunca yüksek oranda korunmuş olması sebebiyle hem cp genom mühendisliği çalışmalarında hem de filogenetik araştırmalarda önemli bir bilgi kaynağıdır. Bu çalışmada nohut bitkisinin, kültür türü *C. arietinum* ve iki yabani türü *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* bitkilerinin WGS (Whole Genome Sequencing) yöntemiyle cp genom dizileri elde edilmiş ve genomların karşılaştırmalı genomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu *Cicer* türlerinin cp genom boyutları *C. arietinum* için 125,319 bp, *C. reticulatum* için 125.794 bp ve *C. echinospermum* için 126,713 bp olarak saptanmış ve her bir genomun bir LSC, bir SSC ve bir IR bölgesi bulundurduğu tespit edilmiştir. Bu üç genom kendi içerisinde büyük oranda korunmuş olmasına rağmen, genom içerisinde bazı bölgeler mutasyona uğrayarak farklılaşmıştır. Üç nohut türü için türlerin spesifik olarak cpDNA'sı bazlı ayrılaşmasının gözlenebileceği potansiyel markör olarak kullanılabilecek genler rps15 (30S ribozomal protein) ve ycf1 (Protein TIC, translokon) olarak tespit edilmiştir. Bu türlerin tüm kloroplast genomu kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve *C. arietinum*'un birincil ve ikincil progenitörü olan bu türler çok benzer kloroplast genomlarına sahip oldukları için tek bir kökten çıkan dallanma göstermiştir. Elde edilen bu veriler ekonomik öneme sahip bitkilerin kloroplast mühendisliği

kullanılarak geliştirilmesine ve cpDNA baz alınarak, karmaşık taksonomik seviyelerin aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Yabani nohut, kloroplast genom, genom organizasyonu



ABSTRACT**COMPARATIVE ANALYSIS OF CHLOROPLAST DNA SEQUENCES OF
WILD CHICKPEA (*Cicer reticulatum*, *Cicer echinospermum*) AND
DOMESTIC CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) SPECIES THROUGH
WHOLE CHLOROPLAST GENOME SEQUENCING**

MEHMETOGLU, Ezgi

MSc. Thesis, Department of Biotechnology

Supervisor : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

July 2021, 72 pages

Chickpea is one of the most important crop in worldwide and one of the main components of the human plant-based dietary due to high protein, carbohydrate, and vitamin content. Chloroplast (cp) organelle is a substantial organelle for plant metabolism mechanisms. In addition, cp genome has a specific genetic system and inherited uniparentally. Due to having many cp copies in plant cells and highly conservation during the evolutionary processes, it serves essential information in terms of chloroplast genome engineering studies and phylogenetic studies. In this study, cp genomes of three different chickpea species (Cultivated one is *C. arietinum*, wild ones are *C. reticulatum* and *C. echinospermum*) were obtained by Whole Genome Sequencing (WGS) perspective, and comparative genomic analyses was performed. As a result of the downstream bioinformatic analysis, cp genome sizes of *Cicer* species were determined as 125,319 bp, 125,794 bp and 126,713 bp respectively. Additionally, it was determined that each genome contained a LSC, a SSC and an IR region. Although these three genomes are highly conserved within themselves, some regions have experienced several mutations. Especially, *rps15* and *ycf1* gene can be used as potential markers for three *Cicer* chloroplast genomes, A phylogenetic tree was constructed using whole cp genome sequences of different plants from *Leguminosae* family, and the tree confirmed the topology of *Cicer* species. These obtained data will help to develop and improved economically important crops using chloroplast engineering and to elucidate complex taxonomic levels using cpDNA genome sequences.

Keywords: Wild chickpea, chloroplast genome, genome organization



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi, destek ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her konuda yardımcı olmaya çalışan ve akademik çalışmalarım doğrultusunda beni yönlendiren ve teşvik eden değerli Danışman Hocam Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için FOA-2020-20981 proje numarası ile finansal destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (EGE BAP) Koordinatörlüğü'ne ve tezim için gerekli altyapı imkanını sağlayan E.Ü Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve lisans eğitimimden bu yana akademik gelişmemde yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda, benim eksik yönlerimi bilgi ve birikimiyle gidermeye çalışan ve alanım doğrultusunda ufkumu genişletmemi sağlayan Öğr. Gör. Dr. Yasin KAYMAZ'a ve laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yol gösterip destek olarak her konuda bilgi ve deneyimlerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Duygu ATEŞ'e, yüksek lisans çalışmalarım boyunca beraber çalıştığımız başta Melih Mustafa TEMEL olmak üzere bütün Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda çalışan arkadaşlarıma sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tüm hayatım boyunca her konuda sevgi ve destekleriyle bugünlere kadar beni getiren sevgili annem Nurten MEHMETOĞLU, babam Nafi MEHMETOĞLU, sevgili ablam Simge MEHMETOĞLU ŞAHİN'e ve eşi Behçet ŞAHİN'e, bana sağladığı yüksek motivasyon ve mutluluk için minik yeğenim Deniz ŞAHİN'e, yol arkadaşım ve en büyük destekçim Uğur Kamil BOZ'a, sonsuz moral ve motivasyon sağlayan sevgili arkadaşlarım Burcu YALDIZ ve Dilan YERLİ başta olmak üzere tüm sevdiklerime, bana gösterdikleri sabır, sevgi, destek ve emekleri için sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Nohut Bitkisi	4
2.2. Kloroplast Genomu Özellikleri	5
2.3. Kloroplast Genom Bilgisi ile Yapılan Genomik Analizler	8
2.4. Kloroplast Genom Bilgisinin İşlenmesinde Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	12
3. MATERYAL – METOD	14
3.1. Bitki Materyali	14
3.2. Farklı Nohut Genotiplerinin Ekimi, Yetiştirilmesi ve Hasadı	14
3.3. Kloroplast DNA İzolasyonu	15
3.4. Kloroplast DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi	16
3.5. Yeni Nesil Sekanslama (NGS) Teknolojisi ile Elde Edilen Ham Verilerin İşlenmesi ve Kloroplast Genom Sekansı Eldesi	17
3.6. Kloroplast Dizi Bilgilerinin Biyoinformatik Araçlar ile Karşılaştırmalı Analizlerinin Yapılması	18
3.7. Kloroplast Genomlarında Kısa Tekrar Dizilerinin (SSR) ve Tandem Tekrarlarının Tespiti	19
3.8. Kodon Kullanma Eğilimi Analizi (Codon Usage Bias)	19

İÇİNDEKİLER (devam)

3.9. Nükleotit Farklılaşma Analizi (Divergent Hot Spot Analysis).....	19
3.10. Kloroplast Dizi Bilgisi Kullanılarak Gerçekleştirilen Filogenetik Analizler	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Kloroplast DNA İzolasyonu Sonuçları	21
4.2. Kloroplast Genom Haritasının Oluşturulması ve Genom İçeriklerinin Belirlenmesi	22
4.2.1. <i>Cicer arietinum</i> Kloroplast Genomu Tanıtımı.....	22
4.2.2. <i>Cicer reticulatum</i> Kloroplast Genomu Tanıtımı.....	24
4.2.3. <i>Cicer echinospermum</i> Kloroplast Genomu Tanıtımı	26
4.3. Kloroplast Genomlarının Karşılaştırmalı Analizi	28
4.4. Kloroplast Genomlarında Gen Sırası ve Homoloji Analizi	30
4.5. Kloroplast Genomlarında Kısa Tekrar Dizileri ve Tandem Dizi Analizleri	33
4.6. Kodon Kullanma Eğilimi Analizi (Codon Usage Bias).....	39
4.7. Nükleotit Farklılaşma Analizi (Divergent Hot Spot Analysis)	43
4.8. Kloroplast Genom Bilgisi ile Filogenetik Ağaç Oluşturulması	46
5. TARTIŞMA	47
5.1. Kloroplast Gen İçeriği Karşılaştırılması	48
5.2. Kloroplast Genomlarının Karşılaştırmalı Genomik Analizleri	50
5.3. Kloroplast Genomlarının Tekrar Dizilerinin Karşılaştırması.....	52
5.4. Kloroplast Genomlarının Kodon Kullanma Eğilimi Analizleri	54
5.5. Kloroplast Genomlarının Nükleotit Farklılıkları Analizleri.....	54
5.6. Kloroplast Genomuna Dayalı Filogeni Analizi.....	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Karasal bitkilerin kloroplast genom organizasyonu.....	7
Şekil 3.1. İzmir lokasyonunda yetiştirilen üç farklı nohut türü. (Sırasıyla; <i>Cicer reticulatum</i> , <i>Cicer echinospermum</i> , <i>Cicer arietinum</i>).....	14
Şekil 4.1. İzolasyonu gerçekleştirilen kloroplast DNA'larının %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü	21
Şekil 4.2. <i>Cicer arietinum</i> türünün elde edilen kloroplast genom haritası	22
Şekil 4.3. <i>Cicer reticulatum</i> türünün elde edilen kloroplast genom haritası.....	24
Şekil 4.4. <i>Cicer echinospermum</i> türünün elde edilen kloroplast genom haritası ..	26
Şekil 4.5. mVISTA program kullanılarak elde edilen karşılaştırmalı analiz görseli	29
Şekil 4.6. MAUVE Alignment ile elde edilen her türe spesifik gen sırası ve homoloji analizi	31
Şekil 4.7. Bowtie2 Alignment verilerinin IGV online aracında görüntülenmesi. .	32
Şekil 4.8. MISA programı kullanılarak <i>Cicer arietinum</i> türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği	33
Şekil 4.9. MISA programı kullanılarak <i>Cicer arietinum</i> türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği	34
Şekil 4.10. MISA programı kullanılarak <i>Cicer reticulatum</i> türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği	34
Şekil 4.11. MISA programı kullanılarak <i>Cicer reticulatum</i> türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.	35
Şekil 4.12. MISA programı kullanılarak <i>Cicer echinospermum</i> türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.	35
Şekil 4.13. MISA programı kullanılarak <i>Cicer echinospermum</i> türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.	36
Şekil 4.14. MISA programı kullanılarak <i>Cicer</i> türleri için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.15. MISA programı kullanılarak tüm <i>Cicer</i> türleri için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.....	37
Şekil 4.16. REPuter ve Tandem Repats Finder programı kullanılarak <i>Cicer arietinum</i> türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.....	38
Şekil 4.17. REPuter ve Tandem Repats Finder programı kullanılarak <i>Cicer reticulatum</i> türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.....	38
Şekil 4.18. REPuter ve Tandem Repats Finder programı kullanılarak <i>Cicer echinospermum</i> türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.....	39
Şekil 4.19. <i>Cicer arietinum</i> türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.	40
Şekil 4.20. <i>Cicer reticulatum</i> türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.	40
Şekil 4.21. <i>Cicer echinospermum</i> türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.	40
Şekil 4.22. Üç nohut türünün kloroplast genomlarının aminoasit içerikleri.	41
Şekil 4.23. Nükleotit farklılaşmasını incelemek için elde edilen Sliding window görseli.....	44
Şekil 4.24. Nükleotit farklılaşmasını incelemek için ~30 kb'lik bölgenin maskelendikten sonra elde edilen Sliding window görseli.	44
Şekil 4.25. Üç nohut türü ve diğer baklagil familyasına ait türlerin kloroplast genomları baz alınarak elde edilen filogenetik ağaç.	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. 2019 yılı içerisinde Dünya nohut üretiminde ilk beşte yer alan ülkelerin nohut üretim miktarları, ekim alanı ve hektogram/hektometre cinsinden verim değerleri.	2
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan üç farklı nohut genotipine ait bilgiler	14
Çizelge 4.1. İzole edilen kloroplast DNA'larının NanoDrop 1000 cihazında gerçekleştirilen spektrofotometrik kalite tayini	21
Çizelge 4.2. <i>Cicer arietinum</i> türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.....	23
Çizelge 4.3. <i>Cicer reticulatum</i> türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.....	25
Çizelge 4.4. <i>Cicer echinospermum</i> türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.....	27
Çizelge 4.5. Üç farklı nohut türünün kloroplast genom içeriklerinin karşılaştırılması	28
Çizelge 4.6. Üç nohut türünün Relative Synonymous Codon Usage (RSCU) değerleri	41
Çizelge 4.7. Genomlar arasında gözlenen nükleotit farklılaşmasının pi cinsinden değerleri	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Bp	Base pair
kb	Kilo base
DNA	Deoksiribonükleik asit
cpDNA	Chloroplast deoksiribonükleik asit
mM	miliMolar
µl	mikrolitre
ml	mililitre
EDTA	Etilen DiamineTetraAsetik asit
PVP-40	Polivinilpirolidon-40
BSA	Bowine Serum Albümini
DTT	1,4-dithiothreitol
KAc	Potasyum asetat
g	Bağıl merkezkaç kuvveti
sn	Saniye
dk	Dakika
ng	Nanogram

1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.), diploid kromozomlu ($2n=16$), 740 Mb genom büyüklüğüne sahip, *Leguminosae* familyasına ve *Cicereae* sınıfına tek yıllık otsu yapıya sahip bir bitkidir (Upadhyaya et al., 2011). Dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen en eski baklagillerden biri olan nohut, kurak alanlarda yetiştirilen, havada bulunan serbest azotu köklerinde bulunan nodüllere bağlayan bir baklagildir. Vejetasyon dönemini 60-100 gün arasında tamamlayabilmektedir. İçerdiği protein, karbonhidrat, vitamin ve fosfor, potasyum, magnezyum, demir ve kalsiyum gibi çeşitli mikro ve makro elementler sayesinde uzun yıllar boyunca yemeklik, hayvan yemi ve benzeri birçok alanda tüketim için tercih edilmektedir. Kuru nohut tanelerinde yaklaşık olarak %5 oranında yağ, %20-25 oranında protein ve %50-60 oranında karbonhidrat bulunmaktadır (Alajaji & El-Adawy, 2006; Jukanti et al., 2012). İnsanların gelişme ve beslenmesinde önemli bir rol oynayan histidin, lösin, izolösin ve lizin aminoasitlerini yapısında bol miktarda bulundurmaktadır (Candela et al., 1997). Kuraklığa dayanıklı olması sebebi ile ülkemizin orta Anadolu, Doğu, Güneydoğu gibi yarı-kurak ve kurak bölgelerinde kolaylıkla yetiştirilebilmektedir (Saxena et al., 2014).

Nohut, dünya üzerinde elliden fazla ülkede üretilmektedir. Hindistan dünyadaki toplam nohut üretiminin %64'üne sahip olarak en yüksek miktarda üretimin gerçekleştirildiği ülkedir. Sırasıyla Avustralya %14'lük bir üretim payına, Myanmar ve Etiyopya %4'lük bir üretim payına, Türkiye ve Rusya %3'lük bir üretim payına ve Amerika Birleşik Devletleri ve İran gibi ülkeler de %2'lik bir üretim payına sahiptirler (Merga & Haji, 2019). 2019 yılı itibari ile Dünya nohut üretiminde, Hindistan 9.937.990 ton üretim ile ilk sırada yer almaktadır. Ardından 630.000 bin ton ile Türkiye, 506.166 bin ton ile Rusya, 499.438 bin ton ile Myanmar ve 446.584 bin ton ile Pakistan gelmektedir (FAOSTAT, 2019). Dünya nohut üretiminde ilk beşte yer alan ülkelerin, 2019 nohut üretim miktarı, ekim yapılan alan ve verimi Çizelge 1.1.'de gösterilmektedir. Nohut ülkemizde ise en çok yetiştirilen yemeklik baklagildir. Türkiye toplam nohut üretiminde dünyada büyük bir paya sahip olmasının yanı sıra nohut ihracatı ile ülke ekonomisine büyük bir kazanç sağlamaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun yayınlamış olduğu 2020 verilerine göre Türkiye'de 5.115.607 dekar alana nohut ekilmiş olup bu alanda

630.000 ton üretim gerçekleşmiştir. Bu verilere göre 2020 yılında nohut bitkisinin verimi 123,15 kg/dekar olarak belirlenmiştir (TÜİK, 2020).

Çizelge 1.1. 2019 yılı içerisinde Dünya nohut üretiminde ilk beşte yer alan ülkelerin nohut üretim miktarları, ekim alanı ve hektogram/hektometre cinsinden verim değerleri.

Ülke	Yıl	Üretim miktarı (Ton)	Ekim Alanı (Ha)	Verim (Hg/Ha)
Hindistan	2019	9937990	9547030	10410
Türkiye	2019	630000	517785	12167
Rusya	2019	506166	551663	9175
Myanmar	2019	499438	379607	13157
Pakistan	2019	446584	943058	4735

Bitki hücrelerinde metabolik enerji üretiminden, karbondioksitin karbonhidrata fotosentetik dönüşümünününden, bazı aminoasit ve yağların üretiminden ve çiçekler için gerekli olan bazı renk pigmentlerinin üretiminden sorumlu olan organel kloroplasttır (Bausher et al., 2006). Bitki hücresinde bulunan üç farklı genom içerisinde gen yoğunluğu en fazla olan genom yaklaşık olarak 100 gen /120-210kb oranı ile kloroplast genomudur. Kloroplast DNA'sı üzerinde hem fotosentez mekanizması hem de kloroplastın kendi metabolizmasının işleyişini sağlayan bir çok gen bulunmaktadır. Çoğu kara bitkisinin kloroplast genom sekansları yüksek oranda korunarak günümüze kadar gelebilmiştir. Bu yüzden kloroplast genomları, filogenetik haritalamalar için önemli bilgi kaynaklarıdır. Kloroplast DNA'sının yapısı bir zamanlar farklı evrimsel soylara ait olduğu düşünülen türlerin dahi filogenetik olarak birbirlerine yakın türler olduğunu gösteren kesin kanıtlar sağlayabilmektedir. Bitki genomu içerisinde yer alan diğer mitokondriyal ve nüklear genoma göre kloroplast genomundan çok sayıda kopya bulunmaktadır. Aynı zamanda genom içeriği, evrimsel süreç içerisinde çok fazla değişime uğramadığından bu genoma uygun primer tasarlanması ve gen klonlama çalışmaları kolaylaşmaktadır (Wu et al., 2010).

Literatürde yer alan ilk kloroplast genom sekanslama çalışması *Nicotiana tabacum* (Shinozaki et al., 1986) bitkisinde yapılmış olup günümüze kadar birçok bitkinin kloroplast genom sekansı elde edilerek NCBI (National Center for

Biotechnology Information) veritabanında yer almaktadır. Özellikle baklagiller ailesinde yer alan bitkiler ile yapılan kloroplast genom sekanslama çalışmalarının sayısı yükselmektedir (Sasaki et al., 2005; Guo et al., 2007; Magee et al., 2010; Tangphatsornruang et al., 2010; Sabir et al., 2014; Kaila et al., 2017; Asaf et al., 2017; Choi et al., 2019; Lee et al., 2021; Moghaddam, 2021).

Nohut türleri içerisinde yalnızca kültür nohut türü olan *Cicer arietinum*'un kloroplast genom sekanslaması yapılmıştır ve bu sekanslama, Jansen ve ark. (2008) tarafından primer tasarımı ve PCR tabanlı sekanslama stratejisi kullanarak gerçekleştirilmiştir (Jansen et al., 2008). Bunun yanı sıra günümüze kadar yabani nohut türlerini içeren herhangi bir kloroplast genom çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada dünyada ve ülkemizde ekonomik bir öneme sahip olan nohut bitkisinin, yabani türleri olan *Cicer reticulatum*, *Cicer echinospermum* ve kültür türü olan *Cicer arietinum* L. bitkileri kullanılmış olup, yüksek moleküler ağırlıklı kloroplast DNA'sı izolasyonu ardından, tüm kloroplast genom sekanslama stratejisi kullanılmıştır. Bu çalışma nohut bitkisinin, kloroplast genomunun incelenmesine, bu genomda korunmuş ve genoma lokalize olmuş DNA dizi motiflerinin biyoinformatik analizine dayanmaktadır. Gerçekleştirilecek deneyler ve analizler sonucu elde edilecek olan bilgiler, nohut bitkisinin evrimsel süreç içerisinde filogenetik açıdan incelenmesine ve kloroplast genomu baz alınarak yapılacak gen transformasyonu çalışmalarına yardımcı olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Nohut Bitkisi

Nohut bitkisi otuz dört adet çok yıllık ve dokuz adet tek yıllık türü içerisinde barındırmaktadır. Dokuz adet tek yıllık türler arasından kültüre alınan ve yetiştiriciliği yapılan tek tür *Cicer arietinum* L.'dur. *Cicer arietinum* L.'un kültüre alınabilmesinde progenitor yabani tür olarak *C. reticulatum*'un kullanıldığı kabul edilmektedir (Gupta et al., 2016). Nohut olarak adlandırılan *C. arietinum* L. şekli ve rengi ile ayırt edilebilen iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birisi "Desi" olarak adlandırılan açısallı şekillere sahip, kalın ve renkli kabuk yapısına sahip olan nohutlardır. Diğer ise "Kabuli" olarak adlandırılan bej renkli iri tohum yapısına sahip olan nohutlardır (Agarwal et al., 2012). Şekil ve renkleriyle karakterize olan bu nohut türleri moleküler düzeyde de incelenmiş ve desi türündeki nohutların daha fazla varyasyon gösterdiği ortaya çıkmıştır (Toker et al., 2007). Diğer sekiz tek yıllık yabani nohut türleri ise *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum*, *C. bijugum*, *C. cuneatum*, *C. chorassanicum* ve *C. yamashitae* olarak belirlenmiştir. Nohut türleri coğrafi dağılımları, yaşam döngüleri ve morfolojik özellikleri bakımından dört sınıfa ayrılmıştır; i) Monocicer, tek yıllık sekiz adet türü kapsamakta, ii) Chamaecicer: *C. chorassanicum* ve *C. incisum* türlerini kapsamakta, iii) Polycicer: çok yıllık olan yirmi üç türü kapsamakta, iv) Acanthocicer: yedi adet çok yıllık odunsu türü kapsamaktadır (Maesen, 1976). Yapılan moleküler temelli çalışmalarda *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* türleri arasında filogenetik olarak yakın bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

Nohut bitkisi, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadır. Soğuk ve sıcak hava koşulları, tuzluluk oranı, oksidatif stres vb. durumlar bitkiler için abiyotik stres kaynaklarıdır. Nohut türlerinde soğuk toleransı en az beş gen tarafından kontrol edilmektedir. Aditif ve non-aditif genlerin bu soğuğa tolerans sağlayan genlerin kalıtımında rol oynadığı belirtilmiştir. Tek yıllık yabani nohut türlerinde soğuğa tolerans derecesi yüksek fakat kültür nohut türünde soğuğa karşı tolerans derecesi daha düşüktür. Nohut bitkisinin üretiminde verimi düşüren biyotik stres faktörleri ise çeşitli patojenler, bakteriler ve virüsler gibi hastalık yapıcı etmenlerdir. *Fusarium solgunluğu*, nohut türlerinde *Fusarium oxysporum*'un neden olduğu ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır. *C. bijugum*'un tüm çeşitleri ve *C.*

judaicum, *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*'nın bazı çeşitlerinin fusarium solgunluğuna karşı direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Nene et al., 1981). Ascochyta yanıklığı hastalığına ise *Ascochyta rabiei* denilen bir fungal patojen neden olmaktadır ve bu hastalık önemli bir seviyede ürün kaybına sebebiyet vermektedir. Yabani türler olan *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum* ve *C. judacium* Ascochyta yanıklığı'na karşı yüksek derecede direnç gösterdiği önceki yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Phytophthora kök çürüklüğü *Phytophthora megasperma*'nın sebep olduğu önemli bir hastalıktır. Nohut türleri arasında *C. echinospermum* çeşidi bu hastalığa en yüksek direnci gösteren tür olmuştur. Kurşuni (gri) küf hastalığı *Botrytis cinerea* adlı nekrotrofik bir mantarın sebep olduğu yaprak hastalığıdır. Bu türe en dirençli nohut türleri *C. pinnatifidum* ve *C. judaicum* olarak belirlenmiştir (R. Singh et al., 2008).

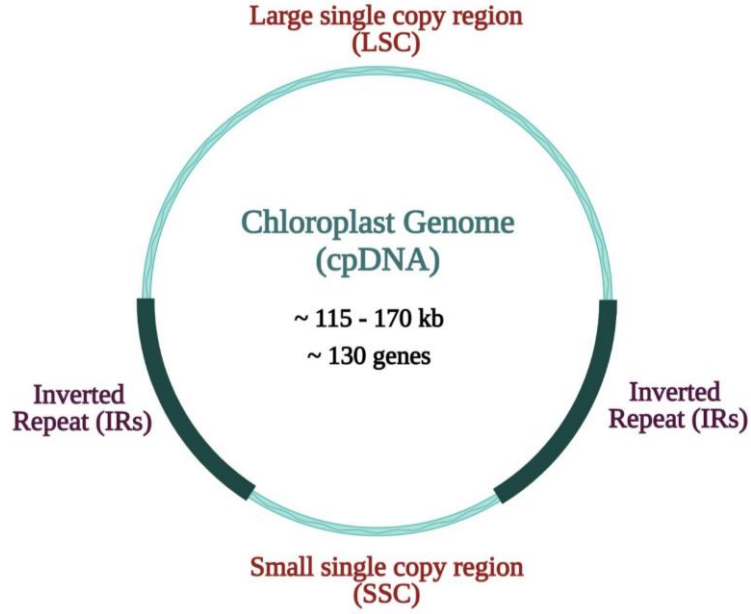
Ahmad ve ark. (2005) *Cicer* türleri arasındaki ilişkileri incelemiş ve kültüre edilmiş tür olan *Cicer arietinum* ile en yakından ilişkili olan türlerin *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* olduğunu saptamıştır (Ahmad et al., 2005). *Cicer* türlerinin gen havuzu incelendiğinde birincil gen havuzunda bulunan türler *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* olarak bildirilmiş olup (J. R. Harlan, 1971; Toker et al., 2007) *Cicer echinospermum* türünün ikincil gen havuzunda yer aldığı bildirilmiştir (Croser et al., 2003; Kahraman et al., 2017). *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* yabani türleri, kültüre alınmış nohut türü olan *Cicer arietinum* ile melezlenebilmekte ve *Cicer arietinum*'a çeşitli dayanıklılık genleri bu yolla aktarılabilmektedir (Knights et al., 2002; Sarı et al., 2018). Önceki çalışmalarda, yabani nohut türlerinin hastalık direnci ve kuralık toleransı sağlayan genlere yanı sıra dane verimini arttıran genlere de sahip olduğu saptanmıştır ve Singh ve ark. (2005) *Cicer echinospermum* ve *Cicer reticulatum*'dan bazı genleri melezleme yoluyla kültür nohut türü olan *Cicer arietinum*'a aktarmıştır. Bu sayede tohum veriminde yaklaşık %39'luk bir artış gözlemişlerdir (S. Singh et al., 2005).

2.2. Kloroplast Genomu Özellikleri

Kloroplastlar, bitki ve alglerin yaşam döngüsünde rol alan, endosimbiyotik orjinli en önemli organellerden biridir. Fotosentez mekanizmasında yer almasının yanı sıra, bitki ve alglerin gelişimi için önemli olan protein ve lipidlerin sentezinde, azot ve sülfür mekanizması için gerekli olan bazı temel maddelerin ve vitaminlerin sentezinde, çiçekler için gerekli olan renk pigmentlerinin sentezinde önemli

görevleri bulunmaktadır (Bausher et al., 2006). Bitki ve alg hücreleri içerisinde üç farklı genom yapısı gözlenmektedir. Bunlar; nüklear genom, mitokondriyal genom ve kloroplast genomudur. Kloroplast genomu, kendisini replike ve transkribe etmesini sağlayan spesifik bir genetik sisteme sahiptir. Bu genetik sistemi maternal olarak kalıtılmakta ve evrimsel süreç boyunca yüksek oranda bir korunmuşluk göstermektedir. Kloroplast genomu yapısı itibari ile halkasal olarak hücre içerisinde yer almaktadır. Genom boyutu yaklaşık olarak 35-217 kb arasında değişmektedir. Özellikle kara bitkilerinin kloroplast genomları birbirlerine yüksek benzerlik göstermekle beraber yaklaşık olarak 115-165 kb arasında bir büyüklüğe sahiptir (Jong et al., 2006).

Kloroplast genomunda bitki metabolizması için gerekli olan yaklaşık 100-130 gen sentezlenmektedir (Somaratne et al., 2019). Kloroplast organelinden sentezlenen genlerin önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu genlerin büyük bir kısmı kloroplast genom organizasyonu ile ilgili, bir kısmı da fotosentez alt ünite kompleksleri ile ilgili genlerdir. Kloroplast genom organizasyonu için ribozomal RNA, transfer RNA, RNA Polimeraz, ribozom proteinleri gibi genler sentezlenirken, fotosentez alt ünite kompleksleri için ise Fotosistem-I, Fotosistem-II, ATP sentetaz, RuBPCase, ATP-sentetaz, NADH- dehidrogenaz ve sitokrom kompleks genleri sentezlenmektedir. Bunlara ek olarak, proteaz, ribulaz bifosfat karboksilaz (RUBISCO), maturaz, zarf membran proteini, translasyon başlatıcı proteinler, Asetil-CoA karboksilaz gibi önemli genler sentezlenmektedir. Genel olarak angiospermilerin (kapalı tohumluların) kloroplast genom yapısı dörtlü bir organizasyona sahiptir. Bu organizasyonda bir adet büyük tekli kopya bölgesi (LCS = Large Single Copy Region), bir adet küçük tekli kopya bölgesi (SSC = Small Single Copy Region) ve bir çift ters tekrar dizisi (IR = Inverted Repeats) bulunmaktadır (Huang et al., 2014). Bunun yanı sıra *Leguminosae* familyasına ait bazı türlerde bu dörtlü yapı, evrimsel süreç içerisinde değişerek bir adet IR (ters tekrar bölgesi) kaybolmuştur (Magee et al., 2010). Bu tür bitkiler, kloroplast genomlarında meydana gelen bu değişimden dolayı IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) sınıfında yer almaktadır (Sveinsson & Cronk, 2016; Wojciechowski et al., 2004).



Şekil 2.1. Karasal bitkilerin kloroplast genom organizasyonu.

Karşılaştırmalı genomik analizler kara bitkilerinin kloroplast genomlarının hem gen içeriği hem de gen dizi sırası açısından yüksek derecede korunduğunu göstermektedir (Bausher et al., 2006). Kloroplast genom bilgisi, evrimsel süreç içerisinde korunmasına rağmen, birçok açıdan genomik çeşitlilik de yaşamıştır. Bu genomik çeşitlilikler genom düzenlemesi amaçlı gerçekleşen bir takım mutasyonlar (gen duplikasyonları, insersiyon/delesyon, baz süstitüsyonları vb.) olarak adlandırılmıştır (Tangphatsornruang et al., 2010). Kloroplast DNA'sında meydana gelen süstitüsyon oranı nükleer DNA'da gözlenen süstitüsyon oranına göre çok daha düşük olarak belirlenmiştir. Kloroplast DNA'sı içerisinde ise ters tekrar bölgelerinde gözlenen süstitüsyon oranının, tekli kopya bölgelerinde gözlenen süstitüsyon oranına göre anlamlı bir seviyede daha az olduğu gözlenmiştir (Bausher et al., 2006). Evrimsel süreç boyunca pek çok gen bağımsız bir şekilde, sadece belli bir türde veya paralel olarak belirli türlerde kaybedilmiştir. *Epifagus virginiana* evrimsel süreç boyunca kloroplast genomunda yer alan 13 tRNA genini kaybederek, kloroplast genom boyutunu 70 kb'ye kadar indirgemıştır. Böylece *Epifagus virginiana* 'nın kloroplast genomu sadece 60 adet gen sentezleyebilir hale gelmiştir (Wolfe et al., 1992). Birkaç çeşit inversiyonun kloroplast genomunun gen düzenini kesintiye uğrattığı tespit edilmiştir. Bu değişimler genellikle belirli türlerle ilişkilendirilmekte ve evrimsel filogeni çalışmaları için önemli belirteçler olabilmektedir (Guo et al., 2007).

Kloroplast genom dizileri içerisinde meydana gelen varyasyonlar, evrimsel olarak uzak filogenetik ilişkileri ortaya çıkarabilmek için önemli kaynaklardır (Wojciechowski et al., 2004). Kloroplast genomundan türemiş markör örnekleri olan matK ve trnL-trnF genleri, baklagiller familyasının evrimsel filogenetik çalışmalarında uzun süredir markör olarak kullanılmaktadır (Nemoto et al., 2010). Kloroplast genomunda bulunan tekrarlayan dizi bölgeleri de ekolojik ve evrimsel çalışmalar için oldukça önemli bilgi potansiyeline sahip bölgelerdir. Kloroplast genomu sayesinde elde edilen bilgiler, yalnızca filogenetik amaçlı çalışmalarda kullanılmayacak olup aynı zamanda ekonomik açıdan önemli olan bitkilerde kloroplast transformasyonu çalışmaları için de kullanılabilir. Günümüze kadar yabancı genlerin ekspresyonunu sağlamak için sadece *Glycine max*'da kloroplast genom transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Tangphatsornruang et al., 2010). Kloroplast genomunun taksonomik ve evrimsel filogeni çalışmalarında kullanılmasının birçok avantajı bulunmaktadır. Kloroplast genomu boyutu itibari ile küçük ve basit olması çok sayıda kopyasının bulunmasını sağlamaktadır. Mitokondriyal ve nüklear genoma kıyasla kloroplast DNA'sının gen içeriği bakımından yüksek oranda korunmuş olması genoma uygun primer tasarlamayı ve gen klonlamasını kolaylaştırmaktadır. Kloroplast genomu maternal kalıtıldığından çeşitli genetik kombinasyonlara uğramaz ve böylelikle filogenetik ilişkilendirmelerde kullanılabilir (Wu et al., 2010).

2.3. Kloroplast Genom Bilgisi ile Yapılan Genomik Analizler

Sekanslama bir organizmanın genomunu oluşturan A,G,T,C adı verilen nükleotit sıralarının belirlenmesi olarak adlandırılmaktadır. Sekanslama teknolojileri 1977 yılında Sanger sekanslama yöntemi ile başlayarak, 1980 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun keşfedilmesiyle ivmelenmiştir. 2000'li yıllarında başında ise İnsan Genom Projesi çalışmaları ile gelişen yeni nesil sekanslama teknolojileri Roche 454 Genom dizileme, Illumine/Solexa sekanslama, Ion Torrent sekanslama teknolojileri olarak ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise sekanslama teknolojilerinin geldiği son nokta tek zincirli moleküllerin de sekanslamasının yapılabildiği Oxford Nanopore ve Pacific Biosciences (SMRT) sekanslama teknolojileridir (Heather & Chain, 2016). Yeni nesil sekanslama teknolojileri sayesinde, çok hızlı bir şekilde büyük boyutlarda okumalar yüksek doğruluklarda gerçekleştirebilmektedir. Moleküler markörlerin geliştirilmesi, ploid seviyesinin

belirlenmesi, transkriptom analizi ve mRNA profillerinin belirlenmesi, evrimsel filogeni çalışmaları gibi birçok alanda yeni nesil sekanslama teknolojilerinden yararlanılır. İlk olarak kloroplast genom sekanslaması yapılan bitki *Nicotiana tabacum* (Shinozaki et al., 1986), olup günümüze kadar model organizma olan *Arabidopsis thaliana* (Sato et al., 1999), domates (Daniell et al., 2006), buğday (Middleton et al., 2014), çeltik (Kim et al., 2015) gibi yaklaşık 1300 bitkinin kloroplast genomu sekanslanmıştır ve NCBI veri tabanında ulaşılabilir şekilde yer almaktadır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids_tax.html).

Kloroplast DNA'sı bünyesinde, kendi metabolik fonksiyonları yerine getirmek için birçok gen bulundurmaktadır. Bu genlerin fonksiyonlarının, yapılarının ve evrimsel sürecinin daha iyi anlaşılmasında kloroplast DNA sekanslarının kullanılması büyük bir yarar sağlamaktadır. Yeni nesil sekanslama yöntemleri, karmaşık morfolojiye sahip bitkilerde ve düşük taksonomik seviyelerde dahi güçlü bir filogenetik harita ortaya çıkarabilmeyi sağlamaktadır. Jansen ve ark. (2008) yılında nohut bitkisinin kloroplast genomu üzerinde çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada nohut bitkisinin kloroplast genom sekansı 125.319 bp uzunluğunda olduğunu ve ters tekrar dizilerinden yalnızca bir tanesini genomunda bulundurduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan analizler sonucu nohut kloroplast genomundan toplam 112 tane gen kodlandığı ve bu genlerin 75 tanesinin metabolik prosesler için önemli proteinleri kodlayan, 4 tanesinin rRNA genlerini kodlayan ve 29 tanesi tRNA genlerini kodlayan diziler olduğu belirtilmiştir. A-T baz içeriği nohut kloroplast genomu için %66,1 olarak bulunmuş olup *Leguminosae* ailesine ait diğer bireylere (*Glycine max* 64,63%, *Medicago truncatula* 66,03%, *Phaseolus vulgaris* 64,56%) benzer bir A-T oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Nohut kloroplast genomunun gen sırası ve içeriği, bir ters tekrar bölgesinin kaybı ve *rbcL* ve *rps16*'nin arasında bulunan yaklaşık 50 kb'lık bir inversiyonun dışında atasal nohut kloroplast genomlarıyla büyük oranda benzerlik gösterdiği belirtilmektedir. Çoğu kapalı tohumlu bitkilerin kloroplast genomunda yer alan *rps16*, *infA* ve *ycf4* genleri bulunurken nohut kloroplast genomunda bu genlere rastlanmadığı rapor edilmiştir (Jansen et al., 2008).

Karşılaştırmalı kloroplast genom analizleri ve moleküler filogenetik çalışmaları, yüksek bitkilerde önemli evrimsel özelliklerin çıkarılması için yeni

fırsatlar ortaya çıkarmaktadır. Wang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Asteraceae* familyasına ait sekiz bitkinin kloroplast genomunun gen içeriğini, genomik organizasyonunu ve RNA düzenleme bölgelerin karşılaştırmalı genomik analizini ve filogenetik analizini gerçekleştirmişlerdir. Sekiz kloroplast genomunun tümünün 23,755-25,034 bp aralığında olan iki adet ters tekrar bölgesi (IR) içerdiğini, LSC bölgelerinin 82,718-84,829 bp arasında olduğunu ve SSC bölgelerinin 18 kb büyüklüğünde olduğunu belirlemişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda kloroplast genom boyutundaki varyasyonlarının sebebinin LSC ve IR bölgelerinin olduğu rapor edilmişken bu çalışmada özellikle *Asteraceae* türlerinde bu varyasyonun sebebinin intergenik bölgelerden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Yapılan analizler sonucu sekiz markörün %5'ten daha yüksek ayırım gücüne sahip (parsimony-informative) karakterler içerdiğini tespit edilmiştir. Filogenetik haritalama çalışmaları, maksimum sekans çeşitliliğine sahip sekiz bölge ve bunların farklı kombinasyonları kullanılarak Maximum Parsimony yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *Lactuca sativa*, *Jacobaea vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Ageratina adenophora*, *Guizotia abyssinica*, *Artemisia frigida*, *Chrysanthemum indicum* ve *Chrysanthemum x morifolium* bitkilerinin yer aldığı bu filogenetik haritalama çalışmaları *Asteraceae*'nin evrimsel süreçteki monofilisini destekler nitelikte bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, *Asteraceae* familyasının kloroplast genom organizasyonunun kısmen korunduğu rapor edilmiştir. Genom analizleri, *Asteraceae* türlerine özgü yapı farklılıklarını ortaya çıkarmıştır (Wang et al., 2015). Kloroplast organeli kendi içerisinde bitki için hayati öneme sahip yüksek derecede korunmuş genleri bulundurmakta ve aynı zamanda genom içinde değişken bir takım bölgeleri de bulundurmaktadır. Filogenetik haritalama çalışmalarında kloroplast genomunun düşük mutasyon oranına sahip bölgeleri kullanılırken, yüksek mutasyona sahip spesifik genom bölgeleri yakın akraba türlerinin ayrılmasında daha doğru ve kesin sonuçlar elde etmek adına kullanılmaktadır. Filogenetik çalışmalar için, kloroplast genom farklılıklarının ortaya çıkarmayı sağlayacak hedef sekanslar çok iyi seçilmelidir (Heinze, 2007).

Wu ve ark. (2010), *Orchidaceae* ailesine ait olan *Oncidium Gower Ramsey* cinsi bir bitkide kloroplast genomundan türetilen moleküler markörler kullanarak filogenetik haritalama çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. *Oncidium Gower Ramsey*'in kloroplast genom uzunluğu 146,484 bp olarak rapor edilmiştir.

Kloroplast genomu içerisinde her biri 25.755 bp olan iki adet ters tekrar bölgeleri, 12.650 bp uzunluğunda bir SSC bölgesi ve 82.324 bp'lık bir LSC bölgesi bulunmaktadır. Kloroplast genomundan toplamda 133 gen sentezlenmektedir ve kodlanan bölgeler kloroplast genomunun %49,9'unu (%41,86'sı protein kodlayan genler, %8,08'i RNA genleri) oluştururken kodlanmayan bölgeler ise %50,1'ini oluşturduğunu belirlemişlerdir. Filogenetik analiz için kloroplast genomundaki bölgelerden çeşitli kombinasyonlar yapıp en doğru filogenetik sonuçların matK, trnHGUG-psbA + matK, trnHGUG-psbA + trnFGAA-ndhJ bölgeleri kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir. Maximum Parsimony modeli kullanılarak yapılan filogenetik haritalamada da sekiz kloroplast genom bölgesi kullanılmış ve *Oncidium Gower Ramsey*'nin en yakın akrabaları, *Oncidium Gower Ramsey* 'Sunkiss', *Oncidium Sweet Sugar* 'Million Coin' *Oncidium Gower* 'Lemon Heart' olarak belirlenmiştir. Maximum Likelihood modeli ile yapılan filogenetik haritalamada ise *Oncidium* cinsinin en yakın akrabası *Phalaenopsis* olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada, filogenetik analiz için en faydalı kloroplast genom bölgelerinin trnHGUG-psbA ve trnFGAA-ndhJ bölgeleri olduğu rapor edilmiştir. Tüm kloroplast genom bilgisinin *Oncidium*'da yapılacak olan filogenetik, evrimsel, ıslah ve çeşit çalışmaları için en doğru bilgi ağını oluşturacağı belirtilmiştir (Wu et al., 2010).

Kloroplast genom sekansları kullanılarak gerçekleştirilen genomik analizler, bu sekansların evrimsel süreç içerisinde hem sekans içeriği hem de dizilişleri bakımından yüksek oranda korunduğunu kanıtlamıştır (Bock et al., 2012). Weng ve ark. (2014), *Geraniaceae* familyasında plastid genom rekonstrüksiyonunu, kloroplast genom düzenlenmesini, genom içerisinde tekrar eden bölgeleri ve nükleotitlerin sübsitüsyon oranlarını inceledikleri bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada Geraniales takımından *Francoa sonchifolia*, *Melianthus villosus* ve *Viviania marifolia* bitkileri, *Geraniaceae* familyasından ise *Pelargonium alternans*, *California macrophylla* ve *Hypseocharis bilobata* bitkilerinin kloroplast genomu kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ışığında araştırmacılar, *Geraniaceae*'nin atasal branch'ında küçük boyutlarda gözlenen yeniden düzenlemelerin haricinde, her cinsten meydana gelen bağımsız bir yeniden düzenleme durumunun olduğunu tespit etmişlerdir. Gerçekleştirilen genom rekonstrüksiyonlarında, en doğru şekilde rekonstrükte edilen genomda

Hypseocharis bilobata, *Pelargonium hortorum*, *Pelargonium Alternans* ve *Monsonia* türlerinde ortak olarak gözlenen SSC bölgesinin *Geraniaceae* familyasının atasal SSC bölgesini oluşturduğu düşünülmektedir. Rekonstrükte edilmiş atasal *Geraniaceae* plastid genomunun trnG-GCC ve psbD arasında 4 kb boyutunda bir IV'ye (inversiyon), *Pelargonium* benzeri bir SSC bölgesi'ne (Pelargonium-like SSC) ve *Rosidae*'ler ile aynı IR/LSC sınırına sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan genomik analizler ile tekrar bölgelerinin (Inverted Repeats) sınırlarının değişmesi veya bu bölgede meydana gelen bir inversiyonun kloroplast genom organizasyonunun şekillenmesinde önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir (Weng et al., 2014).

2.4. Kloroplast Genom Bilgisinin İşlenmesinde Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Kloroplast genomu sekans bilgisi ile bir bitki genotipine ait kloroplast genom haritaları OrganellarGenomeDRAW (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) veritabanı kullanılarak elde edilmektedir. Bu veritabanı GenBank formatındaki sekans bilgilerini grafiksel bir haritaya dönüştürmektedir (Greiner et al., 2019).

mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>) iki veya daha fazla DNA sekansının birbirleri arasında karşılaştırılmasını sağlayan, alignment (hizalama) yaparak bu sekanslar arasında benzerlik ve farklılıklarının kolaylıkla tanımlanmasına olanak veren ve bu hizalamaları görselleştirebilen bir programdır. Bu program ile her bir nohut türü için tüm kloroplast genom bilgileri hizalanabilmekte ve türler arası benzerlikler-farklılıklar ve korunmuş bölgelerin tespiti kolaylıkla yapılabilmektedir (Frazer et al., 2004).

MAUVE Alignment (<http://darlinglab.org/mauve/download.html>) çoklu genom hizalaması yaparak evrimsel süreçte değişen dinamiklerin görselleştirilmesini sağlayan bir programdır. Türler arasındaki yapısal homolojiyi belirlemek ve sentezlenen genlerin sıralaması ve karşılaştırmasını yapma amacıyla kullanılmaktadır (Darling et al., 2004).

Kloroplast genomunda farklı bölgelerde yer alan ve genom boyunca yerleşmiş olan mononükleotit, dinükleotit veya polinükleotit şeklindeki basit dizi tekrarlarını (Mikrosatellit) bulabilmek amacıyla MICOroSAteLLite Identification Tool (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) programı kullanılmaktadır (Beier et al.,

2017). Bu program çıktı olarak dizi tekrarlarının detaylı bir dosyasını vermektedir. Mikrosatelitler, filogenetik çalışmalarda moleküler belirteçler olarak kullanılmaktadır. Mikrosatelitlere ek olarak, DNA'nın tekrarlayan yapısı içerisinde birçok farklı dizi tekrarlarının barınmasına olanak sağlamaktadır. Forward, reverse, reverse komplement, palindromik ve tandem repeat olarak adlandırılan bu tekrar dizileri biyoinformatik araçlar ile tespit edilebilmektedir. Bu tür tekrarları bulabilmek için REPuter online biyoinformatik aracı (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer/>) ve Tandem Repeats Finder online biyoinformatik aracı (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) kullanılmaktadır (Benson, 1999; Kurtz et al., 2001).

Her bir tür, genomunda yer alan genlerin sentezini biyolojik olarak anlamlandırılan kod-kodon ilişkisine dayalı olarak gerçekleştirmektedir. Bir protein dizisinde yer alan bir aminoasidi kodlayan birden fazla kodon olabilir. Bu durumda organizma, spesifik proteini sentezlemek için kullanacağı kodonu seçme konusunda belirli bir eğilim göstermektedir. Kodon kullanım eğilimi (Codon Usage Bias) aynı proteini sentezleyen kodonların ortaya çıkma sıklıklarını istatistiksel olarak analiz eden bir ifadedir. Bir tür organizmanın kodon kullanma eğilim analizi MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) programı kullanılarak elde edilmektedir (Kumar et al., 2018).

Nükleotit çeşitliliği (Nucleotide diversity) popülasyonlar içerisinde veya arasında gözlenen genetik çeşitliliği ve genetik varyasyonları incelemek ve anlamlandırabilmek amacıyla kullanılan bir istatistiki ölçüdür. Türler arası evrimsel ilişkileri incelemek ve aydınlatmak amacıyla kullanılmaktadır. DnaSP v6 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) programı ile bu istatistiksel analiz bir “Sliding window” çıktısı ile görselleştirilebilir hale gelmektedir (Rozas et al., 2017).

MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı, popülasyonlar veya türler arasındaki evrimsel ilişkileri aydınlatmak amacıyla kullanılan ve filogenetik çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan bir programdır. Bu program ile birçok istatistiksel analiz gerçekleştirilip filogenetik ağaçlar oluşturularak, evrimsel sürecin istatistiki açıdan incelenmesi sağlanabilmektedir (Kumar et al., 2018).

3. MATERYAL – METOD

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı lokasyonlarından elde edilmiş *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* olarak belirlenmiş üç farklı nohut genotipi kullanılmıştır. Her türden 25 adet birey olacak şekilde tohum materyalleri elde edilmiştir. Kullanılan türlerin lokasyon, alt tür ve kod bilgisi Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan üç farklı nohut genotipine ait bilgiler.

Bitki	Genotip	Lokasyon	Tür adı
Kültür nohut	Gökçe	Adana	<i>Cicer arietinum</i>
Yabani nohut	Kesen_075	Kesentaş	<i>Cicer reticulatum</i>
Yabani nohut	Karab_092	Karabahçe	<i>Cicer echinospermum</i>

3.2. Farklı Nohut Genotiplerinin Ekimi, Yetiştirilmesi ve Hasadı

Nohut genotipleri 2019-2020 yetiştirme sezonunda lokasyon olarak Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Tarlası'na her bir tür için 4 blok ve sıraların arası 40 cm olacak şekilde ekilmiştir. Bitkilerin yetiştirilme sürecinde yabancı otlara ve böceklerle karşı korumaları gerçekleştirilmiştir. Kuraklığa karşı ise, düzenli olarak sulanmıştır.



Şekil 3.1. İzmir lokasyonunda yetiştirilen üç farklı nohut türü. (Sırasıyla; *Cicer reticulatum*, *Cicer echinospermum*, *Cicer arietinum*).

3.3. Kloroplast DNA İzolasyonu

Kloroplast DNA izolasyonu için, her bir genotipin taze yaprakları yaş ağırlığı 20 g olacak şekilde alınarak laboratuvara taşınmış ve yapraklar üç gün süreyle +4°C’de muhafaza edilmiştir. Shi ve ark.’nın (2012) geliştirdiği kloroplast DNA’sı izolasyonu yöntemi modifiye edilerek nohut bitkilerinden kloroplast DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Shi et al., 2012). Uygulanan kloroplast DNA izolasyon metodu aşağıda maddeler halinde yer almaktadır;

- Nohut bitkilerinden, genç ve yeşil olan yaprakların yaş ağırlığı 20 g olacak şekilde toplanmıştır. Yapraklar 2-3 gün (optimum 3) süreyle 4°C’de bekletilmiştir. Bu sayede yapraklarda depolanan nişasta seviyesi en aza indirgenmiştir.
- Yaprak örnekleri yaklaşık 1 cm olacak şekilde kesilmiştir. Blender içerisine konularak üzerine 400 ml Buffer A (Buffer A: 1.25 M NaCl, 0.25 M askorbik asit, 10 mM sodyum metabisülfid, 0.0125 M Borax, 50 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 7 mM EDTA, %1 PVP-40 (w/v), %0.1 BSA (w/v), 1 mM DTT) eklenmiştir. Buffer ve yaprak örnekleri 30 saniye blenderlanarak homojenizasyon sağlanmıştır. Ardından homojen karışım bir tülbent yardımıyla süzülüp debris kısım atılarak sıvı kısım 250 ml’lik şişelere konulmuştur.
- 200 g’de 20 dk santrifüj yapılarak nükleus pelleti ve hücre duvarı debris bu aşamada elimine edilmiştir. Ardından sıvı kısım temiz bir ependorf içerisine aktarılmıştır.
- 200 g’de 20 dk tekrar santrifüj yapılarak üst faz tekrar temiz bir ependorfa alınmış ve pellet atılmıştır. Bu aşamada süpernatant içerisinde kloroplastlar bulunmaktadır.
- 3500g’de 20 dk tekrar santrifüj yapılmıştır. Bu santrifüj sonucu oluşan pellet, kloroplast pelletidir. Sıvı kısım elimine edilmiştir.
- Pelletin üzerine 250 ml ice-cold Buffer B (Buffer B: 1.25 M NaCl, 0.0125 M Borax, 50 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 25 mM EDTA, %1 PVP-40 (w/v), %0.1 BSA (w/v), 1 mM DTT) eklenmiştir. Cam çubuk veya minik bir fırça yardımıyla kloroplast pelleti yavaşça ependorf tabanından kaldırılarak tekrar 3500 g’de 20 dk santrifüj yapılmıştır.

- Ardından üst faz dökülerek kalan kloroplast pelleti üzerine tekrar 250 ml ice-cold Buffer B eklenmiş ve yavaşça pellet ependorf tabanından kaldırılmıştır. 3750 g'de 20 dk santrifüj yapılmıştır.
- Ardından üst faz dökülüp kalan kloroplast pelleti üzerine 8 ml Buffer C (Buffer C: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA, 1 mM DTT) eklenmiştir. Üzerine 1,5 ml %20'lik SDS, 20 µl beta-merkaptoetanol, ve 30 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenmiştir. Örnekler 55°C'de en az 4 saat en fazla overnight (optimum overnight) olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından, ependorflar 5 dk buzda bekletilmiştir. Ardından 1,5 ml 5M KAc (pH: 5.2) eklenip ve 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 10.000 g'de 15 dk santrifüj sonucu elde edilen pellet atılmıştır.
- Süpernatant kısım alınıp üzerine eşit hacimde Saturated fenol: Kloroform: İzooamil alkol (25:24:1) konmuştur ve 10.000 g'de 20 dk santrifüj yapılmıştır.
- Bir önceki aşama ikinci kez tekrar gerçekleştirilmiştir.
- Ardından üstteki temiz faz alınıp üzerine eşit hacimde isopropil alkol konmuştur. Daha sonra ependorflar -20°C'de en az 1 saat en fazla overnight (optimum 4 saat) olacak şekilde bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından 10.000 g'de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen kloroplast DNA pelleti sırasıyla %70'lik ve %96'lık alkollerle maksimum 5 dk santrifüjlenerek yıkanmıştır.
- İzole edilen pellet 50 µl TE Buffer (10 mM TrisHCl pH=8.0, 1 mM EDTA pH=8.0) çözeltisi eklenerek çözündürülmüş ve içerisine 4 µl RNase eklenmiştir. Ardından -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Kloroplast DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen kloroplast DNA'larının saflıklarını ve miktarlarını belirlemek amacıyla spektrofotometre NanoDrop ND-1000 (Thermo Co.) ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler her bir örnekten 2µl alınıp NanoDrop 1000 cihazının kuyucuğuna damlatılması sonucu ölçülmüştür. Absorbans ölçümlerinin ardından %0,8'lik agaroz jel hazırlanarak kloroplast DNA'sının saflığı bu yöntemle de test edilmiştir. İzole edilen kloroplast DNA

örnekleri 2 µl cpDNA + 8 µl saf su + 2 µl Bromphenol blue boyası olacak şekilde 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu varlığında hazırlanıp kuyucuklara yüklenmiştir. Kloroplast DNA örnekleri 80 Volt serbest akım altında iki saat yürümeye bırakılmıştır. Yürütmenin ardından örneklerin bulunduğu jel 90µl EtBr (Etidyum Bromid) ve 600 ml saf su içerisinde jel çalkalayıcı (Shaker: Heidolph Instruments, Vibramax 100) yardımıyla 20 dakika süreyle boyanmıştır. Boyanan jel UV görüntüleme sisteminde (G-box, SYNGENE) görüntülenmiştir.

3.5. Yeni Nesil Sekanslama (NGS) Teknolojisi ile Elde Edilen Ham Verilerin İşlenmesi ve Kloroplast Genom Sekansı Eldesi

Kloroplast DNA izolasyonu gerçekleştirilen iki nohut türünün kloroplast DNA'ları ortalama 50 ng/ul olacak şekilde seyreltilerek, kloroplast genom dizilerinin elde edilmesi amacıyla Beijing Genome Institute (BGI, Hong Kong, Çin)'ne sekanslamaya gönderilmiştir ve tüm genom sekanslama yöntemi (Whole Genome Sequencing, WGS) cihazında DNA Nanoball teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler doğrultusunda, ilk olarak 1µg cpDNA'nın random bir şekilde fragmentasyonu sağlanmış olup ardından 200-400 bp aralığındaki fragmentler Agencourt AMPure XP-Medium kit kullanılarak seçilmiştir. Elde edilen fragmentlerin 3' ucunda adenilasyon gerçekleştirilerek, adaptörlerin fragmentlere ligasyonu sağlanmıştır. Bu fragmentlerin çoğaltımı PCR ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri Agencourt AMPure XP-Medium kit ile pürifiye edilmiştir. Çift sarmallı PCR ürünleri ısı ile denature edilerek tek zincirli hale getirilmiş, ardından splint oligo dizisi ile tek sarmallı halkasal DNA (ssCir DNA) elde edilerek kütüphane oluşturulmuştur. Kütüphanenin kalifikasyonu QC ile gerçekleştirilmiştir. ssCir DNA molekülleri, rolling-cycle replikasyonu ile içerisinde 300'den fazla kopya-DNA içeren bir DNA Nanoball (DNB) haline dönüştürülmüştür. Bu DNB'ler, yüksek yoğunluklu DNA nanochip teknolojisi kullanılarak, belirli bir pattern'e sahip olan nanoarray'lere yüklenmiştir. Son olarak, paired-end olan 100 bp uzunluğundaki okumalar combinatorial Probe-Anchor Synthesis (cPAS) ile elde edilmiştir BGISEQ-500 sekanslama cihazı ile sekanslanmıştır (Fehlmann et al., 2016). Tüm genotiplerin ilk olarak ham sekans bilgileri FastQ olarak elde edilmiş, ardından her bir genomu ait FASTA sekansları oluşturulmuştur.

Kloroplast genom sekanslarının montaj (assembly) işlemleri Organelle (v1.7.4.1) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve seed file olarak aksesyon numarası NCBI: MH909600.1 olan *Carya illinoensis*'in tüm kloroplast genomu seçilmiştir. Downstream anotasyonlar için montajlaması yapılan sekanslar içerisinde seçim yapılarak, online bir yazılım olan Geseq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) ile genom anotasyonları gerçekleştirilmiştir (Tillich et al., 2017). Tüm genom sekanslama yöntemi kullanılarak elde edilen üç farklı nohut türüne ait kloroplast dizilerinin karşılaştırmalı analizi birden fazla program kullanılarak elde edilmiştir. Organellar Genome DRAW (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) veritabanı ile üç farklı türe ait kloroplast genom haritaları oluşturulmuştur (Greiner et al., 2019).

3.6. Kloroplast Dizi Bilgilerinin Biyoinformatik Araçlar ile Karşılaştırmalı Analizlerinin Yapılması

Üç farklı türe ait kloroplast genom sekanslarının karşılaştırmalı analizleri için mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>) programı kullanılmıştır (Frazer et al., 2004). Bu analiz için *Cicer arietinum* kloroplast genomuna ait veriseti NCBI'dan NC_011163.1 aksesyon kodu kullanılarak elde edilmiştir. Karşılaştırmalı analizi yapılacak tüm türlerin fasta sekansları ve buna ek olarak anotasyon dosyaları online sisteme yüklenip, Shuffle-LAGAN modu seçilerek analiz gerçekleştirilmiştir (Brudno et al., 2003). Her bir türün içerisinde bulundurduğu genlerin sırasının karşılaştırmalı analizi ve homolojisinin belirlenmesi amacıyla MAUVE Alignment (<http://darlinglab.org/mauve/download.html>) programı kullanılmıştır (Darling et al., 2004). Bu alignment gerçekleştirilirken progressiveMAUVE seçeneği seçilmiş olup default parametreler kullanılmıştır. MAUVE alignment sonucunda yabancı tür olan *Cicer echinospermum*'da saptanan sekans inversiyonun incelenmesi ve doğrulanması amacıyla bu tür için elde edilen sekans bilgisinin, bir alignment programı olan Bowtie 2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) ile alignment'ı yapılmıştır (Langmead & Salzberg, 2012). Bu alignment ile De Novo Assembly'si gerçekleştirilen sekansların montajlama (assembly) sürecinde bir hata olup olmadığı incelenebilmektedir. Bowtie 2 ile yapılan alignment sonuçları, Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) ile görüntülenerek

gerçekleştirilen montajlama işlemlerinin kontrolü sağlanmıştır (Robinson et al., 2011).

3.7. Kloroplast Genomlarında Kısa Tekrar Dizilerinin (SSR) ve Tandem Tekrarlarının Tespiti

Kloroplast genomu boyunca genom içerisinde yer alan kısa tekrar dizileri (mikrosatellitler) MIcroSAtellite Identification Tool (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) programı kullanılarak tespit edilmiştir (Beier et al., 2017). Bu programda, genom içerisindeki SSR tespiti için kullanılan parametreler; >10 mononükleotit için, >5 dinükleotit için, >5 trinükleotit için, >3 tetranükleotit için, >3 pentanükleotit için ve 3> hegzanükleotit için olacak şekilde oluşturulmuştur. Buna ek olarak genom içerisinde yer alan forward, reverse, komplementer ve palindromik tekrarların tespiti için REPuter (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer/>) online analiz aracı kullanılmıştır (Kurtz et al., 2001). Bu analiz için minimum tekrar baz sayısı 30 bp ve hamming uzaklığı 3 olarak belirlenmiştir. Tandem tekrarların tespitinde ise online analiz aracı olarak Tandem Repeat Finder (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) programı kullanılmış olup, advanced default ayarları (alignment için match, mismatch, indels: 2,7,7) ile analizler gerçekleştirilmiştir (Benson, 1999).

3.8. Kodon Kullanma Eğilimi Analizi (Codon Usage Bias)

Üç farklı nohut türünün kodon kullanma istatistiğini analiz etmek amacıyla, her bir türün Fasta sekansları ayrı ayrı MEGA-X programına yüklenmiştir (Kumar et al., 2018). Models seçeneğinden “Compute Codon Usage Bias” opsiyonu seçilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verinin görselleştirilmesi için R programlama dilinde bulunan “ggpubr” paketi kullanılmıştır.

3.9. Nükleotit Farklılaşma Analizi (Divergent Hot Spot Analysis)

Üç farklı nohut türünde genom içerisinde gerçekleşen nükleotit farklılaşmalarının tespiti için ilk olarak türler arasında çoklu hizalama gerçekleştirilmiştir. Bu çoklu hizalama (MSA, Multiple Sequence Alignment) default parametreler ile MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) online aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Katoh et al., 2018). Ardından türler arası nükleotit farklılaşmasını (Nucleotide Pi Diversity) hesaplamak ve görselleştirmek

amacıyla DnaSP v6.11.01 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) programı kullanılmıştır (Rozas et al., 2017). Görselleştirmek için seçilen Sliding Window opsiyonu için parametlere olan window lenght 600 bp, ve step size 200 bp olarak belirlenmiştir.

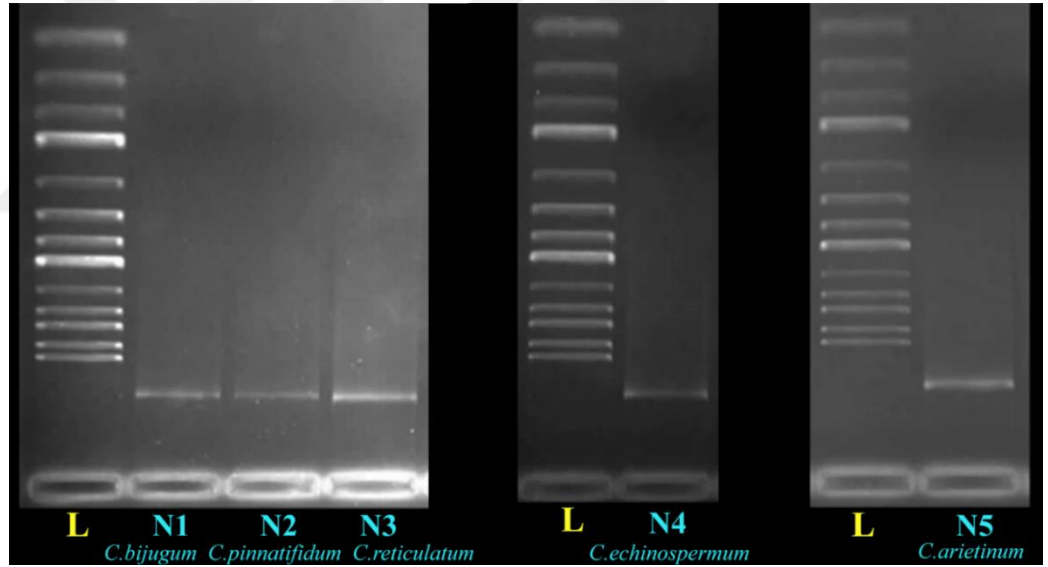
3.10. Kloroplast Dizi Bilgisi Kullanılarak Gerçekleştirilen Filogenetik Analizler

Filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılan türlerin, tüm kloroplast genom sekansları kullanılmıştır. Üç farklı nohut türü olan *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum*’ a ek olarak *Fabaceae* ailesine ait dört farklı türün ve bir “outgrup” oluşturacak türün (*Triticum aestivum*) tüm kloroplast genom verisi kullanılmıştır. NCBI veri tabanından sırasıyla; *Lens culinaris* (NC_027152.1), *Vicia faba* (KF_042344.1), *Medicago sativa* (NC_042841.1), *Glycine max* (NC_007942.1) ve *Triticum aestivum* (NC_002762.1) türlerinin tüm kloroplast genom sekansları parantez içerisinde verilen aksesyon kodu ile elde edilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmak için ilk olarak tüm dizilerin çoklu hizalaması (MSA, Multiple Sequence Alignment) default parametreler ile MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) online aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analiz için; Maximum Likelihood (ML) methodu seçilmiş olup, ağaç için en uygun model testi yapıldıktan sonra, süstitüsyon modeli olarak “General Time Reversible Model” ve “Gamma Distributed (G)” (GTRGAMMA) tercih edilmiştir. Filogeni doğrulama testi olarak Bootstrap seçilmiş olup, bootstrap replikasyonu 1000 olarak belirlenmiştir (Kumar et al., 2018).

4. BULGULAR

4.1. Kloroplast DNA İzolasyonu Sonuçları

Gerçekleştirilen kloroplast DNA (cpDNA) izolasyonu sonucu elde edilen nohut türlerine ait cpDNA örnekleri %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek saflık analizi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.1.'de gösterilmektedir. Şekil 4.1.'de yer alan N3 (*Cicer reticulatum*), N4 (*Cicer echinospermum*) ve N5 (*Cicer arietinum*) türleri bu çalışmada kullanılmıştır. Ek olarak bu örneklerden elde edilen cpDNA'nın NanoDrop 1000 (ND-1000, Thermo Co.) cihazı ile saflık ve miktar tayini gerçekleştirilmiş olup bu analize ait bilgiler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çizelge 4.1.'de yer alan A_{260}/A_{280} değerlerinin 1.8-2.0 aralığına yakın olması ve A_{260}/A_{230} değerlerinin 2.0'ın üzerinde olması nedeniyle izolasyonu gerçekleştirilen üç farklı tür nohut cpDNA'sının yüksek miktarda, kaliteli ve saf bir şekilde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.1. İzolasyonu gerçekleştirilen kloroplast DNA'larının %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü.

Çizelge 4.1. İzole edilen kloroplast DNA'larının NanoDrop 1000 cihazında gerçekleştirilen spektrofotometrik kalite tayini.

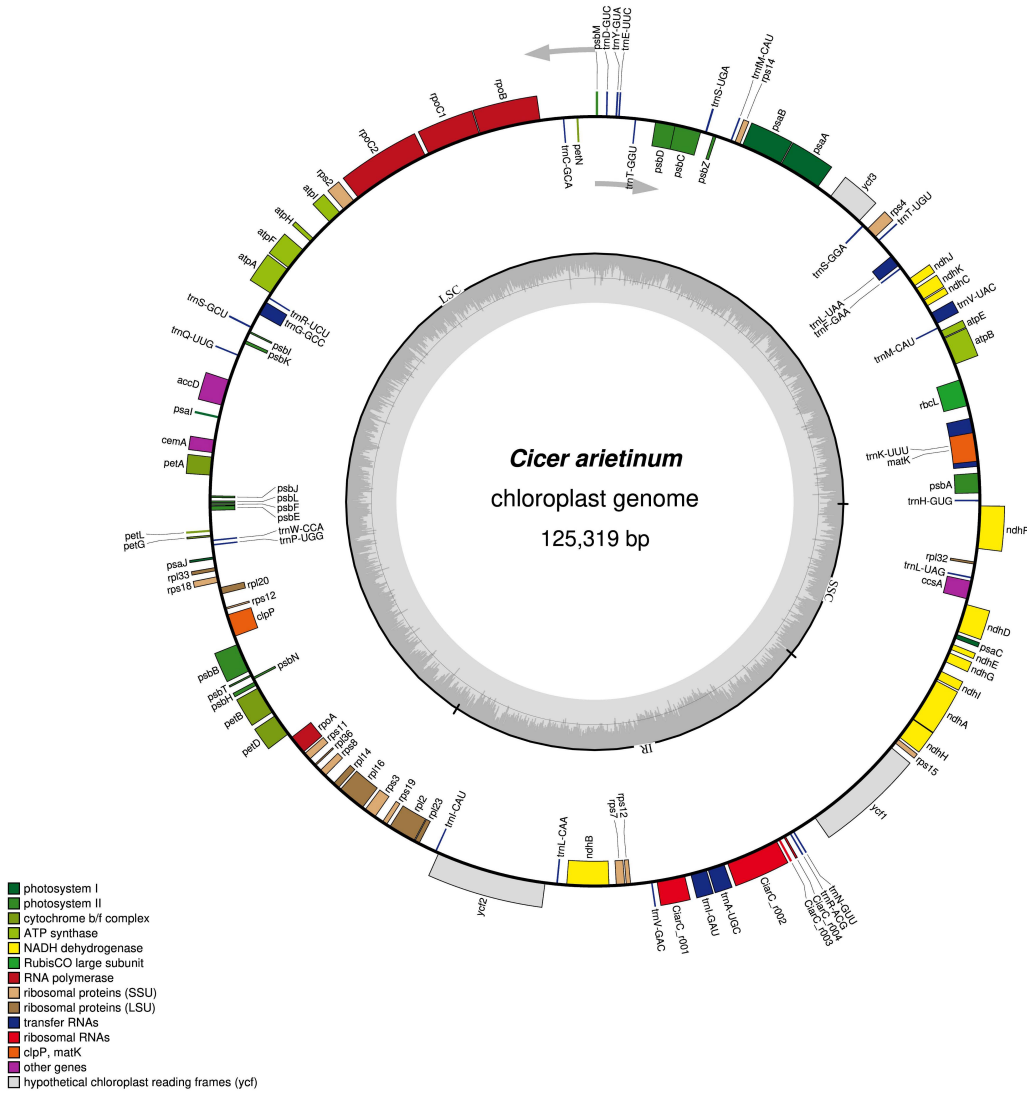
Tür Adı	Örnek Adı	ng/ul	260/280	260/230
<i>Cicer reticulatum</i>	N3	2708,69	2,06	2,16
<i>Cicer echinospermum</i>	N4	2781	2,05	2,09
<i>Cicer arietinum</i>	N5	4002,00	1,90	2,02

4.2. Kloroplast Genom Haritasının Oluşturulması ve Genom İçeriklerinin Belirlenmesi

Gerçekleştirilen bu çalışmada üç farklı nohut türünün kloroplast genom haritaları OGDRAW analiz aracından elde edilmiştir. *Cicer arietinum* ve iki yabancı nohut türü olan *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* türleri için elde edilen kloroplast genom bilgileri aşağıda yer almaktadır. Yabancı nohut türlerinin kloroplast genom sekansları ilk kez bu çalışmada elde edilmiştir.

4.2.1. *Cicer arietinum* Kloroplast Genomu Tanıtımı

Yapılan biyoinformatik analiz sonucu elde edilen *Cicer arietinum* türüne ait kloroplast genom haritası Şekil 4.2.'de verilmektedir. Bu türde spesifik olarak kodlanan genlerin listesi ise Çizelge 4.2.'de verilmektedir.



Şekil 4.2. *Cicer arietinum* türünün elde edilen kloroplast genom haritası.

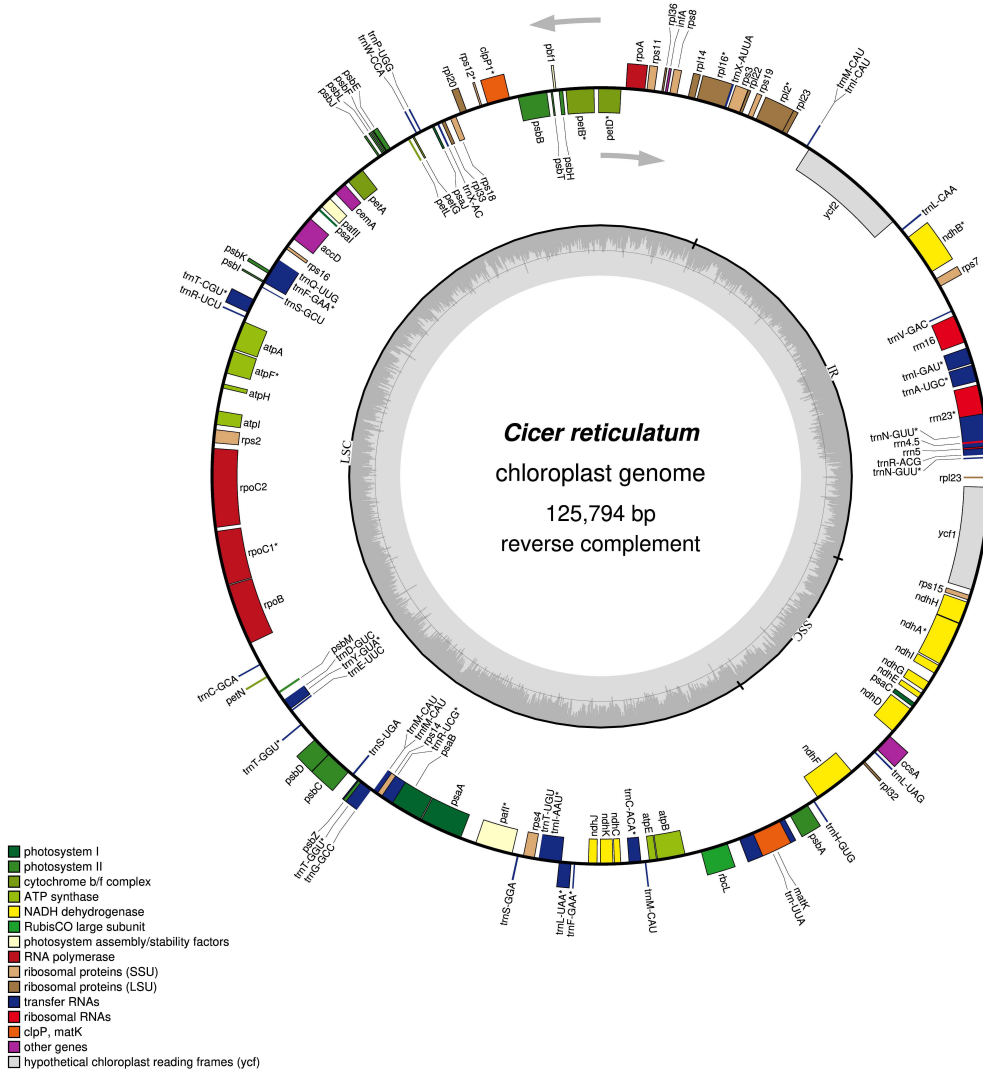
Çizelge 4.2. *Cicer arietinum* türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.

Kategori	Gen grupları	Gen isimleri
Replikasyon genleri	Ribozom büyük alt ünite proteinleri	rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36
	Ribozom küçük alt ünite proteinleri	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19
	DNA bağımlı RNA polimeraz	rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2
	Ribozomal RNA genleri	rrn4.5, rrn5, rrn16, rrn23
	Transfer RNA genleri	trnH-GUG, trnK-UUU, trnM-CAU, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-UAC, trnV-GAC, trnF-GAA, trnFM-CAU, trnL-UAA, trnL-CAA, trnL-UAG, trnS-UGA, trnS-GCU, trnS-GGA, trnG-UCC, trnG-GCC, trnE-UUC, trnY-GUA, trnD-GUC, trnC-GCA, trnR-UCU, trnR-ACG, trnQ-UUG, trnW-CCA, trnP-UGG, trnI-GAU, trnI-CAU, trnA-UGC, trnN-GUU
Fotosentez mekanizmasında rol oynayan genler	Fotosistem I	psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ
	Fotosistem II	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ
	RUBISCO	rbcL
	ATP-sentetaz alt ünite genleri	atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI
	NADH-dehidrogenaz alt ünite genleri	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK
	Sitokrom b/f komplek genleri	petA, petB, petD, petG, petL, petN
Diğer genler	Proteaz	clpP
	Maturaz	matK
	Zarf membran proteini	cemA
	Translasyon başlatıcı faktör	infA
	C-type sitokrom sentez geni	ccsA
	Asetil-CoA-karboksilaz alt ünite geni	accD
Fonksiyonu bilinmeyen genler	Hipotetik korunmuş kloroplast genleri	ycf1, ycf2, ycf3 (pafI), ycf4 (pafII)

Elde edilen verilere göre *Cicer arietinum*'un kloroplast genom boyutu 125,319 bp olarak bulunmuş ve toplam 112 adet genin bu genomda kodlandığı tespit edilmiştir. Her bir genin ait olduğu fonksiyonel gruplar Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Şekil 4.2.'de yer alan genom haritasında halkanın iç tarafında yer alan genler saat yönünde transkribe olurken, halkanın dış tarafında bulunan genler saat yönünün tersine transkribe olmaktadır. Halkasal genom içerisinde yer alan açık gri bölge genomun AT içeriğini, koyu gri bölge ise GC içeriğini göstermektedir. Farklı fonksiyonel gruplara ait olan genler farklı renklerde gösterilmektedir.

4.2.2. *Cicer reticulatum* Kloroplast Genomu Tanıtımı

Yapılan biyoinformatik analiz sonucu *Cicer arietinum* türüne ait kloroplast genom haritası Şekil 4.3.'te verilmektedir. Bu türde spesifik olarak kodlanan genlerin listesi ise Çizelge 4.3.'te verilmektedir.



Şekil 4.3. *Cicer reticulatum* türünün elde edilen kloroplast genom haritası.

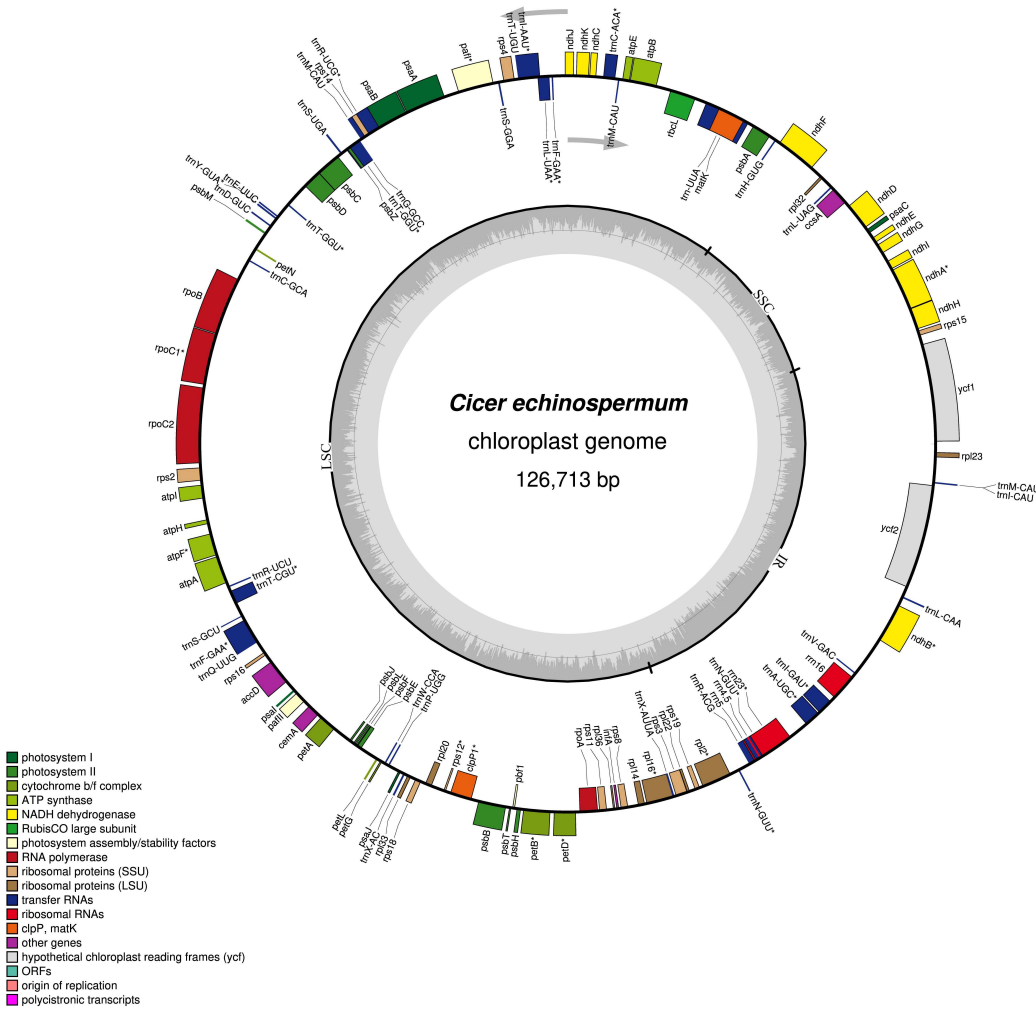
Çizelge 4.3. *Cicer reticulatum* türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.

Kategori	Gen grupları	Gen isimleri
Replikasyon genleri	Ribozom büyük alt ünite proteinleri	rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36
	Ribozom küçük alt ünite proteinleri	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19
	DNA bağımlı RNA polimeraz	rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2
	Ribozomal RNA genleri	rrn4.5, rrn5, rrn16, rrn23
	Transfer RNA genleri	trnH-GUG, trnK-UUU, trnM-CAU, trnT-CGU, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-UAC, trnV-GAC, trnF-GAA, trnM-CAU, trnL-UAA, trnL-CAA, trnL-UAG, trnS-UGA, trnS-GCU, trnS-GGA, trnG-UCC, trnG-GCC, trnE-UUC, trnY-GUA, trnD-GUC, trnC-GCA, trnC-ACA, trnR-UCU, trnR-ACG, trnR-UCG, trnQ-UUG, trnW-CCA, trnP-UGG, trnI-GAU, trnI-AAU, trnI-CAU, trnA-UGC, trnN-GUU
Fotosentez mekanizmasında rol oynayan genler	Fotosistem I	psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ
	Fotosistem II	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbN, psbM, psbT, psbZ
	RUBISCO	rbcL
	ATP-sentetaz alt ünite genleri	atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI
	NADH-dehidrogenaz alt ünite genleri	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK
	Sitokrom b/f komplek genleri	petA, petB, petD, petG, petL, petN
Diğer genler	Proteaz	clpP
	Maturaz	matK
	Zarf membran proteini	cemA
	Translasyon başlatıcı faktör	infA
	C-type sitokrom sentez geni	ccsA
	Asetil-CoA-karboksilaz alt ünite geni	accD
Fonksiyonu bilinmeyen genler	Hipotetik korunmuş kloroplast genleri	ycf1, ycf2, ycf3 (pafI), ycf4 (pafII)

Elde edilen verilere göre *Cicer reticulatum*'un kloroplast genom boyutu 125,794 bp olarak bulunmuş ve toplam 117 adet genin bu genomda kodlandığı saptanmıştır. Her bir genin ait olduğu fonksiyonel gruplar Çizelge 4.3.'te gösterilmektedir. Şekil 4.3.'te yer alan genom haritasında, genomun GC içeriği iç halkadaki koyu gri bölge ile AT içeriği ise açık gri bölge ile temsil edilmektedir. Genom üzerinde bulunan genlerin transkripsiyonu saat yönünde veya saat yönünün tersine olacak şekilde farklılık göstermektedir. Her bir gen kendine ait fonksiyonel gruba ait renklerde gösterilmektedir.

4.2.3. *Cicer echinospermum* Kloroplast Genomu Tanıtımı

Yapılan biyoinformatik analiz sonucu *Cicer echinospermum* türüne ait kloroplast genom haritası Şekil 4.4.'te verilmektedir. Bu türde spesifik olarak kodlanan genlerin listesi ise Çizelge 4.4.'te verilmektedir.



Şekil 4.4. *Cicer echinospermum* türünün elde edilen kloroplast genom haritası.

Çizelge 4.4. *Cicer echinospermum* türünün kloroplast genom organizasyonunda rol oynayan genler.

Kategori	Gen grupları	Gen isimleri
Replikasyon genleri	Ribozom büyük alt ünite proteinleri	rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36
	Ribozom küçük alt ünite proteinleri	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19
	DNA bağımlı RNA polimeraz	rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2
	Ribozomal RNA genleri	rrn4.5, rrn5, rrn16, rrn23
	Transfer RNA genleri	trnH-GUG, trnK-UUU, trnM-CAU, trnT-CGU, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-UAC, trnV-GAC, trnF-GAA, trnM-CAU, trnL-UAA, trnL-CAA, trnL-UAG, trnS-UGA, trnS-GCU, trnS-GGA, trnG-UCC, trnG-GCC, trnE-UUC, trnY-GUA, trnD-GUC, trnC-GCA, trnC-ACA, trnR-UCU, trnR-ACG, trnR-UCG, trnQ-UUG, trnW-CCA, trnP-UGG, trnI-GAU, trnI-CAU, trnA-UGC, trnN-GUU
Fotosentez mekanizmasında rol oynayan genler	Fotosistem I	psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ
	Fotosistem II	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbN, psbM, psbT, psbZ
	RUBISCO	rbcL
	ATP-sentetaz alt ünite genleri	atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI
	NADH-dehidrogenaz alt ünite genleri	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK
	Sitokrom b/f komplek genleri	petA, petB, petD, petG, petL, petN
Diğer genler	Proteaz	clpP
	Maturaz	matK
	Zarf membran proteini	cemA
	Translasyon başlatıcı faktör	infA
	C-type sitokrom sentez geni	ccsA
	Asetil-CoA-karboksilaz alt ünite geni	accD
Fonksiyonu bilinmeyen genler	Hipotetik korunmuş kloroplast genleri	ycf1, ycf2, ycf3 (pafI), ycf4 (pafII)

Elde edilen verilere göre *Cicer echinospermum*'un kloroplast genom boyutu 126,713 bp olarak bulunmuş ve toplam 116 adet genin bu genomda kodlandığı saptanmıştır. Her bir genin ait olduğu fonksiyonel gruplar Çizelge 4.4.'te gösterilmektedir. Şekil 4.4'te yer alan genom haritasında, genomun AT içeriği iç halkadaki açık gri bölge ile GC içeriği koyu gri bölge ile gösterilmektedir. Her bir gen kendine ait fonksiyonel gruba ait renklerde gösterilmektedir ve transkripsiyon yönüne göre halkanın iç tarafına ya da dış tarafına olacak şekilde yerleştirilmiştir.

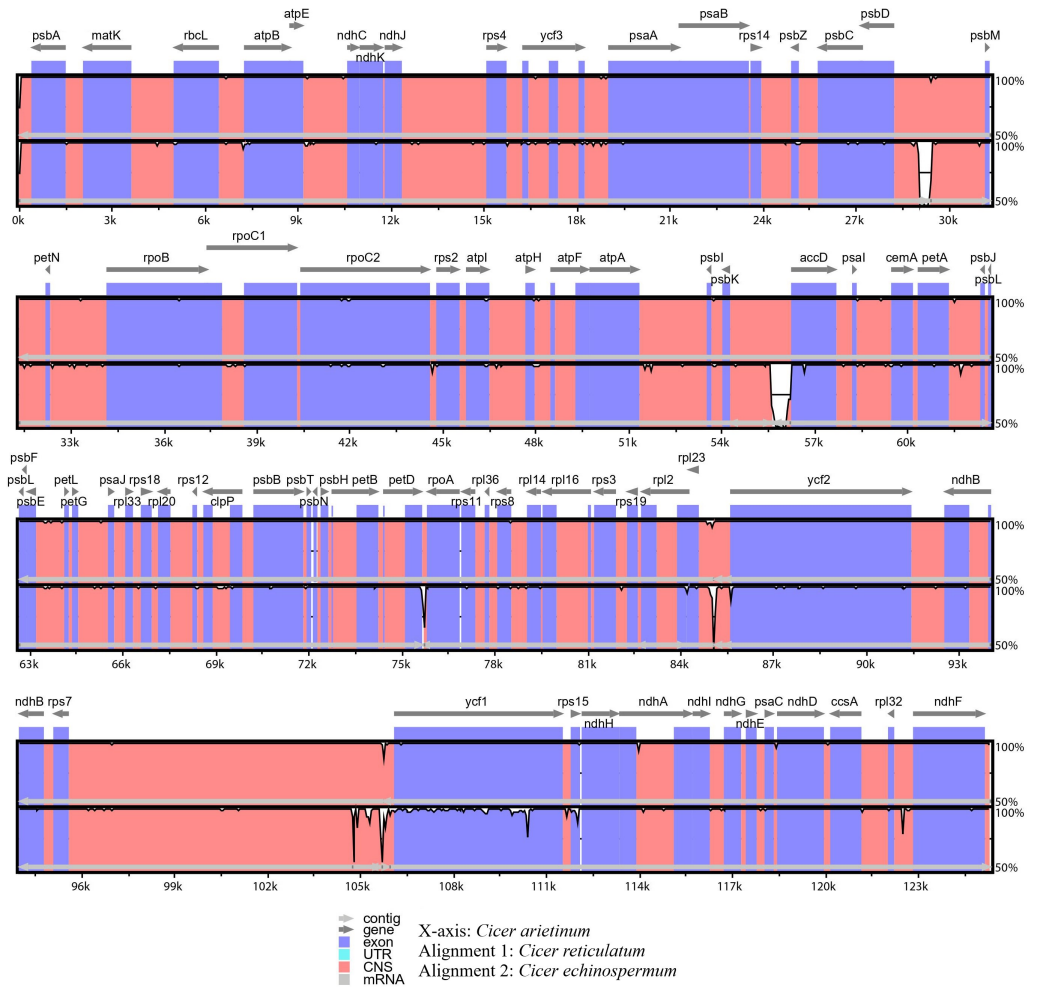
4.3. Kloroplast Genomlarının Karşılaştırmalı Analizi

Bu çalışmada kullanılan üç türün, gen içeriği, kodlanan gen sayısı ve AT/GC içeriği, ortalama gen büyüklüğü gibi parametrelere göre karşılaştırılması yapılmış olup yapılan karşılaştırmalar Çizelge 4.5.'te verilmiştir. *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* türlerinin kloroplast genomunda yalnızca uzun tekli kopya bölgesi (LSC), küçük tekli kopya bölgesi (SSC) ve tek bir tekrar bölgesi (IR) yer aldığı tespit edilmiştir. Sırasıyla *Cicer arietinum*'un; LSC bölgesi 82,528 bp, SSC bölgesi 13,038 ve IR bölgesi 29,753 olarak, *Cicer reticulatum*'un LSC bölgesi 82,531, SSC bölgesi 13,314 ve IR bölgesi 29,949 ve *Cicer echinospermum*'un LSC bölgesi 83,129 bp, SSC bölgesi 13,288 bp ve IR bölgesi 30,296 bp olarak bulunmuştur. Üç kloroplast genomunun GC içeriği sırasıyla 33,9%, 33,9%, ve 33,8% olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Üç farklı nohut türünün kloroplast genom içeriklerinin karşılaştırılması.

Tür Adı	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Cicer reticulatum</i>	<i>Cicer echinospermum</i>
Size (bp)	125,319	125,794	126,713
LSC (bp)	82,528	82,531	83,129
SSC (bp)	13,038	13,314	13,288
IR (bp)	29,753	29,949	30,296
Gen	112	117	116
CDS/Bulunma yüzdesi	75/ 69.4%	76/ 66.6%	76/ 67.2%
tRNA/Bulunma yüzdesi	29/ 26.8%	34/ 29.8%	33/ 29.2%
rRNA/Bulunma yüzdesi	4/ 3.7%	4/ 3.5%	4/ 3.5%
Ortalama gen büyüklüğü (bp)	1118	1075	1092
GC %	33,9%	33,9%	33,8%
AT %	66,1%	66,1%	66,2%

Elde edilen iki farklı yabancı nohut türü olan *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum*'un kloroplast genomundan ve kültür nohut türü olan *Cicer arietinum*'un kloroplast genomundan sentezlenen genlerin karşılaştırmalı analizi mVISTA programı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup Şekil 4.5.'te gösterilmektedir. Genom içerisinde evrimsel süreçte farklılaşan genlerin farklılaşma seviyesi piklerle ilişkilendirilmiştir. Pik seviyesi yüksek olan genom bölgelerinde maksimum seviyede farklılaşma meydana gelmiştir. Gerçekleştirilen mVISTA analizinde, birinci hizalama *Cicer reticulatum* türünde meydana gelen farklılaşma noktalarını gösterirken, ikinci hizalama *Cicer echinospermum* türünde meydana gelen farklılaşma noktalarını göstermektedir. Şekil 4.5.'te yapılan analizde gri oklar genlerin sentez yönünü, mor bölgeler ekzonları ve pembe bölgeler ise genomda kodlanmayan kısımları göstermektedir. Kloroplast genomları arasındaki benzerlik, Y ekseninde %50-%100 arasında gösterilmektedir.

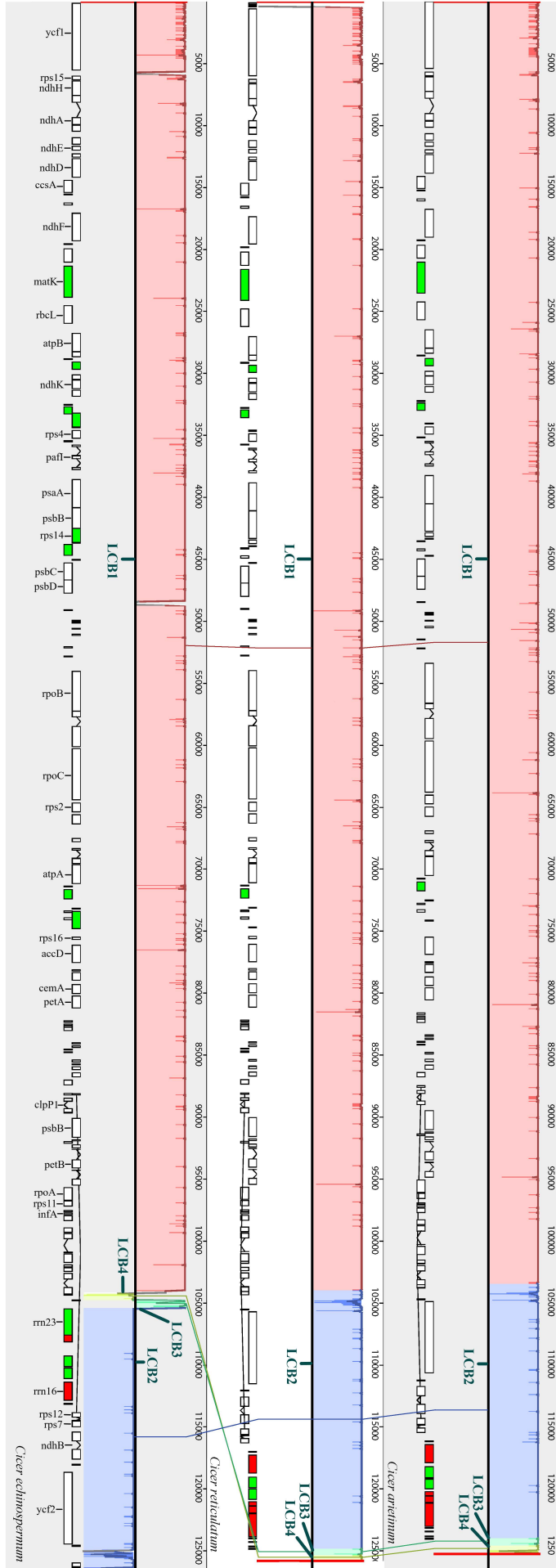


Şekil 4.5. mVISTA program kullanılarak elde edilen karşılaştırmalı analiz görseli.

4.4. Kloroplast Genomlarında Gen Sırası ve Homoloji Analizi

Her kloroplast genomunun kendine özgü bir yapısı bulunmaktadır. Her türe spesifik olan bu gen düzenini incelemek amacıyla MAUVE Alignment yapılarak, türlerin gen düzeni ve genler arasındaki homoloji belirlenmiştir. Bu homoloji analizine göre türler arasında maksimum benzerlik gösteren bölgeler Locally Colinear Blocks (LCB) olarak adlandırılmaktadır. Bu analiz için referans genom olarak *Cicer arietinum*'un kloroplast genomu seçilmiştir ve analizin gerçekleştirilmesi için GenBank dosyası kullanılmıştır. ProgressiveMAUVE alignment seçeneği seçilerek default parametreler ile gerçekleştirilen analiz görseli Şekil 4.6.'da yer almaktadır. Bu analize göre *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* türlerinin gen sırası ve benzerliği açısından yüksek benzerlik gösterdiği, *Cicer echinospermum* türünde ise LCB2 bölgesinde bir inversiyon olduğu saptanmıştır.

Bu analiz sonucunda *Cicer echinospermum* türünde gözlenen inversiyonun anlamlandırılması ve doğrulanması amacıyla ek bir downstream analizi olarak Bowtie 2 Alignment yapılmıştır ve IGV programı aracılığıyla görüntülenmiştir. Bu analiz doğrultusunda elde edilen kloroplast sekansının montajlanmasının (assembly) doğruluğu denetlenmiştir. Elde edilen analizin sonucu Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Bowtie2 ile yapılan ilk alignment referans genomu olan *Cicer arietinum* ve *Cicer echinospermum* arasında gerçekleştirilmiştir. Bu alignment sonucunda, referans cp genomu ve *Cicer echinospermum* cp genomunu arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiş ve bu farklılıklar Breakpoint'ler (kırılma noktası) olarak adlandırılmıştır. Yapılan ikinci alignmentta ise *Cicer echinospermum*'un assembly kontrolünü sağlamak amacıyla, referans olarak kendi kloroplast genomunun fasta sekansı kullanılmıştır. Burada, *Cicer echinospermum*'un genomunda birbiriyle uyumlu ve continuous (sürekli) okumaların olduğu gözlenmiştir. Gerçekleştirilmiş olan assembly (montajlama) işlemlerinde bir hata bulunmadığından *Cicer echinospermum* türünde gözlenen bu inversiyonun kloroplast genomunda meydana gelen bir yapısal rearrangement (yeniden düzenleme) olduğu saptanmış ve bu durum in silico biyoinformatik analizlerle kanıtlanmıştır.

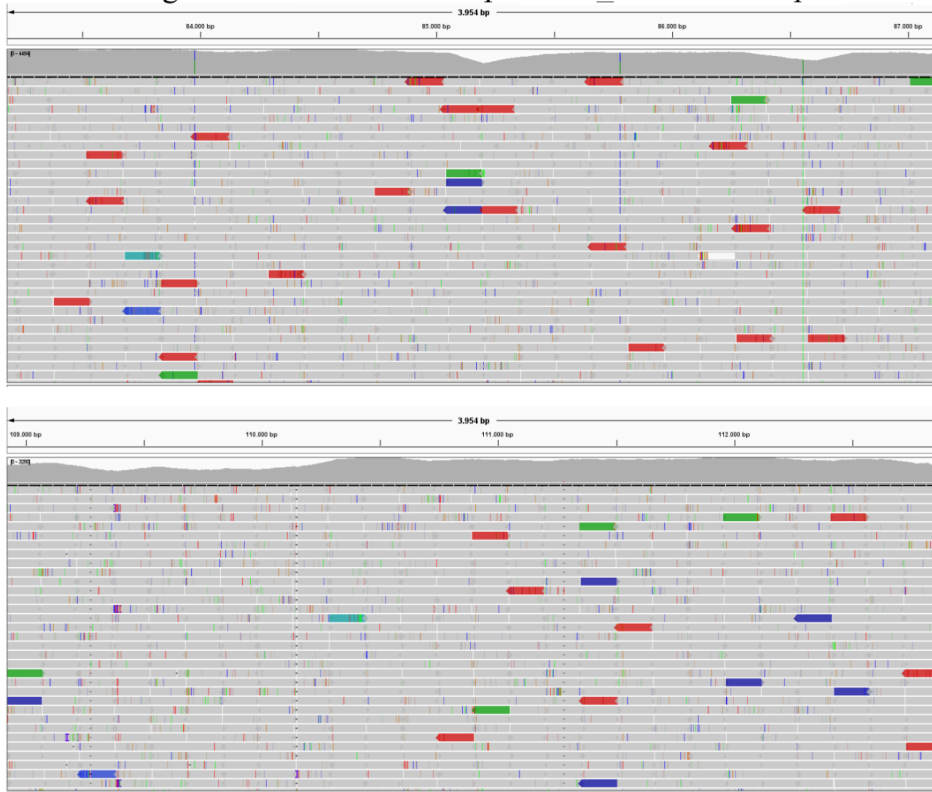


Şekil 4.6. MAUVE Alignment ile elde edilen her türe spesifik gen sırası ve homoloji analizi.

Bowtie2 Alignment 1 : *Cicer arietinum* _ *Cicer echinospermum*



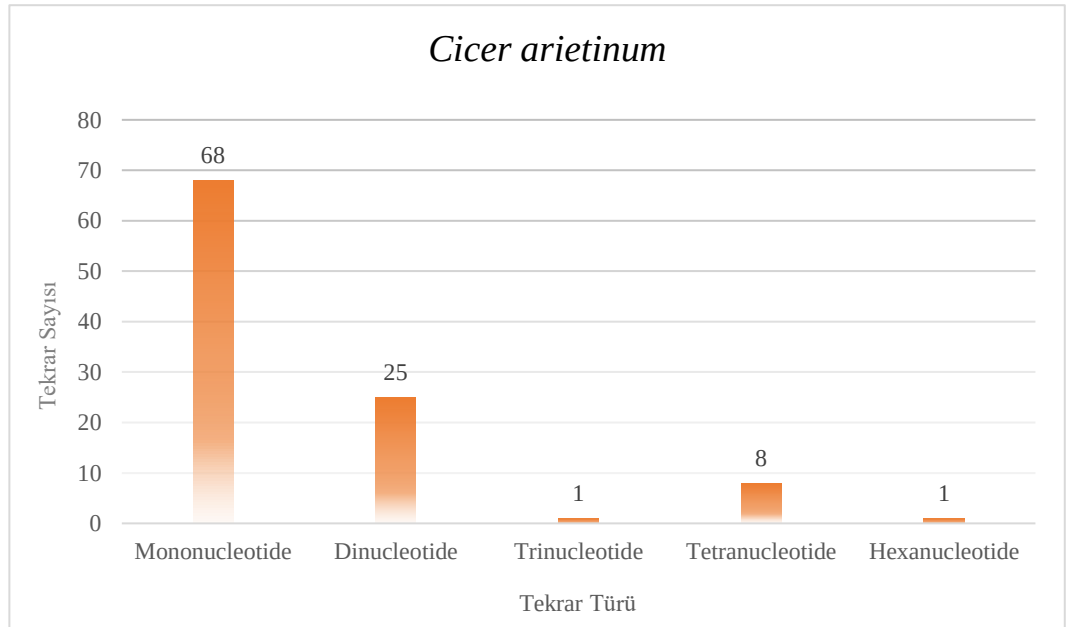
Bowtie2 Alignment 2 : *Cicer echinospermum* _ *Cicer echinospermum*



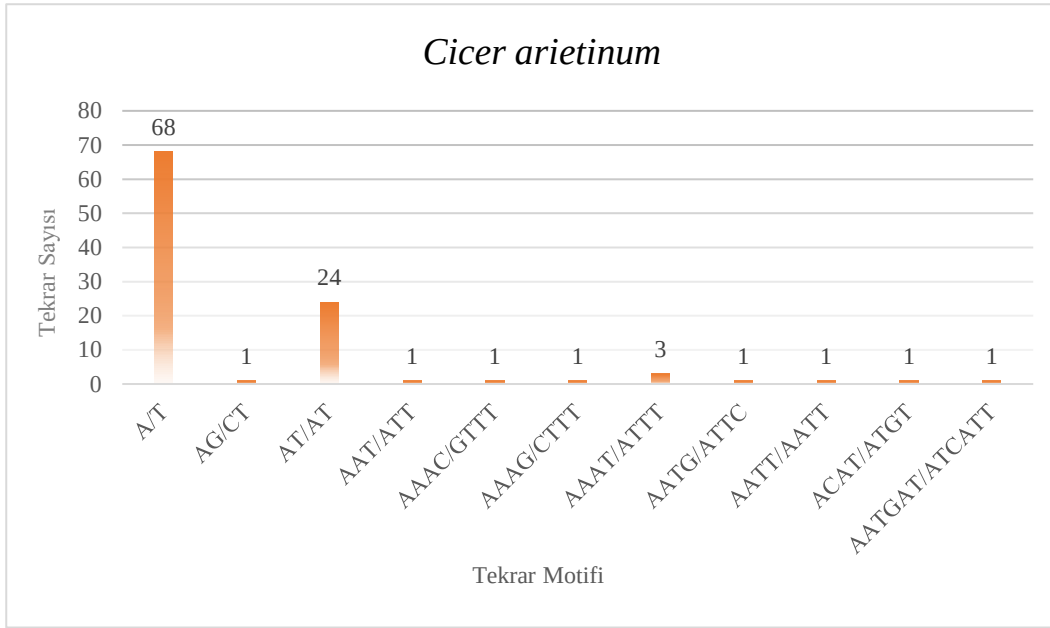
Şekil 4.7. Bowtie2 Alignment verilerinin IGV aracında görüntülenmesi.

4.5. Kloroplast Genomlarında Kısa Tekrar Dizileri ve Tandem Dizi Analizleri

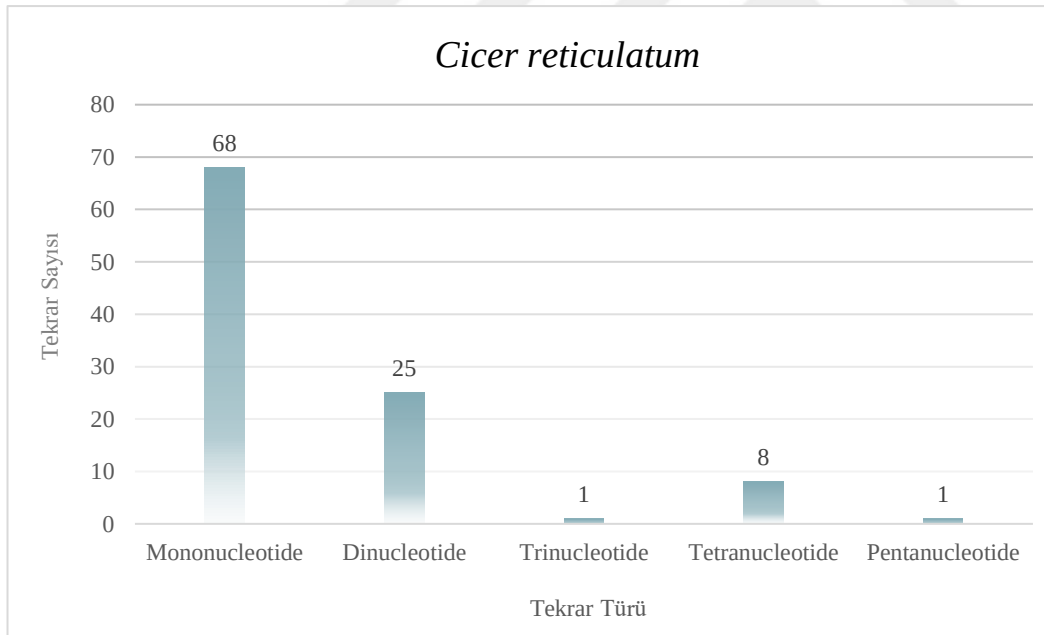
Kloroplast genomu içerisinde yer alan basit dizi tekrarları, MicroSAteellite Identification Tool (MISA) kullanılarak tespit edilmiş ve elde edilen veriler kullanılarak SSR tekrar sayıları ve SSR motif tipleri için grafikler oluşturulmuştur. Üç farklı türün ayrı bir şekilde analizleri gerçekleştirilmiştir. *Cicer arietinum* türü için yapılan SSR sayı analizi Şekil 4.8.'da ve SSR motif tipleri analizi Şekil 4.9.'de verilmiştir. *Cicer reticulatum* türüne ait SSR sayı analizi Şekil 4.10. ve motif tipleri Şekil 4.11.'da verilmiştir. *Cicer echinospermum* türü için yapılan SSR sayı analizi Şekil 4.12 ve SSR motif tipleri analizi Şekil 4.13.'de verilmiştir. Tüm türlerin yer aldığı tekrar türü ve sayısını gösteren grafik Şekil 4.14. ve tekrar motifi ve sayısını gösteren grafik ise Şekil 4.15'te yer almaktadır. Bu analizlere ek olarak genom içerisinde bulunan forward, reverse, komplementer, palindromik ve tandem tekrarların analizi yapılmış olup üç farklı nohut türü için bu verilerin daire grafikleri oluşturulmuştur. *Cicer arietinum* türü için tekrar analizleri Şekil 4.16'te, *Cicer reticulatum* türü için tekrar analizleri Şekil 4.17.'de ve *Cicer echinospermum* içinse Şekil 4.18.'da gösterilmektedir.



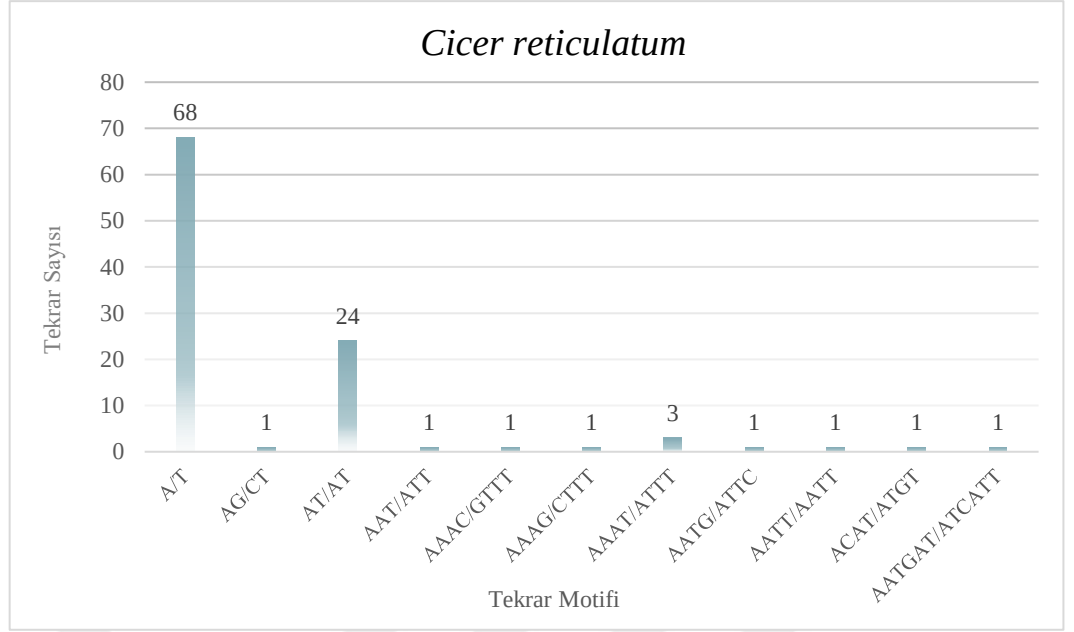
Şekil 4.8. MISA programı kullanılarak *Cicer arietinum* türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.



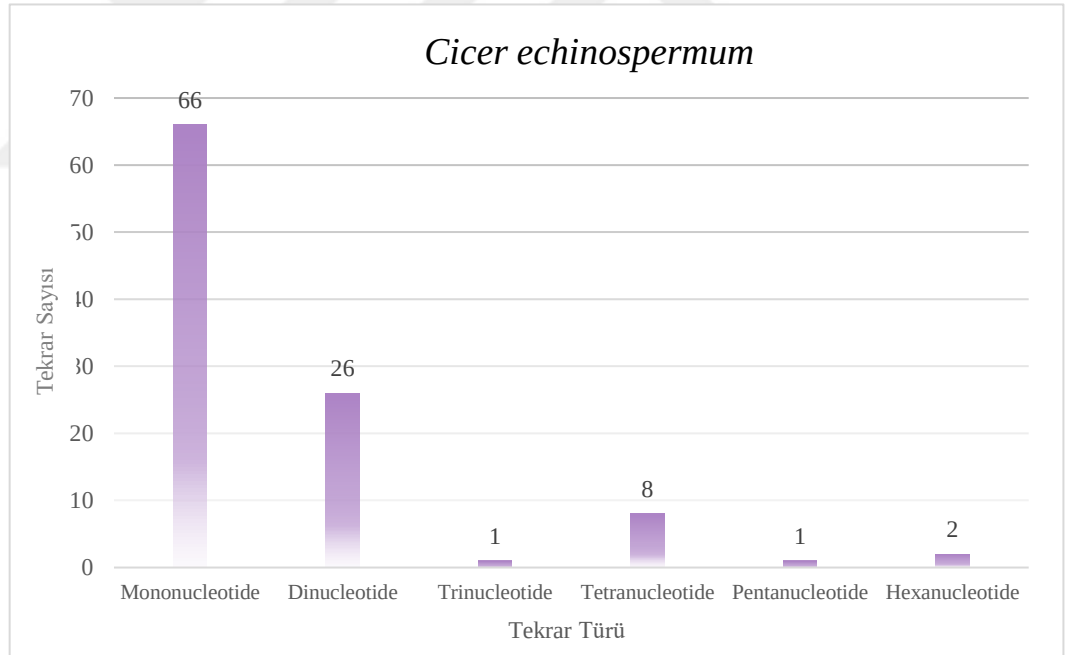
Şekil 4.9. MISA programı kullanılarak *Cicer arietinum* türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.



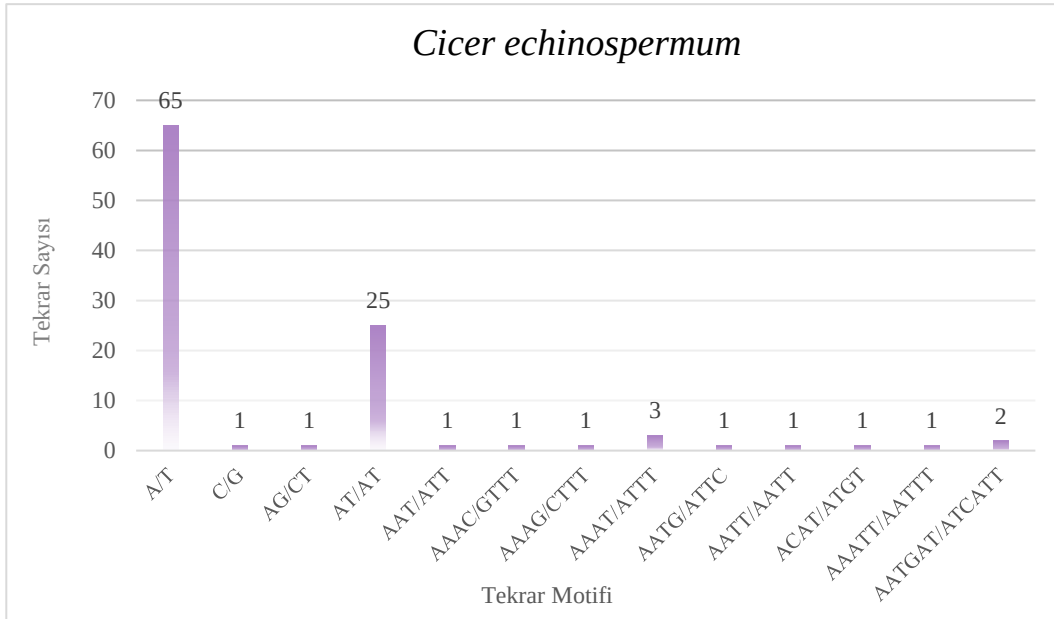
Şekil 4.10. MISA programı kullanılarak *Cicer reticulatum* türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.



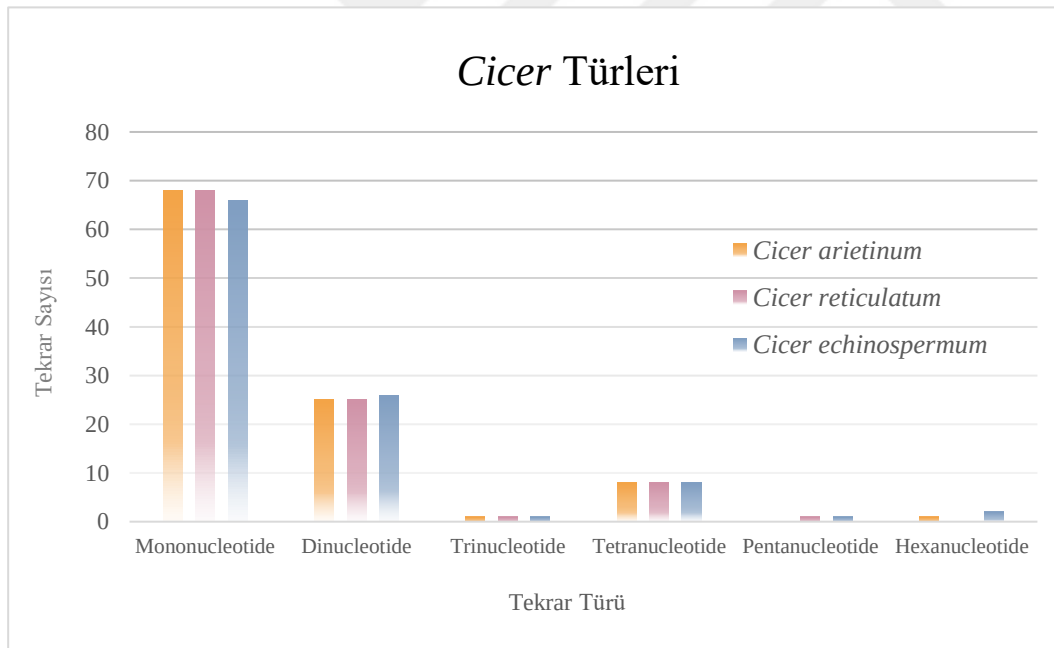
Şekil 4.11. MISA programı kullanılarak *Cicer reticulatum* türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.



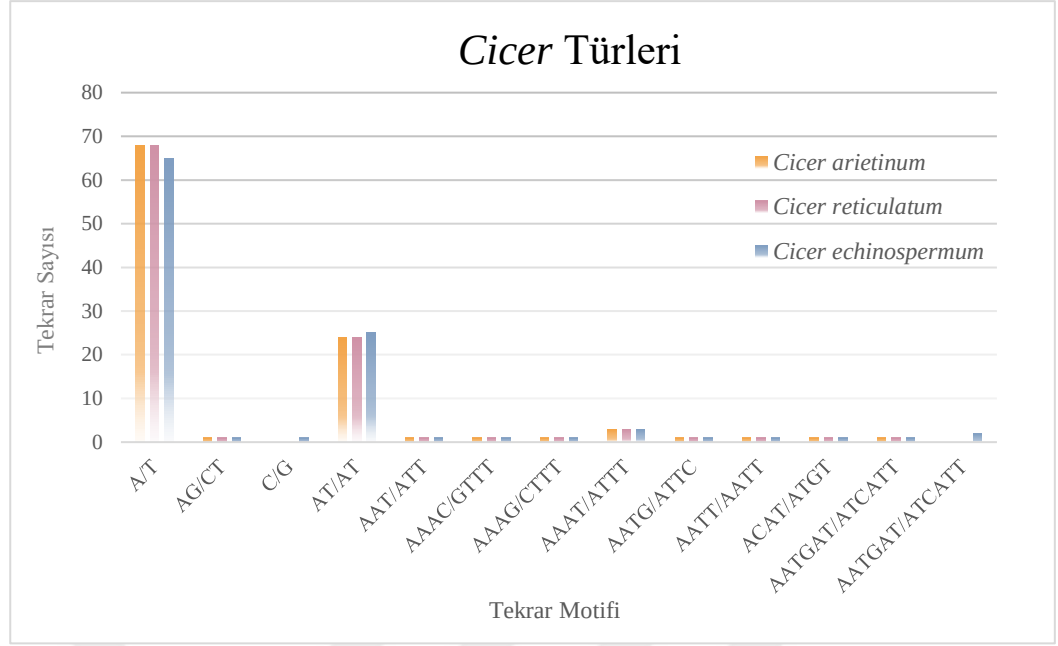
Şekil 4.12. MISA programı kullanılarak *Cicer echinospermum* türü için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.



Şekil 4.13. MISA programı kullanılarak *Cicer echinospermum* türü için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.



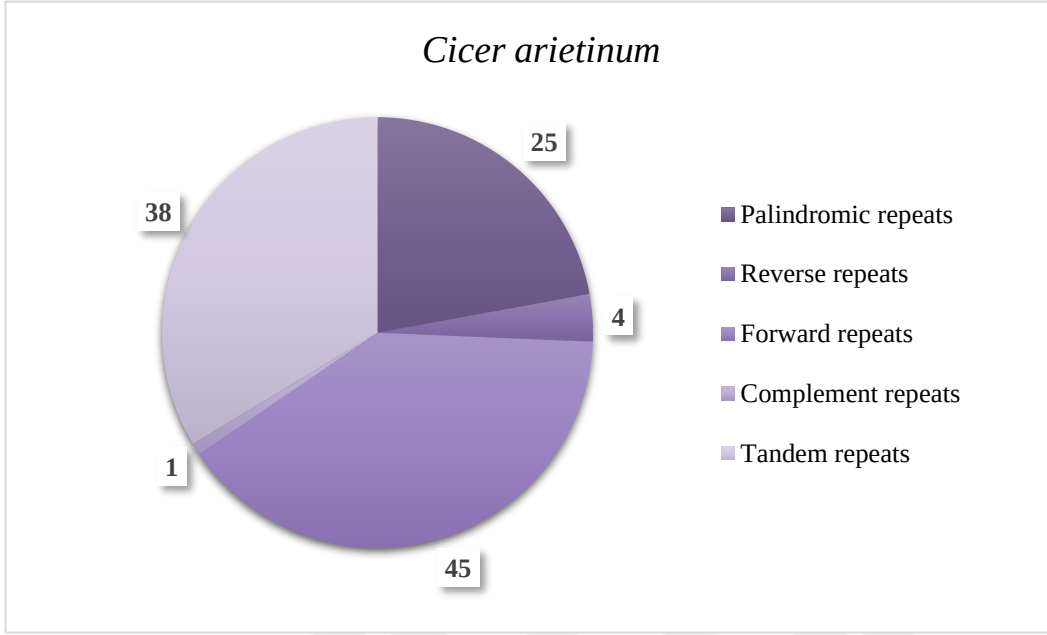
Şekil 4.14. MISA programı kullanılarak *Cicer* türleri için elde edilen SSR sayılarını gösteren sütun grafiği.



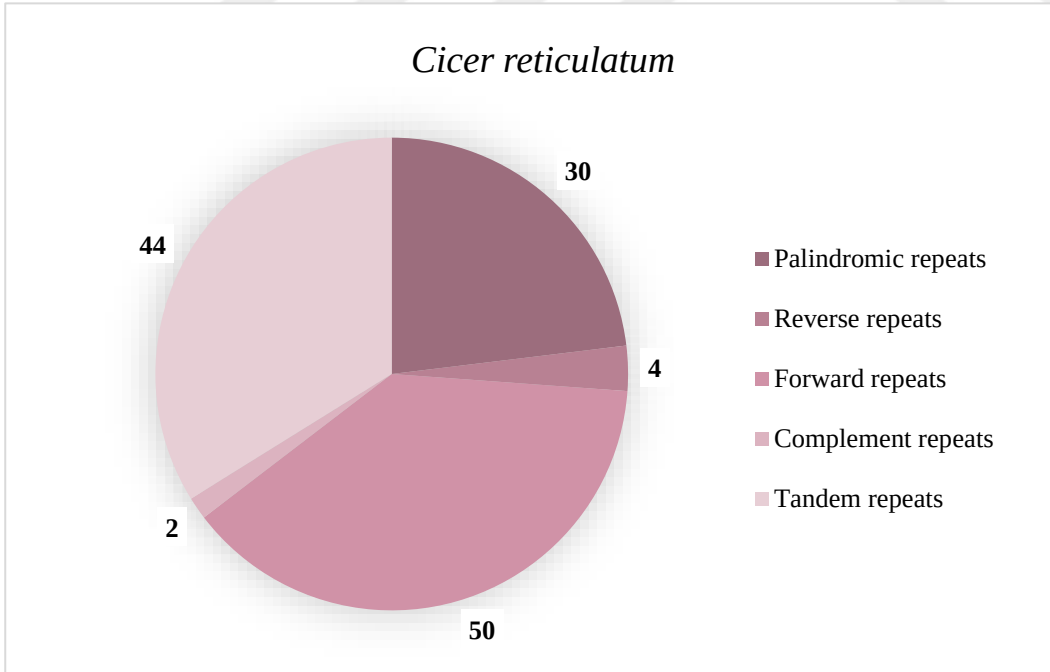
Şekil 4.15. MISA programı kullanılarak tüm *Cicer* türleri için elde edilen SSR motiflerini gösteren sütun grafiği.

Gerçekleştirilen analizde elde edilen sonuçlar incelendiğinde; *Cicer arietinum* türünde en çok gözlenen tekrar türü 68 adet tekrarlı mononükleotit olurken en çok gözlenen tekrar motifi A/T olarak saptanmıştır. *Cicer reticulatum* türünde de aynı şekilde 68 adet mononükleotit tekrarı gözlenmiş ve en fazla sayıda gözlenen tekrar motifi A/T olarak saptanmıştır. *Cicer echinospermum* türünde ise mononükleotit tekrarların sayısı 65 olarak bulunmuş olup, yine en fazla sayıda gözlenen tekrar motifi A/T olarak saptanmıştır. *Cicer arietinum*'da en fazla altı nükleotitli tekrarlara (hekzanükleotitlere) rastlanmış, fakat beş nükleotitli tekrarlara (pentanükleotitlere) rastlanmamıştır. *Cicer reticulatum*'da ise en fazla pentanükleotit tekrarlar görülürken *Cicer echinospermum*'da hem pentanükleotit hem de hekzanükleotit tekrarlar saptanmıştır. *Cicer* türlerinde gözlenen bu tekrar nükleotitlerinin sayısal dağılımı ve tekrar motiflerinin çeşitliliği birbirine benzer sonuçlar vermiştir. *Cicer arietinum* genomunda bu tekrarlar LSC bölgesinde %68.6, SSC bölgesinde %10.7 ve IR bölgesinde %20.5'inde oranında bulunduğu saptanmıştır. *Cicer reticulatum* genomunda, LSC bölgesinde %70.2, SSC bölgesinde %14.4 ve IR bölgesinde %15.3 bir dağılım olduğu saptanmıştır. *Cicer*

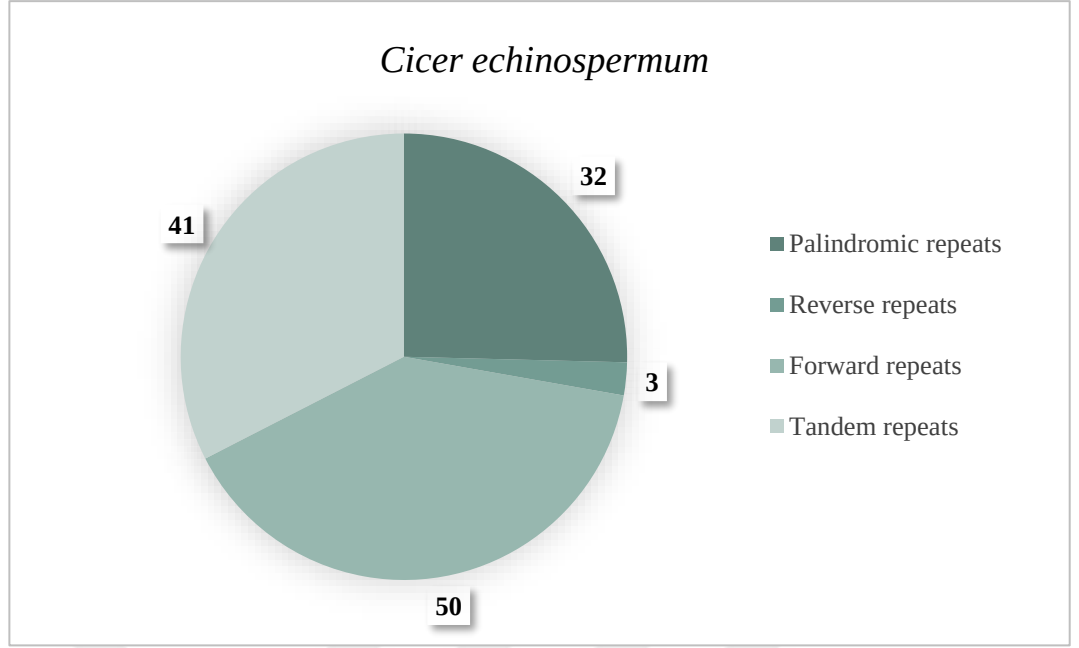
echinospermum genomunda ise bu tekrarların dağılımı, LSC bölgesinde %70.19, SSC bölgesinde %11.5 ve IR bölgesinde %18.2 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. REPuter ve Tandem Repats Finder programı kullanılarak *Cicer arietinum* türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.



Şekil 4.17. REPuter ve Tandem Repats Finder programı kullanılarak *Cicer reticulatum* türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.

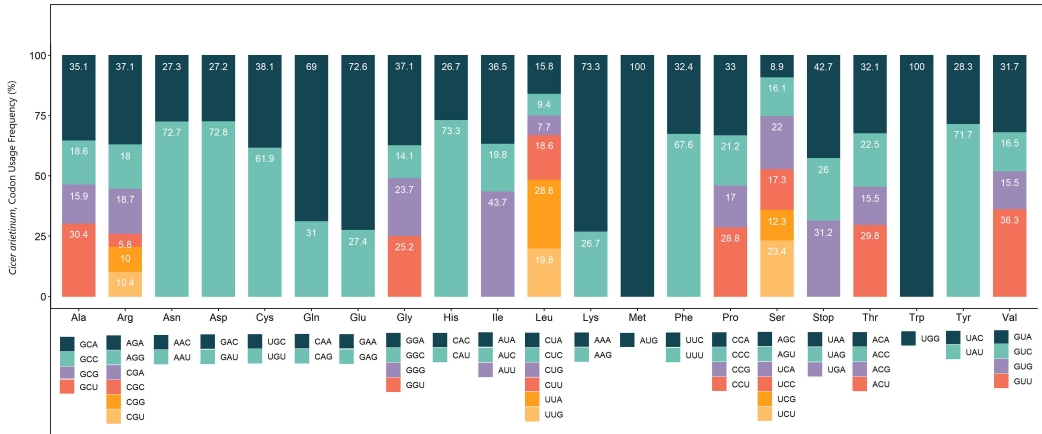


Şekil 4.18. REPuter ve Tandem Repeats Finder programı kullanılarak *Cicer echinospermum* türü için elde edilen tekrar dizileri bilgisi.

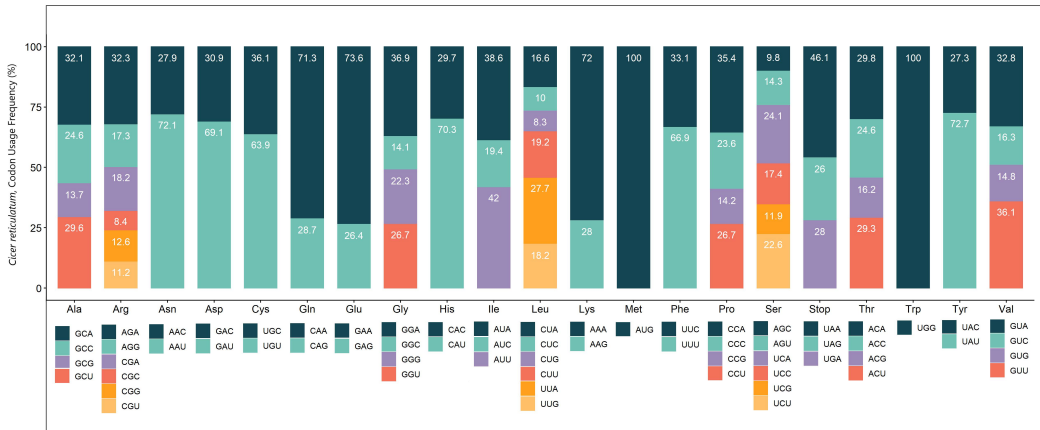
REPuter ve Tandem Repeats Finder analizi ile elde edilen analiz sonuçları incelendiğinde, üç türün genomunda, en çok sayıda tandem tekrarlarının ardından forward tekrarların bulunduğu saptanmıştır. *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* için kloroplast genomu içerisinde en az sayıda komplementer repeatlerin bulunduğu tespit edilmişken, *Cicer echinospermum*' un kloroplast genomunda komplementer repeat bulunmadığı tespit edilmiştir. *Cicer echinospermum*' un kloroplast genomunda en az sayıda olan tekrar tipi reverse repeat olarak belirlenmiştir.

4.6. Kodon Kullanma Eğilimi Analizi (Codon Usage Bias)

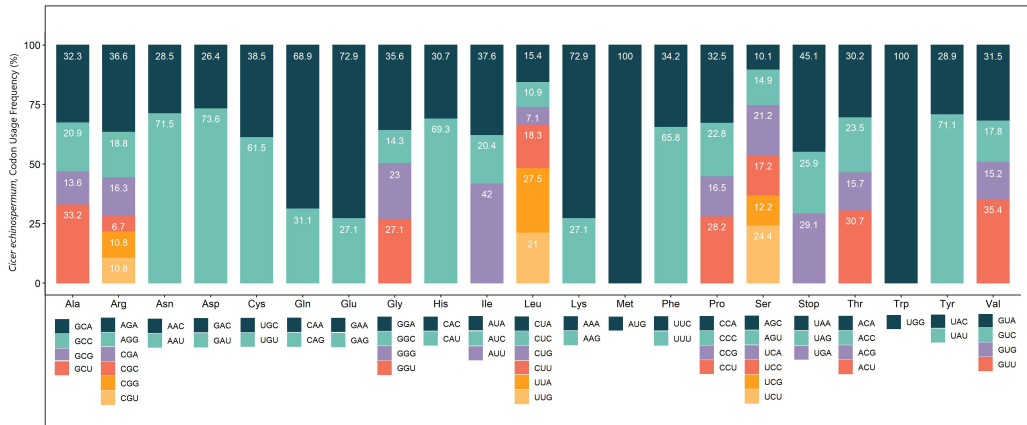
Her bir nohut türü için, kloroplast genomlarından sentezlenen proteinlerin kodon kullanma eğilimleri istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarda kodon kullanma oranları (Codon Frequency) yüzdesel olarak her bir proteine spesifik olacak şekilde verilmiştir. Her bir türe ait, kodon kullanım oranları “ggpubr” paketi ile görselleştirilmiş olup sırasıyla; *Cicer arietinum* için Şekil 4.19.’da *Cicer reticulatum* için Şekil 4.20.’de ve *Cicer echinospermum* için Şekil 4.21.’de verilmiştir. Her tür için, kendi genomlarında sentezlenen aminoasit miktarları Şekil 4.22.’de verilmektedir. Ek olarak her tür için Relative Synonymous Codon Usage (RSCU) değerleri Çizelge 4.6.’da verilmektedir.



Şekil 4.19. *Cicer arietinum* türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.



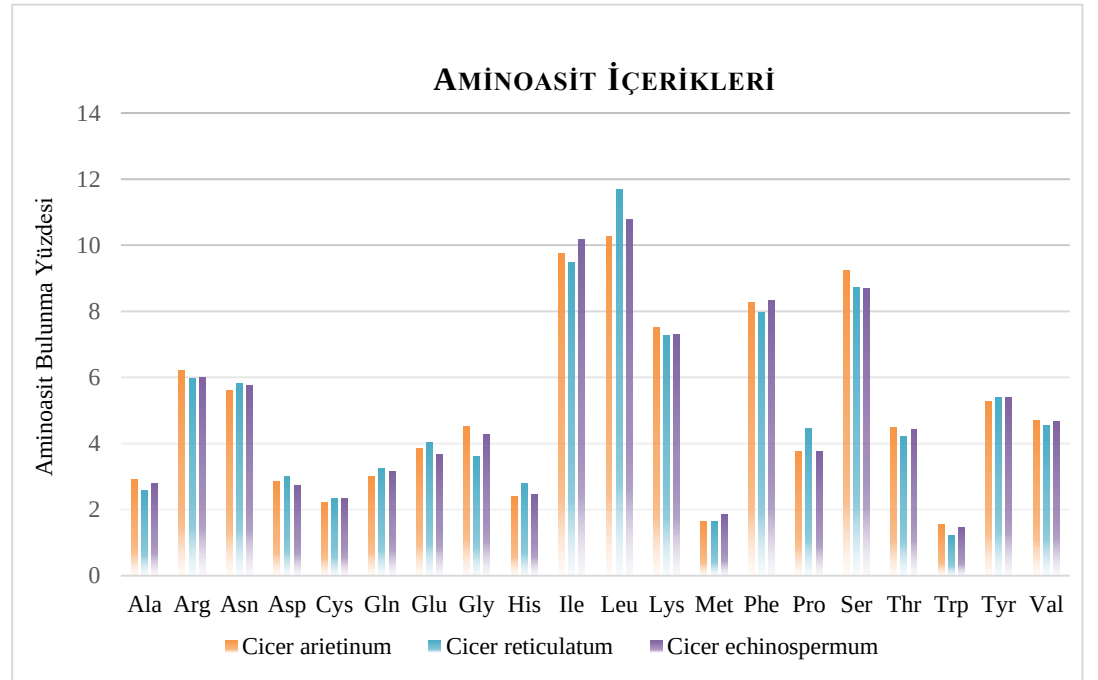
Şekil 4.20. *Cicer reticulatum* türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.



Şekil 4.21. *Cicer echinospermum* türü için elde edilen kodon kullanma eğilimi tablosu.

Üç tür için gerçekleştirilen kodon kullanma eğilimi analizlerinde her bir türün, spesifik bir aminoasidi sentezlerken tercih ettiği kodonların yüzdesel olarak kullanılma oranları tespit edilmiştir. *Cicer arietinum* kloroplast genomunda, en yüksek oranda tercih edilen kodon, fenilalenini kodlayan UUU (%5,2) kodonu olurken en az tercih edilen kodon ise arjinini kodlayan CGC (%0,33) kodonu olarak saptanmıştır. *Cicer reticulatum* genomunda ise en yüksek oranda tercih edilen kodon, fenilalenini kodlayan UUU (%4,9) kodonu olurken en az tercih edilen kodon ise alanini kodlayan GCG (%0,33) kodonu olarak saptanmıştır. *Cicer echinospermum* türünde de benzer şekilde en yüksek oranda tercih edilen kodon, fenilalenini kodlayan UUU (%5,15) kodonu olurken en az tercih edilen kodon ise alanini kodlayan GCG (%0,35) kodonu olarak saptanmıştır.

Üç nohut türünün sentezlediği aminoasit oranları incelendiğinde ise, *Cicer arietinum* için sırasıyla, en fazla lösin (%10.2), izolösin (%9.7) ve serin (%9.2) aminoasidi sentezlenmektedir. *Cicer reticulatum* için sırasıyla, en fazla lösin (%11.6), izolösin (%9.4) ve serin (%8.7) aminoasidi sentezlenmektedir. *Cicer echinospermum* için ise sırasıyla, en fazla lösin (%10.7), izolösin (%10.1) ve serin (%8.6) aminoasidi sentezlenmektedir. Her üç nohut türünde de en az triptofan aminoasidi sentezlenmektedir.



Şekil 4.22. Üç nohut türünün kloroplast genomlarının aminoasit içerikleri.

Çizelge 4.6. Üç nohut türünün Relative Synonymous Codon Usage (RSCU) değerleri.

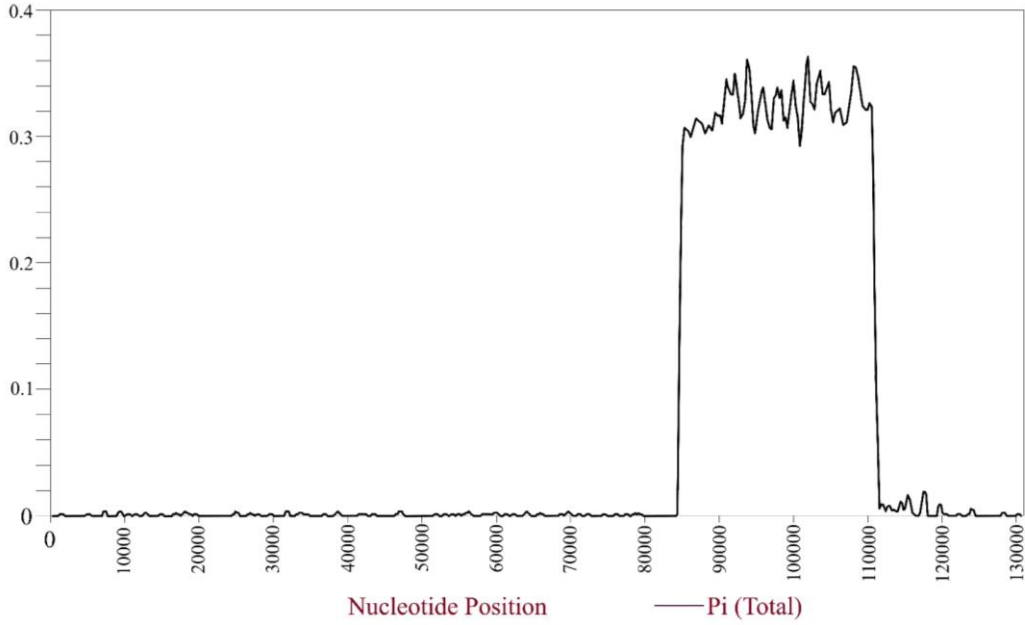
CODON	RSCU VALUES		
	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Cicer reticulatum</i>	<i>Cicer echinospermum</i>
GCU	1,21	1,18	1,33
GCC	0,74	0,98	0,84
GCA	1,41	1,29	1,29
GCG	0,64	0,55	0,54
CGU	0,62	0,67	0,65
CGC	0,35	0,5	0,4
CGA	1,12	1,09	0,98
CGG	0,6	0,76	0,65
AGA	2,23	1,94	2,2
AGG	1,08	1,04	1,13
AAU	1,45	1,44	1,43
AAC	0,55	0,56	0,57
GAU	1,46	1,38	1,47
GAC	0,54	0,62	0,53
UGU	1,24	1,28	1,23
UGC	0,76	0,72	0,77
CAA	1,38	1,43	1,38
CAG	0,62	0,57	0,62
GAA	1,45	1,47	1,46
GAG	0,55	0,53	0,54
GGU	1,01	1,07	1,09
GGC	0,56	0,57	0,57
GGA	1,48	1,48	1,42
GGG	0,95	0,89	0,92
CAU	1,47	1,41	1,39
CAC	0,53	0,59	0,61
AUU	1,31	1,26	1,26
AUC	0,59	0,58	0,61
AUA	1,1	1,16	1,13
UUA	1,73	1,66	1,65
UUG	1,19	1,09	1,26
CUU	1,12	1,15	1,1
CUC	0,56	0,6	0,65
CUA	0,95	1	0,92
CUG	0,46	0,5	0,43
AAA	1,47	1,44	1,46
AAG	0,53	0,56	0,54
AUG	1	1	1
UUU	1,35	1,34	1,32
UUC	0,65	0,66	0,68
CCU	1,15	1,07	1,13
CCC	0,85	0,94	0,91
CCA	1,32	1,42	1,3

CCG	0,68	0,57	0,66
UCU	1,41	1,35	1,46
UCC	1,04	1,04	1,03
UCA	1,32	1,45	1,27
UCG	0,74	0,72	0,73
AGU	0,97	0,86	0,89
AGC	0,54	0,59	0,61
UAA	1,28	1,38	1,35
UAG	0,78	0,78	0,78
UGA	0,94	0,84	0,87
ACU	1,19	1,17	1,23
ACC	0,9	0,98	0,94
ACA	1,29	1,19	1,21
ACG	0,62	0,65	0,63
UGG	1	1	1
UAU	1,43	1,45	1,42
UAC	0,57	0,55	0,58
GUU	1,45	1,44	1,42
GUC	0,66	0,65	0,71
GUA	1,27	1,31	1,26
GUG	0,62	0,59	0,61

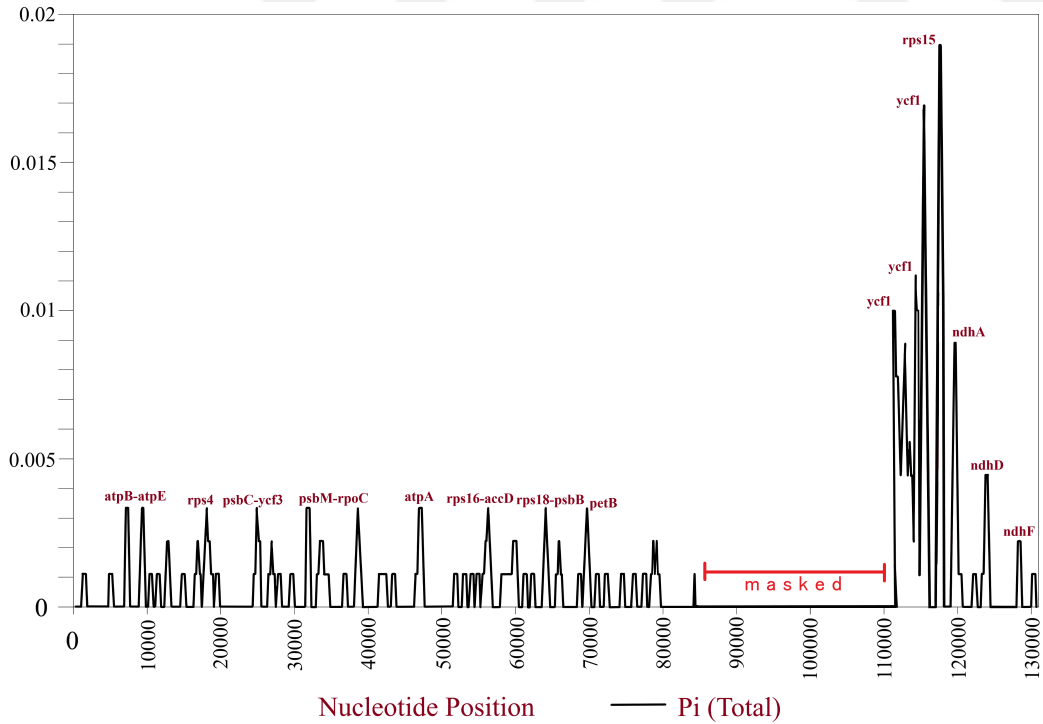
4.7. Nükleotit Farklılaşma Analizi (Divergent Hot Spot Analysis)

Genom içerisinde farklılaşan nükleotitlerin tespitini gerçekleştirmek için “Divergent Hot Spot” analizi yapılmıştır. DnaSP v6.0 programı kullanılarak nükleotit farklılaşması hesaplanmış ve bunun görselleştirilmesi aynı programın “Sliding Windows” opsiyonu tarafından sağlanmıştır. Nükleotit farklılaşmasının hesaplanması için ilk olarak üç türün birbirine çoklu hizalaması gerçekleştirilmiştir. *Cicer echinospermum* türünde meydana gelen inversiyon, bu analizin çıktısını anlamlandırmayı engellemiştir. İlk elde edilen Sliding Window görseli Şekil 4.23.’de yer almaktadır. Ardından bu sorunun üstesinden gelmek için inversiyonun gerçekleştiği bölge “Masked” edilmiş olup, Sliding Windows opsiyonu tekrar çalıştırılmıştır. Bu maskeleyme işlemi Bioedit programında inversiyonun gözlendiği bölgelere gap eklenmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Maskeleyme işlemi ardından elde edilen nükleotit farklılaşmasını gösteren Sliding Window görseli Şekil 4.24.’de yer almaktadır. Ek olarak üç genom için, nükleotit pi farklılığı oranı 0,00222 ve üzerinde olan divergent bölgeler tablo halinde Çizelge 4.6.’da verilmektedir. Nükleotit farklılaşma bölgelerinin gerçekleştiği lokasyonda hangi genlerin bulunduğunu tespit etmek amacıyla, Çizelge 4.6’da verilen ve en yüksek pi değerini

gösteren bölgeler alignment dosyasında bulunarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanında BLASTx yapılması sonucunda saptanmıştır.



Şekil 4.23. Nükleotit farklılaşmasını incelemek için elde edilen Sliding window görseli.



Şekil 4.24. Nükleotit farklılaşmasını incelemek için ~30 kb'lik bölgenin maskelendikten sonra elde edilen Sliding window görseli.

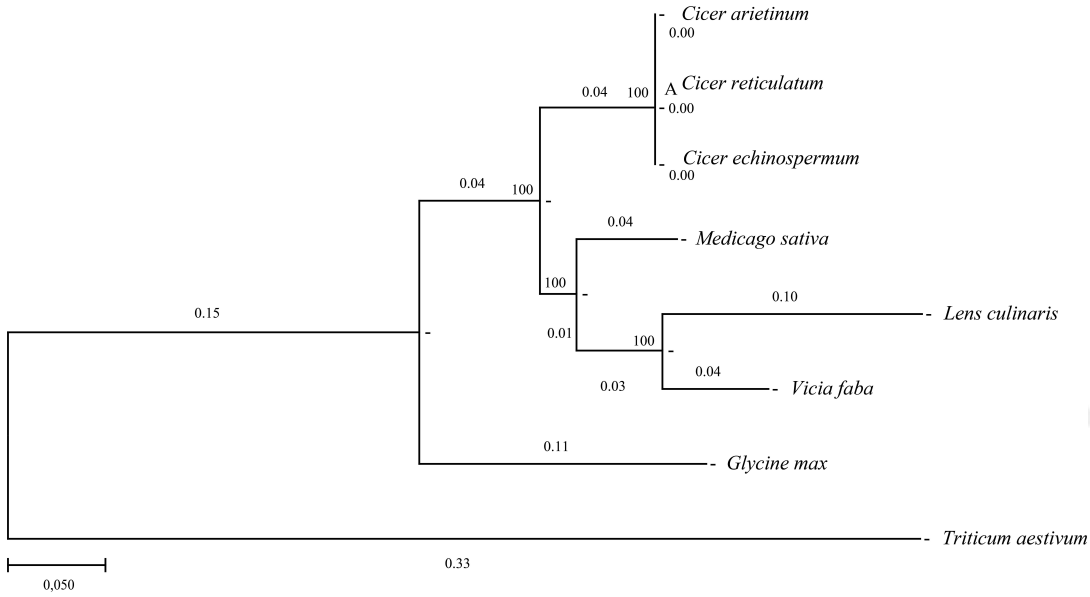
Çizelge 4.7. Genomlar arasında gözlenen nükleotit farklılaşmasının pi cinsinden değerleri.

Window	Midpoint	Pi (Total)	Window	Midpoint	Pi (Total)
6804-7407	7103	0,00333	112780-113379	113079	0,00556
7004-7607	7307	0,00333	112980-113579	113279	0,00444
7204-7807	7507	0,00333	113380-113979	113679	0,00444
8808-9410	9107	0,00222	113980-114579	114279	0,01111
9008-9610	9309	0,00333	114180-114779	114479	0,01000
9210-9810	9510	0,00333	114780-115379	115079	0,00889
17818-18417	18117	0,00333	114980-115579	115279	0,01444
24622-25221	24921	0,00333	115180-115803	115479	0,01667
31374-31973	31673	0,00333	115380-116003	115679	0,01111
31774-32374	32074	0,00333	116804-117624	117324	0,00444
38379-38979	38679	0,00333	117425-118024	117724	0,01889
46589-47188	46888	0,00333	117625-118224	117924	0,01444
46789-47388	47088	0,00333	119025-119624	119324	0,00333
56002-56601	56301	0,00333	119225-119824	119524	0,00889
63820-64420	64120	0,00333	119425-120024	119724	0,00889
69424-70025	69725	0,00333	119625-120224	119924	0,00556
111380-111979	111679	0,00778	123427-124027	123727	0,00444
112380-112979	112679	0,00667	123828-124427	124127	0,00444
112580-113179	112879	0,00889	127832-128452	128131	0,00222

Gerçekleştirilen nükleotit farklılaşma analizinde, üç genom içerisinde farklılaşmanın en çok gözlemlendiği bölgeler elde edilmiştir. “Nükleotide variability” yani Pi değeri 0-0.1889 arasında değerler almıştır. Buna göre Pi değeri 0.02’den büyük ($Pi > 0.02$) olan bölgeler potansiyel mutasyon geçirmiş sıcak bölgeler olarak belirlenmiştir. Bu bölgelerde yer alan genler üç *Cicer* türü için; rps15, ycf1, ndhA, ndhD, ndhF, atpB-atpE, rps4, psbC-ycf3, psbM-rpoC, atpA, rps16-accD, rps18-psbB ve petB olarak saptanmıştır.

4.8. Kloroplast Genom Bilgisi ile Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Üç farklı nohut türünün, aynı familyaya ait türler arasında evrimsel süreçte nerede yer aldığını anlamak ve nohut türlerinin evrimsel filogenisini tüm kloroplast genomuna bakarak değerlendirebilmek amacıyla bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. MEGA-X programı kullanılarak elde edilen bu filogenetik ağaç Şekil. 4.25.'de gösterilmektedir. Gerçekleştirilen bu analize göre, üç nohut türü birbirlerine en yakın olacak şekilde ağaçta dallanmaları gerçekleştirmiştir. *Cicer* türlerinin, diğer baklagiller arasındaki pozisyonu korunarak doğru bir taksonomik profil gözlenmiştir.



Şekil 4.25. Üç nohut türü ve diğer baklagil familyasına ait türlerin kloroplast genomları baz alınarak elde edilen filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA

Kloroplast organeli bitki hücrelerinde bulunan, kendine ait genetik materyale sahip ve fotosentez, biyosentez ve karbon fiksasyonu gibi, bitkilerde hayati öneme sahip mekanizmalarda görev alan önemli bir organeldir (Sugiura, 1992). Nükleer genomdan bağımsız, kendi kendine replike olabilen ve evrimsel süreç içerisinde yüksek oranda korunmuş olan, halkasal yapıda bir genoma (cpDNA) sahiptir (Green, 2011). Son zamanlarda yeni nesil sekanslama teknolojileri (NGS) sayesinde gelişen dizilime teknikleri, tüm kloroplast sekanslama işlemlerinin daha ucuz, hızlı ve basit bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlamıştır (Fajardo et al., 2013; Asaf et al., 2017). Kloroplast genomunun temel yapısının stabil ve korunmuş olması, bitki türlerine özgü genom yapısı, gen içeriği ve gen sırası hakkında detaylı bilgi edinmeyi sağlamaktadır. Kloroplast genom yapısı ve sekansı üzerine gerçekleştirilen çalışmalar, türlerin korunması, türler arası filogeninin yüksek doğrulukta oluşturulması, evrimsel sürecin genomik düzeyde incelenebilmesi ve karışık taksonomik seviyelere sahip türler arası ilişkileri daha doğru ve net biçimde anlamlandırılması amacıyla kullanılmakta ve önemli bilgiler sunmaktadır (Kaila et al., 2017). Günümüze kadar, ekonomik öneme sahip, soya fasüyesi (*Glycine max*) (Saski et al., 2005), patates (*Solanum tuberosum*) (Chung et al., 2006), fasülye (*Phaseolus vulgaris*) (Guo et al., 2007), nohut (*Cicer arietinum*) (Jansen et al., 2008b), maş fasüyesi (*Vigna radiata*) (Tangphatsornruang et al., 2010), buğday (*Triticum aestivum*) (Middleton et al., 2014), bakla (*Vicia faba*) (Sabir et al., 2014), mercimek (*Lens culinaris*) (Sveinsson & Cronk, 2016), patlıcan (*Solanum melongena*) (Ding et al., 2016) ve yonca (*Medicago sativa*) (Choi et al., 2019) gibi türlerde kloroplast genom çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kültür nohut türünün kloroplast genomu hakkında çalışma yapılmış olmasına rağmen, herhangi bir yabani nohut türü ile ilgili kloroplast genom çalışması literatürde yer almamaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada ekonomik ve tarımsal açıdan büyük bir öneme sahip olan nohut bitkisinin, yabani türleri olan *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* türlerinin kloroplast genomları, HMW (High molecular weight) cpDNA izolasyonu yapıldıktan sonra “100X coverage” (Genom kapsama) ile yeni nesil sekanslama platformunda sekanslanarak, yüksek çözünürlükte ve doğrulukta elde edilmiştir. Bu kloroplast genomları ile karşılaştırmalı genomik analizler

gerçekleştirilerek, kloroplast genom bilgisi detaylı olarak araştırılmıştır. Tüm kloroplast genom sekansı (WGS, Whole Genome Sequencing) elde edilen bu çalışmada, kullanılan iki yabancı türün kloroplast genom boyutları ise *Cicer reticulatum* için 125,794 bp ve *Cicer echinospermum* türü için 126,713 bp olarak bulunmuştur. Kültür nohut türü olarak bilinen *Cicer arietinum*'un kloroplast genom boyutu 125,319 bp olarak verilmiştir (Jansen et al., 2008). Bu çalışmada kullanılan türler, *Cicer arietinum*'un yakın akraba türleri olduğundan genom boyutları Jansen ve ark. (2008)'in nohut kloroplast genom büyüklüğü ile benzerlik göstermektedir.

5.1. Kloroplast Gen İçeriği Karşılaştırılması

Çoğu karasal bitki genomları LSC, SSC ve duplike olmuş iki adet IR bölgesinin yer aldığı dörtlü bir kloroplast genom organizasyonuna sahiptir (Daniell et al., 2016). Yapılan bu çalışmada, karasal genomların sahip olduğu dörtlü genom yapısının aksine, *Cicer* türlerinde bir LSC bölgesi, bir SSC bölgesi ve yalnızca bir IR bölgesi bulunduğu saptanmıştır. Üç farklı tür nohut kloroplast genomunda bulunan LSC, IR ve SSC bölgelerinin bp uzunlukları Çizelge 4.5.'te verilmiştir. Bu kloroplast genomlarında, uzun tekli kopya bölgesi (LSC) trnH-GUG ve rpl22 genleri dahil olmak üzere arada kalan genleri içermekte, kısa tekli kopya bölgesi (SSC) ndhF ve rps15 genleri dahil olmak üzere arada kalan genleri ve tekrar bölgesi olarak adlandırılan tekli kopya bölgesi (IR) rps19 ve ycf1 genleri dahil olmak üzere arada kalan genleri içermektedir. Gen içerikleri kıyaslandığında (Çizelge 4.5), kültürden yabaniye doğru gidildiğinde genom boyutunda (bp) bir artış gözlenmektedir. Bu üç türün kloroplast genom boyutu, günümüze kadar kloroplast genomu rapor edilmiş legume familyasına ait *Pisum sativum* (Magee et al., 2010), *Trifolium repens* (Sabir et al., 2014), *Lens culinaris* (Sveinsson & Cronk, 2016), ve *Medicago radiata* (Choi et al., 2019) gibi türlerin kloroplast genom boyutuyla benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde üç tür için elde edilen GC oranları (Çizelge 4.5) sırasıyla; *Cicer arietinum* için 33,9%, *Cicer reticulatum* için 33,9% ve *Cicer echinospermum* için 33,8% olarak gösterilmiş olup, diğer rapor edilmiş legume türlerinin GC oranları ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Asaf et al., 2017). *Cicer* türlerinin dahil olduğu *Papilionoideae* sınıfının kloroplast genom yapısında meydana gelen yeniden düzenlemeler ve gen/intron kayıpları gibi değişikliklerden dolayı, bu aileye ait türler IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) olarak

adlandırılan bir klade içerisinde yer almaktadır (Wojciechowski et al., 2004; Magee et al., 2010; Lee et al., 2021).

Cicer arietinum'un kloroplast genomunda 112 adet gen kodlanmakta olup (Çizelge 4.5.) bunların 29 tanesi tRNA, 4 tanesi ise rRNA genleri olarak tespit edilmiştir. Jansen ve ark. (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada sekans bilgisinin gen anotasyonunu DOGMA adı verilen bir anotasyon programı ile gerçekleştirmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada ise NCBI'dan NC_011163.1 aksesyon kodu ile elde edilen veriseti GeSeq olarak adlandırılan yeni bir anotasyon aracında gerçekleştirilmiştir. Bu anotasyon yazılımı güncel ve daha geniş kapsamlı olduğundan, genom bilgisi içerisinde önceki anotasyonda elde edilemeyen genlerin varlığının saptanmasını sağlamıştır. Jansen ve ark. (2008) yılında 108 adet genin kodlandığını bildirdikleri çalışmada, aynı veriseti seti ile analizler tekrar gerçekleştirildiğinde 112 adet genin kodlandığı tespit edilmiştir ve bir önceki çalışmada genom içerisinde tespit edilemeyen rpl22, rps16, ycf4 ve infA genleri bu çalışmada yapılan detaylı analizler doğrultusunda saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Jansen ve ark.'nın sonuçları ile farklılık göstermektedir (Jansen et al., 2008). *Cicer reticulatum* türünün kloroplast genomunda ise 117 gen kodlanmakta olup bunların 34 tanesi tRNA, 4 tanesi ise rRNA genleridir. *Cicer echinospermum* türünde de benzer bir dağılım görülmekte ve kloroplast genomunda 116 gen kodlanmaktadır. Bu genlerin 33 tanesi tRNA, 4 tanesi ise rRNA genleri olarak saptanmıştır. *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* türünde kodlanan genler büyük ölçüde birbirinin aynısı olmakla beraber, yalnızca *Cicer reticulatum* türünde bu genlere ilave olarak trnI-AAU geninin kodlandığı saptanmıştır. *Cicer arietinum* ve bu iki yabani nohut türünün gen içerikleri karşılaştırıldığında ise *Cicer arietinum*'un genomunda farklılıklar gözlenmektedir. Yabani türlerin genomunda trnT-CGU, trnG-UCC, trnC-ACA, trnR-UCG adlı tRNA genleri kodlanırken *Cicer arietinum*'un genomunda bu türler bulunmamaktadır. Bu tRNA genlerinin yabani türlerde farklılık göstermesinin sebebi, türlerin aminoasitleri sentezlerken kendilerine spesifik kodon kullanma eğilimi göstermeleriyle ilişkilendirilebilir (Guisinger et al., 2011).

Jansen ve ark. (2008), *Cicer arietinum* 'un cp genomunu elde ederek genom içerisinde evrimsel süreçte bir IR-Loss durumu ve 50 kb'lik bir inversiyon bulunduğunu tespit etmiştir (Jansen et al., 2008b). Bu çalışmada kullanılan iki

yabani nohut türünün, kloroplast genom yapısı ve içeriğinin, *Cicer arietinum*'un kloroplast genomu ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve aynı IR-loss durumunun bu türlerde de bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışmada yer alan tüm türlerin, kloroplast genom organizasyonunda gözlenen bu durum, baklagil familyasına ait diğer türlerin kloroplast genom datalarıyla uyum içerisindedir (Cronk et al., 2006). IR-loss durumu diğer IRLC ailesi üyelerinin kloroplast genomlarında da gözleendiğinden, bu çalışmada elde edilen veriler literatürü destekler bir sonuç vermektedir (Magee et al., 2014; Sabir et al., 2014; Sveinsson & Cronk, 2016).

5.2. Kloroplast Genomlarının Karşılaştırmalı Genomik Analizleri

Karşılaştırmalı genomik çalışmaları, gen düzeyinde meydana gelen mutasyon, insersiyon/delesyon ya da yeniden düzenlemeleri tespit edebilmek için detaylı bilgiler sunmaktadır (Chi et al., 2020). Bu bilgilere ulaşmak için mVISTA programı ile üç farklı nohut türünün kloroplast genom karşılaştırılması yapılmış ve Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Elde edilen analiz çıktısında, iki yabani tür nohut genomunun referans nohut türü olarak belirlenen *Cicer arietinum* ile yapılan kıyaslamasında, yüksek oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu türlerin kloroplast genom sekanslarının birbiriyle benzerliğini yüzdesel olarak hesaplamak amacıyla megaBLAST yapılmış olup, türlerin birbirine olan genom benzerliği sırasıyla; *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* için %99,93 olarak, *Cicer arietinum* ve *Cicer echinospermum* için %99,79 ve *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinospermum* için %99,80 olarak saptanmıştır. mVISTA görselinde (Şekil 4.5.) bazı bölgelerde piklerle ifade edilen farklılaşmalar gösterilmektedir. Diğer kara bitkilerinde de olduğu gibi bu genomlar arasında da, kodlanmayan bölgelerde meydana gelen farklılaşmalar, kodlanan bölgelerde meydana gelen farklılaşmalara göre daha fazladır (Kaila et al., 2017). Şekil 4.5.'te eksonlarda meydana gelen farklılaşmalar incelendiğinde rps15, ycf1, ndhA, ndhH, ndhF, atpB, atpE, rpoC ve accD gen lokasyonlarında nükleotit varyasyonları görülmektedir. Bu bölgeler içerisinde, yüksek varyasyonların gözleendiği bölgeler potansiyel markörler olarak değerlendirilebilir. Bu benzer durum, nükleotit çeşitliliğinin tespit edildiği DHS analizinde de gözlenmiştir ve bu iki ayrı analiz birbirini destekler nitelikte veriler sunmuştur. Bütün bir genom sekansına bakıldığında her iki yabani genomun da evrimsel süreç boyunca, birbirlerinin genomlarına göre yüksek oranda korunduğu

görülmekte ve her iki genom için en konservatif bölgelerin, gen sentezlenen bölgeler olan ekzon kısımlarının olduğu görülmektedir (Lin et al., 2018; Munyao et al., 2020).

Gerçekleştirilen bir diğer karşılaştırmalı genom analizinde, genomlar arası gen organizasyonu ve homolojilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu analiz MAUVE yazılımında, referans genom olarak *Cicer arietinum*'un kloroplast genomu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuca göre, bu üç nohut türü kendi arasında 4 farklı LCB bölgesi (Locally Colinear Blocks) oluşturmaktadır. Bu bölgelerin kendi içlerinde yüksek bir homolojiye sahip olduğu ve genom düzenlemelerinden minimum düzeyde etkilendiği saptanmıştır (Cronk et al., 2006; Munyao et al., 2020). Şekil 4.6.'da gösterilen MAUVE alignment çıktısında her bir homoloji gösteren bölge farklı bir renkle temsil edilmektedir. Bu bölgelerin içerisindeki her bir histogram, ikili nükleotit benzerliğini (Pairwise nucleotide sequence identity) göstermektedir. En büyük LCB bölgesi kırmızı renkle gösterilen yaklaşık 104 kb'lik bölge olurken (LCB1), en küçük LCB bölgesi yaklaşık 560bp'lik sarı bölgedir (LCB4). Ek olarak, *Cicer echinospermum* türünün gen oryantasyonunun mavi renkle gösterilen LCB bölgesinde değiştiği görülmektedir. Bu inversiyon bölgesinin evrimsel süreç içerisinde doğal bir şekilde gerçekleştiği, ek olarak gerçekleştirilen in silico alignment analizleriyle de desteklenmektedir. Yaklaşık olarak 28 kb boyutunda olan ve yalnızca *Cicer echinospermum* kloroplast genomunda gözlenen bu inversiyon, bu çalışmada kullanılan diğer yabancı nohut türünde ve referans genomunda gözlenmemiştir. Bu inversiyon bölgesinde gen oryantasyonu açısından farklılık olmasına rağmen, kodlanan gen içeriği açısından farklılık gözlenmemektedir. Lee ve ark. (2021) yılında yaptıkları çalışmada beş farklı baklagil türünün (*Indigofera miniata*, *Sesbania drummondii*, *Sesbania cannabina*, *Sesbania grandiflora* ve *Lotus japonicus*) tüm kloroplast genom sekanslarını kullanarak MAUVE alignment yapmış ve genomlar arasında inversiyon olup olmadığını gözlemişlerdir. Bu analizde referans genoma göre, üç *Sesbania* türünde 50 kb'lik bir inversiyon olduğu, MAUVE analizinde gözlenen bir LCB bloğunun düzlemde dönmesi (flip etmesi) sonucu saptanmıştır (Lee et al., 2021). Schwarz ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Fabaceae* familyasına ait iki farklı türün, kloroplast genomlarında ortak bir inversiyonun yer aldığını saptamışlardır. Yalnızca LSC bölgesinin kullanıldığı ve referans genom olarak

Arachis hypogaea bitkisinin yer aldığı MAUVE analizinde, *Lupinus albus* ve *Robinia pseudoacacia* bitkisinin yaklaşık 36 kb'lık benzer bir inversiyonu içerdiğini tespit etmişlerdir (Schwarz et al., 2015). Yapılan ek literatür araştırmalarında *Cicer* türleri arasında, buna benzer inversiyonları gösterebilen çalışmalar yer almamaktadır. Kaila ve ark. 2017'de legume familyasına ait farklı türlerin gen sırası ve homoloji analizini gerçekleştirmiştir ancak *Cicer* türlerinden yalnızca *Cicer arietinum* datasını kullanmıştır (Kaila et al., 2017). Bu çalışmada farklı *Cicer* türleri yer aldığından ve kloroplast genom sekansı yüksek genom kapsama (coverage) ile sekanslandığından elde edilen verilerde, genomun yanlış oryantasyona (missorientation) sahip olma ihtimali ortadan kaldırılmıştır. Genellikle kloroplast genom çalışmalarında sekanslama stratejisi, primer tasarımı ve PCR tabanlı analizlere dayanmakta ve bu yüzden sekanslama işlemlerinden sonra genom organizasyonunun yüksek doğrulukta saptanmasında eksiklikler veya hatalar ortaya çıkmaktadır (Bausher et al., 2006; Jansen et al., 2008). Bu çalışmada ise *Cicer* türleri için, kloroplast genom karşılaştırması ve genom organizasyonu yüksek doğrulukta ortaya konulmuştur.

5.3. Kloroplast Genomlarının Tekrar Dizilerinin Karşılaştırması

Kloroplast genomları içerisinde mikrosatellitler ya da basit dizi tekrarları (cpSSR) olarak adlandırılan ardışık 1-6 nükleotitik tekrar üniteleri bulunmaktadır (X. Li et al., 2019; Moghaddam, 2021). Bu tekrar dizileri genom içerisine dağılmış olarak bulunmakta ve kloroplast genomunun rekombinasyonu ve yeniden düzenlenmesinde (rearrengment) önemli bir rol oynamaktadır (Powell et al., 1995). Genom içerisindeki nükleotit tekrarları yüksek derecede polimorfizm gösterdiğinden, iyi birer markör olma potansiyeline sahiptirler. Bu sayede popülasyon genetiği ve filogenetik çalışmalarında, türlerin ayrılmasında ve tanımlanmasında kullanılmaktadırlar (Munyao et al., 2020). Gerçekleştirilen bu çalışmada, üç nohut türünün kloroplast genomunda yer alan mikrosatellitler, birden fazla biyoinformatik araç kullanarak saptanmıştır. Bu verilere göre, üç *Cicer* genomunda cpSSR'lar saptanmış olup, mononükleotit ve dinükleotit dizi tekrarları çoğunluktadır. Sırasıyla; *Cicer arietinum* (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.), *Cicer reticulatum arietinum* (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.), ve *Cicer echinospermum arietinum* (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.), türleri için mononükleotit tekrar sayıları 68, 68 ve 65 olarak saptanmış ve en çok gözlenen mononükleotit motifi A/T olarak

tespit edilmiştir. Dinükleotit sayıları ise sırasıyla; 25, 25 ve 26 olarak saptanmış olup en çok gözlenen dinükleotit motifi AT/AT olarak bulunmuştur. Üç tür kloroplast genomunun mikrosatellit sayıları ve motifleri birbirlerine çok benzemektedir. Mikrosatellitlerde A/T bazlarının çoğunlukta olması durumu önceki çalışmalarda sıklıkla rapor edilmiş ve kloroplast genomunun genellikle politemin (T) ve poliadenin (A) tekrarlarından oluştuğu bildirilmiştir. (Kaila et al., 2017; Tan et al., 2020). Moghaddam ve ark. (2021) yayınladıkları makalede IRLC ailesine üye legume türleri için gerçekleştirdiği tekrar dizi analizlerinde, mononükleotit tekrarlarının çok sayıda ve genellikle dizi tekrarlarında A/T bazlarının sıklığının G/C bazlarına oranla çok daha fazla olduğunu bildirmiştir (Moghaddam, 2021). Genel olarak kloroplast genomu içerisinde yer alan cpSSR'lar çok çeşitlilik göstermekte ve popülasyon düzeyinde, tür içi ve türler arası polimorfizmleri tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır (Zong et al., 2019). Bu çalışmada her tür için spesifik cpSSR sayısı ve türü saptanmış ve üç nohut türünde de farklı genom bölgelerinde cpSSR bulunma oranlarının LSC>IR>SSC şeklinde olduğu tespit edilmiştir. LSC bölgesinde bu tekrarların fazla olması durumu diğer angiospermiler ile çalışılan yayınlarda da bildirilmiştir (Q. Li et al., 2014; Xu et al., 2017; Bi et al., 2018). Bu çalışmada üç nohut türü için yapılan cpSSR analizleri için elde edilen sonuçlar literatür ile çok büyük oranda uyum göstermektedir.

REPuter programı ile kloroplast genomları içerisinde bulunan forward, reverse, komplementer ve palindromik tekrarların tespiti gerçekleştirilmiştir. Komplementer ve uzun tekrarların kloroplast genomu içerisindeki varlığının genom farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (T. Cavalier-Smith, 2002). *Cicer arietinum* için Şekil 4.16.'da, *Cicer reticulatum* için Şekil 4.17.'de ve *Cicer echinospermum* için Şekil 4.18.'de tüm tekrarların sayısı grafik halinde verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, *Cicer arietinum*'un kloroplast genomunda yer alan forward tekrarların 30-116 bp, reverse tekrarların 31-34 bp aralığında, palindromik tekrarların 30-133 bp aralığında ve tek bir komplementer tekrarın 30 bp olduğu saptanmıştır. *Cicer reticulatum*'un kloroplast genomunda da çok benzer bir dağılım gözlenmiştir. *Cicer echinospermum*'un kloroplast genomunda ise yer alan forward tekrarların 43-335 bp, reverse tekrarların 30-34 bp aralığında, palindromik tekrarların 30-353 bp aralığında olduğu ve genomda diğer iki türün aksine komplementer tekrar bulundurmadığı saptanmıştır. Şimdiye kadar çalışılmış olan

IRLC türlerinin kloroplast genomlarında en sık rastlanan tekrar türü forward ve en az rastlanan tekrar türü reverse olarak bildirilmiştir (X. Li et al., 2019). Bu çalışmada *Cicer* türleri için saptanan veriler literatür ile uyum içerisindedir.

5.4. Kloroplast Genomlarının Kodon Kullanma Eğilimi Analizleri

Kodon kullanım eğilimi, kloroplast organelinin evrimsel sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (Yang et al., 2021). Türler arası farklılık gösteren bu kodon eğilimi, gen uzunluğu ve gen ekspresyon seviyesi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu çalışmada kullanılan türlerin kodon kullanma eğilimleri *Cicer arietinum* için Şekil 4.20.'de *Cicer reticulatum* için Şekil 4.21.'de ve *Cicer echinospermum* için Şekil 4.22.'de verilmiştir. Üç nohut türünde de en çok tercih edilen kodon UUU olarak saptanmıştır. Bu türler birbirleriyle çok yakın akraba olduğundan kodon kullanma eğilimlerinin birbirlerine çok benzediği tespit edilmiştir. Aynı şekilde, her bir nohut türünün aminoasit içeriklerinin yüzdesel oranları birbirleriyle benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.22). Çizelge 4.6.'da her bir tür için göreceli eş anlamlı kodon kullanımı değerleri (RSCU) verilmektedir. Bu değer, bir kodonun aminoasit sentezi için gözlenen gerçek tercih değeri ile beklenen değer arasındaki orandır. RSCU değeri 1'e eşitse bu durumda kodonlar arasında bir eğilim yoktur. Eğer 1'den büyük bir değer alırsa, kodonun tercih edilme frekansı diğer eş anlamlı kodonlardan daha yüksektir (Yuerong Zhang et al., 2012). Bu çalışmada üç türün için gerçekleştirilen RSCU analizleri incelendiğinde, metiyonin aminoasidini kodlayan başlangıç kodonu AUG ve triptofan aminoasidini kodlayan UGG'nin RSCU değeri 1 olarak bulunmuştur ve bu durum kloroplast genomu ile gerçekleştirilen diğer kodon kullanım eğilimi analizlerinde bulunan sonuçlarla uyum içerisindedir (Mun Yao et al., 2020; Tan et al., 2020). Üç nohut türünün de üçüncü pozisyonunda A veya U bazı bulunan kodonların RSCU değeri genellikle 1'den büyükken, üçüncü pozisyonunda G veya C bazı bulunan kodonların RSCU değerinin 1'den küçük olduğu saptanmıştır. Bu durum IRLC ailesine üye diğer baklagillerde gözlenmiş olup (Moghaddam, 2021), tüm yüksek bitkiler için yaygın bir olgu olduğu bildirilmiştir (C. J. Li et al., 2020).

5.5. Kloroplast Genomlarının Nükleotit Farklılıkları Analizleri

Nükleotit çeşitliliği bir popülasyon veya en az iki birey arasındaki polimorfizm seviyesini gösteren bir değer olarak bildirilmiştir (Walther et al., 2002;

Dong et al., 2012). Bu değer, iki DNA dizisi arasındaki, tüm olası eşleşmelerde bölge başına düşen ortalama nükleotit farklılığı sayısı olarak tanımlanmaktadır (Carvalho et al., 2019). Bu çalışmada, üç nohut türü arasında nükleotit farklılaşmasını hesaplamak amacıyla ilk olarak çoklu hizalama yapılmış olup, ardından nükleotit çeşitliliği analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan sekanslama sonucunda *Cicer echinospermum*'da bulunan 85-112 kb'lik inversiyon bölgesinin DHS analizini doğru yansıtmadığı tespit edilmiş ve inversiyon bölgesi maskelenerek (boşluk olarak gösterilerek) analiz tekrarlanmıştır. Tekrarlanan bu analiz sonucunda (Şekil. 4.24.) gözlenen pikler farklılaşan bölgeler olarak tespit edilmiştir. Buna göre, üç nohut türü arasında nükleotit farklılığı gösteren bölgeler rps15, ycf1, ndhA, ndhD, ndhF, atpB-atpE, rps4, psbC-ycf3, psbM-rpoC, atpA, rps16-accD, rps18-psbB ve petB olarak saptanmıştır. Genellikle kara bitkileri ile yapılan nükleotit çeşitlilik analizlerinde pi değeri, analiz için kullanılan tür sayısı, analiz edilecek genom bölgesi gibi değişkenlere göre farklı değer aralıkları almaktadır. Tan ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Psoralea corylifolia* bitkisiyle beraber, *Glycine max* ve benzeri türler arasında tüm kloroplast genomunu kullanarak nükleotit çeşitlilik analizi yapmış ve bu analizde pi diversity (nükleotit çeşitlilik) aralığı 0-0.08 arasında değerler almıştır (Tan et al., 2020). Li ve arkadaşlarının 2017 yılında *Phoebe* (Lauraceae) türleri ile yaptıkları çalışmada ise yine tüm kloroplast genomu kullanarak yapılan analizde, pi diversity aralığı 0-0.016 olarak saptanmıştır (Y. Li et al., 2017). Bu çalışmada kullanılan üç kloroplast genomu için pi diversity aralığı ise 0-0.02 olarak saptanmıştır. Geçmiş çalışmalarda, nükleotit çeşitliliği %1.5'in üzerinde tespit edilen bölgelerin yüksek oranda çeşitlilik gösteren bölgeler olduğu tespit edilmiş ve sonraki çalışmalarda markör olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabilecekleri bildirilmiştir (Doorduyn et al., 2011; Särkinen & George, 2013). Bu çalışmada kullanılan *Cicer* türlerinin kloroplast genomları evrimsel süreçte yüksek oranda korunduğundan, nükleotit çeşitlilik değeri (pi) maksimum 0.018'e kadar gözlenmiştir. Bu bölgeler içerisinde, maksimum nükleotit farklılık değeri rps15 (Pi = 0,01889) ve ardından ycf1 (Pi = 0,01667) genlerinde saptanmıştır. Önceki çalışmalarda, legume familyası içerisinde evrimsel ilişkileri incelemek amacıyla, markör genler olarak genellikle matK, trnL-trnF ve rbcL gibi bölgelerin kullanıldığı bildirilmiştir (Wojciechowski et al., 2004; Tangphatsornruang et al., 2010). Bu çalışmada ise, özellikle *Cicer* türleri arasında yapılacak evrimsel filogeni araştırmalarında rps15 ve ycf1

bölgelerinin, maksimum nükleotit farklılığı gösterdiğinden filogenetik analizlerde ve *Cicer* türlerinin ayrımlanmasında potansiyel markör olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

5.6. Kloroplast Genomuna Dayalı Filogeni Analizi

Kloroplast genom sekansları, bitkiler arasındaki filogenetik çalışmaların yüksek doğrulukta ve popülasyon düzeyinde evrimsel ayrışmanın detaylı bir biçimde incelenebilmesi için zengin bir bilgi içeriği sunar (Wu et al., 2010; Yanjun Zhang et al., 2016). Gerçekleştirilen analizde, bu çalışmada yer alan üç farklı *Cicer* türü, *Fabaceae* familyasından dört farklı baklagil türü ve “outgroup” olarak buğday bitkisinin kloroplast genomu kullanılmış olup, Maximum Likelihood (ML) methodu ile bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu method, kloroplast genom sekanslarını hem baz sırası hem de baz içeriği açısından karşılaştırmakta ve maksimum benzerlik gösteren olasılıkları hesaplayarak filogenetik ağacı oluşturmaktadır (Kress et al., 2005). Ek olarak filogenetik analiz için, Bootstrap replikasyonu 1000 olarak tercih edilmiş ve ağacın doğruluğu test edilmiştir. Bootstrap doğrulaması sonucu, filoegenetik haritalamada oluşan dallanmalar (Branch ve Node) %85’ten büyük bir Bootstrap değeri alırsa, oluşturulan ağacın doğruluğu o kadar yükselmektedir (Felsenstein, 1985).

Bu çalışmada, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum* ve *Cicer echinispermum* türlerinin birbiriyle bir arada, diğer bireylerden ayrı bir takson oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25.). Bu gerçekleştirilen filogenetik ağaçta görülen dallanmalar için elde edilen Bootstrap değeri %100 olarak saptanmıştır. Tüm kloroplast genomu kullanılarak yapılan bu filogenetik ağaç, daha önce IRLC türleri arasında gerçekleştirilen filogenetik çalışmalar ile uyum içerisindedir (Wojciechowski et al., 2004; Schwarz et al., 2015; Lee et al., 2021; Moghaddam, 2021).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kloroplast genomlarının sahip olduğu gen içeriği, evrimsel süreçlerin ve türlerin popülasyon düzeyinde moleküler filogenisinin, detaylı ve yüksek doğrulukta elde edilmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Yapılan bu çalışmada, iki farklı nohut türünün (*C. reticulatum* ve *C. echinopermum*) tüm kloroplast genom sekansı WGS (Whole Genome Sequencing) yöntemiyle, DNA Nanoball teknolojisi kullanılarak 100X genom kapsama ile dizilenmiştir. Kültür nohut türü olan *C. arietinum*'un anotasyonu ise yeni bir online biyoinformatik aracı olan GeSeq ile gerçekleştirilmiştir. Bu üç nohut türünün, cp genom boyutları birbiriyle çok benzer olarak tespit edilmiş ve sırasıyla her genomda kodlanan gen sayısı 112, 117 ve 116 olarak saptanmıştır. Ek olarak bu çalışmadaki nohut kloroplast genomlarının, IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) sınıfında yer alan türler gibi (Magee et al., 2010; Sabir et al., 2014; Sveinsson & Cronk, 2016; Choi et al., 2019) kloroplast genomunda yalnızca bir LSC, bir SSC ve bir IR bölgesi bulundurduğu ve evrimsel süreçte bir adet IR bölgesinin loss (kayıp) olduğu bildirilmiştir. Bu üç nohut türünün kloroplast genomlarının, genom organizasyonu, gen içeriği ve gen sırası açısından yüksek benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu cp genomları evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş olsalar da bazı bölgelerde mutasyonlar gözlenmiş ve bu bölgeler sıcak mutasyon geçirmiş bölgeler (Divergent hot spot) olarak adlandırılmıştır. Bu mutasyon geçirmiş bölgelerde yer alan genler *rps15*, *ycf1*, *ndhA*, *ndhD*, *ndhF*, *atpB-atpE*, *rps4*, *psbC-ycf3*, *psbM-rpoC*, *atpA*, *rps16-accD*, *rps18-psbB* ve *petB* olarak saptanmıştır ve kloroplast genom çalışmalarında potansiyel markörler olarak kullanılabilmesi için literatüre kazandırılmıştır. Tüm kloroplast genom sekansı kullanılarak yapılan filogenetik analizlerle nohut türlerinin topolojisi desteklenmiş olup önceki çalışmalara göre daha detaylı ve yüksek doğrulukta bir filogeni ortaya konulmuştur. Bu çalışma, yabani nohut türleri ile yapılan ilk kloroplast genom çalışmasıdır. *Cicer* türleri gibi büyük bir ekonomik öneme sahip bitkilerde bu tür çalışmaların yapılmasında, kloroplast genom yapısı ve içeriğinin aydınlatılması, kloroplast genom mühendisliği gibi önemli genetik araştırmalar için yol gösterici olması ve gelecekteki bu çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agarwal, G., Jhanwar, S., Priya, P., Singh, V. K., Saxena, M. S., & Parida, S. K.** (2012). Comparative Analysis of Kabuli Chickpea Transcriptome with Desi and Wild Chickpea Provides a Rich Resource for Development of Functional Markers. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052443>
- Alajaji, S. A., & El-Adawy, T. A.** (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.03.015>
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, M. A., Imran, Q. M., Kang, S. M., Al-Hosni, K., Jeong, E. J., Lee, K. E., & Lee, I. J.** (2017). Comparative analysis of complete plastid genomes from wild soybean (*Glycine soja*) and nine other *Glycine* species. *PLoS ONE*, 12(8), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182281>
- Bausher, M. G., Singh, N. D., Lee, S. B., Jansen, R. K., & Daniell, H.** (2006). The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var “Ridge Pineapple”: Organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-21>
- Beier, S., Thiel, T., Münch, T., Scholz, U., & Mascher, M.** (2017). MISA-web: A web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics*, 33(16), 2583–2585. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198>
- Benson, G.** (1999). Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 573–580. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>
- Bi, Y., Zhang, M., Xue, J., Dong, R., Du, Y., & Zhang, X.** (2018). Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: a case study on *Fritillaria*. *Scientific Reports*, 8(1), 1184. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19591-9>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bock, R.** (2012). *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria Advances in Photosynthesis and Respiration Including Bioenergy and Related Processes*. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-94-007-2920-9.pdf>
- Brudno, M., Malde, S., Poliakov, A., Do, C. B., Couronne, O., Dubchak, I., & Batzoglou, S.** (2003). Glocal alignment: Finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics*, 19(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg1005>
- Candela, M., Astiasaran, I., & Bello, J.** (1997). Cooking and Warm-Holding: Effect on General Composition and Amino Acids of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*), Chickpeas (*Cicer arietinum*), and Lentils (*Lens culinaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4763–4767. <https://doi.org/10.1021/jf9702609>
- Carvalho, Y. G. S., Vitorino, L. C., de Souza, U. J. B., & Bessa, L. A.** (2019). Recent trends in research on the genetic diversity of plants: Implications for conservation. *Diversity*, 11(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/d11040062>
- Chi, X., Zhang, F., Dong, Q., & Chen, S.** (2020). Insights into comparative genomics, codon usage bias, and phylogenetic relationship of species from biebersteiniaceae and nitrariaceae based on complete chloroplast genomes. *Plants*, 9(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9111605>
- Choi, I. S., Jansen, R., & Ruhlman, T.** (2019). Lost and found: Return of the inverted repeat in the legume clade defined by its absence. *Genome Biology and Evolution*, 11(4), 1321–1333. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz076>
- Chung, H. J., Jung, J. D., Park, H. W., Kim, J. H., Cha, H. W., Min, S. R., Jeong, W. J., & Liu, J. R.** (2006). The complete chloroplast genome sequences of *Solanum tuberosum* and comparative analysis with *Solanaceae* species identified the presence of a 241-bp deletion in cultivated potato chloroplast DNA sequence. *Plant Cell Reports*, 25(12), 1369–1379. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0196-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cronk, Q., Ojeda, I., & Pennington, R. T.** (2006). Legume comparative genomics: Progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.011>
- Croser, J. S., Clarke, H. J., Siddique, K. H. M., & Khan, T. N.** (2003). Low-temperature stress: Implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 185–219. <https://doi.org/10.1080/713610855>
- Daniell, H., Lee, S. B., Grevich, J., Saski, C., Quesada-Vargas, T., Guda, C., Tomkins, J., & Jansen, R. K.** (2006). Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other *Solanaceae* genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8), 1503–1518. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0254-x>
- Daniell, H., Lin, C., Yu, M., & Chang, W.** (2016). Chloroplast genomes : diversity , evolution , and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 1–29. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T.** (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Ding, Q. X., Liu, J., & Gao, L. Z.** (2016). The complete chloroplast genome of eggplant (*Solanum melongena* l.). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 1(1), 843–844. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1186510>
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S.** (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PloS One*, 7(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Doorduyn, L., Gravendeel, B., Lammers, Y., Ariyurek, Y., Chin-A-Woeng, T., & Vrieling, K.** (2011). The complete chloroplast genome of 17 individuals of pest species *Jacobaea vulgaris*: SNPs, microsatellites and barcoding markers for population and phylogenetic studies. *DNA Research*, 18(2), 93–105. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr002>
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., & Palmer, J. D.** (1995). Multiple Independent Losses of Two Genes and One Intron from Legume Chloroplast Genomes. *Systematic Botany*, 20(3), 272. <https://doi.org/10.2307/2419496>
- F. Ahmad, P.M.Gaur, and J. S. C.** (2005). Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Grain Legumes. *CRC Press*.
- Fajardo, D., Senalik, D., Ames, M., Zhu, H., Steffan, S. A., Harbut, R., Polashock, J., Vorsa, N., Gillespie, E., Kron, K., & Zalapa, J. E.** (2013). Complete plastid genome sequence of *Vaccinium macrocarpon*: Structure, gene content, and rearrangements revealed by next generation sequencing. *Tree Genetics and Genomes*, 9(2), 489–498. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0573-9>
- Fehlmann, T., Reinheimer, S., Geng, C., Su, X., Drmanac, S., Alexeev, A., Zhang, C., Backes, C., Ludwig, N., Hart, M., An, D., Zhu, Z., Xu, C., Chen, A., Ni, M., Liu, J., Li, Y., Poulter, M., Li, Y., Keller, A.** (2016). cPAS-based sequencing on the BGISEQ-500 to explore small non-coding RNAs. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0287-1>
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Food and Agriculture Organization of The United Nations.** (2019). International Organization. <http://www.fao.org/faostat/>
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M., & Dubchak, I.** (2004). VISTA: Computational tools for comparative genomics. *Nucleic*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 273–279.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh458>
- Gantt, J. S., Baldauf, S. L., Calie, P. J., Weeden, N. F., & Palmer, J. D.** (1991). Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO Journal*, 10(10), 3073–3078. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07859.x>
- Green, B. R.** (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant Journal*, 66(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04541.x>
- Greiner, S., Lehwark, P., & Bock, R.** (2019). OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W59–W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz238>
- Guisinger, M. M., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & Jansen, R. K.** (2011). Extreme reconfiguration of plastid genomes in the angiosperm family Geraniaceae: Rearrangements, repeats, and codon usage. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 583–600. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq229>
- Guo, X., Castillo-ramírez, S., González, V., Bustos, P., Fernández-vázquez, J. L., Santamaría, R. I., Arellano, J., Cevallos, M. A., & Dávila, G.** (2007). Rapid evolutionary change of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plastome, and the genomic diversification of legume chloroplasts. *BMC Genomics*, 16, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-228>
- Gupta, S., Nawaz, K., Parween, S., Roy, R., Sahu, K., Pole, A. K., Khandal, H., Srivastava, R., Parida, S. K., & Chattopadhyay, D.** (2017). Draft genome sequence of *Cicer reticulatum* L., the wild progenitor of chickpea provides a resource for agronomic trait improvement. 24(August 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw042>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Heather, J. M., & Chain, B.** (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Heinze, B.** (2007). A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-4>
- Huang, H., Shi, C., Liu, Y., Mao, S., & Gao, L.** (2014). Thirteen *Camellia* chloroplast genome sequences determined by high-throughput sequencing: genome structure and phylogenetic relationships. *BMC Evolutionary Biology*, 1–17.
- J. R. Harlan, J. M. J. de W.** (1971). *Toward a Rational Classification of Cultivated Plants* Author (s): J . R . Harlan and J . M . J . de Wet Published by : Wiley Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/1218252> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may. 20(4), 509–517.
- Jansen, R. K., Cai, Z., Raubeson, L. A., Daniell, H., Depamphilis, C. W., Leebens-Mack, J., Müller, K. F., Guisinger-Bellian, M., Haberle, R. C., Hansen, A. K., Chumley, T. W., Lee, S. B., Peery, R., McNeal, J. R., Kuehl, J. V., & Boore, J. L.** (2007). Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19369–19374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709121104>
- Jansen, R. K., Wojciechowski, M. F., Sanniyasi, E., Lee, S.-B., & Daniell, H.** (2008). Complete plastid genome sequence of the chickpea (*Cicer arietinum*) and the phylogenetic distribution of rps12 and clpP intron losses among legumes (*Leguminosae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 1204–1217. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.06.013>
- Jong, H. C., Jung, D., Hyun, J. K., Cha, W., & Ran, S.** (2006). *The complete chloroplast genome sequences of Solanum tuberosum and comparative*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

analysis with Solanaceae species identified the presence of a 241-bp deletion in cultivated potato chloroplast DNA sequence. 1369–1379.
<https://doi.org/10.1007/s00299-006-0196-4>

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>

Kahraman, A., Pandey, A., Khan, M. K., Lindsay, D., Moenga, S., Vance, L., Bergmann, E., Carrasquilla-Garcia, N., Shin, M. G., Chang, P. L., von Wettberg, E. J. B., Tar'an, B., Cook, D. R., & Penmetsa, R. V. (2017). Distinct subgroups of *Cicer echinospermum* are associated with hybrid sterility and breakdown in interspecific crosses with cultivated chickpea. *Crop Science*, 57(6), 3101–3111.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0335>

Kaila, T., Chaduvla, Pavan K., Rawal, Hukam, C., Saxena, S., Tyagi, A., Amitha Mithra, S. V., Solanke, A., Kaila, P., Sharma, R., Singh, N.K., Gaikwad, K. (2017). Chloroplast Genome Sequence of Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.): Genome Structure and Comparative Analysis. *Genes (Basel)*, 8(9): 212.
<https://doi.org/10.3390/genes8090212>

Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Kim, K., Lee, S. C., Lee, J., Yu, Y., Yang, K., Choi, B. S., Koh, H. J., Waminal, N. E., Choi, H. Il, Kim, N. H., Jang, W., Park, H. S., Lee, J., Lee, H. O., Joh, H. J., Lee, H. J., Park, J. Y., Perumal, S., Jayakodi, M., Yang, T. J. (2015). Complete chloroplast and ribosomal sequences for 30 accessions elucidate evolution of *Oryza* AA genome species. *Scientific Reports*, 5(October), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep15655>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Knights, Ted., Brinsmead, Bob., Frodyce, Merrill., Wood, Jenny., Kelly, Alison., Harden, S.** (2002). *Use of the wild relative Cicer echinospermum in chickpea improvement. September*, 150–154.
- Kress, W. J., Liu, A. Z., Newman, M., & Qing-Jun, L. I.** (2005). The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers. *American Journal of Botany*, 92(1), 167–178. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.167>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kunnimalaiyaan, M., & Nielsen, B. L.** (1997). Fine mapping of replication origins (oriA and oriB) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*, 25(18), 3681–3686. <https://doi.org/10.1093/nar/25.18.3681>
- Kurtz, S., Choudhuri, J. V., Ohlebusch, E., Schleiermacher, C., Stoye, J., & Giegerich, R.** (2001). REPuter: The manifold applications of repeat analysis on a genomic scale. *Nucleic Acids Research*, 29(22), 4633–4642. <https://doi.org/10.1093/nar/29.22.4633>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee, C., Choi, I., Cardoso, D., de Lima, H. C., de Queiroz, L. P., Wojciechowski, M. F., Jansen, R. K., & Ruhlman, T. A.** (2021). The chicken or the egg? Plastome evolution and an independent loss of the inverted repeat in papilionoid legumes. *The Plant Journal*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/tpj.15351>
- Li, C. J., Wang, R. N., & Li, D. Z.** (2020). Comparative analysis of plastid genomes within the *Campanulaceae* and phylogenetic implications. *PLoS ONE*, 15(5), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233167>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Q., Li, Y., Song, J., Xu, H., Xu, J., Zhu, Y., Li, X., Gao, H., Dong, L., Qian, J., Sun, C., & Chen, S. (2014).** High-accuracy de novo assembly and SNP detection of chloroplast genomes using a SMRT circular consensus sequencing strategy. *New Phytologist*, 204(4), 1041–1049. <https://doi.org/10.1111/nph.12966>
- Li, X., Tan, W., Sun, J., Du, J., Zheng, C., Tian, X., Zheng, M., Xiang, B., & Wang, Y. (2019).** Comparison of Four Complete Chloroplast Genomes of Medicinal and Ornamental Meconopsis Species: Genome Organization and Species Discrimination. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47008-8>
- Li, Y., Xu, W., Zou, W., Jiang, D., & Liu, X. (2017).** Complete chloroplast genome sequences of two endangered *Phoebe* (Lauraceae) species. *Botanical Studies*, 58(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0192-8>
- Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X. H. (2018).** Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2>
- Maesen, L.J.G. V.A.N.D E R. (1976).** *ORIGIN , HISTORY AND TAXONOMY OF CHICKPEA. 1883.*
- Magee, A. M., Aspinall, S., Rice, D. W., Cusack, B. P., Sémon, M., Perry, A. S., Stefanović, S., Milbourne, D., Barth, S., Palmer, J. D., Gray, J. C., Kavanagh, T. A., & Wolfe, K. H. (2010).** Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes. *Genome Research*, 20(12), 1700–1710. <https://doi.org/10.1101/gr.111955.110>
- Merga, B., & Haji, J. (2019).** Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>
- Middleton, C. P., Senerchia, N., Stein, N., Akhunov, E. D., Keller, B., Wicker, T., & Kilian, B. (2014).** Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- the evolution of the triticeae tribe. *PLoS ONE*, 9(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085761>
- Moghaddam, M., Ohta, A., Shimizu, M., Terauchi, R., Kazempour-Osaloo, S.** (2021). *Title: The complete chloroplast genome of Onobrychis gaubae (Fabaceae-Papilionoideae): comparative analysis with related IR-lacking clade species.* <https://doi.org/https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-290026/v1>
- Munyao, J. N., Dong, X., Yang, J. X., Mbandi, E. M., Wanga, V. O., Oulo, M. A., Saina, J. K., Musili, P. M., & Hu, G. W.** (2020). Complete chloroplast genomes of *Chlorophytum comosum* and *Chlorophytum gallabatense*: Genome structures, comparative and phylogenetic analysis. *Plants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/plants9030296>
- Nemoto, T., Yokoyama, J., Fukuda, T., Iokawa, Y., & Ohashi, H.** (2010). Phylogeny of Lespedeza (Leguminosae) based on chloroplast trnL-trnF sequences. *Journal of Japanese Botany*, 85(4), 213–229.
- Nene, Y. ., Haware, M. ., & Reddy, M.** (1981). Chickpea Diseases: Resistance Screening Techniques, information Bulletins No. 10. Patancheru. *Informa-Tion Bulletin No. 10. Patancheru, A.P., India: International CroDS Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, 1–10.
- Powell, W., Morgante, M., McDevitt, R., Vendramin, G. G., & Rafalski, J. A.** (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7759–7763. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7759>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P.** (2011). Integrative Genome Viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.Integrative
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A.** (2017).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sabir, J., Schwarz, E., Ellison, N., Zhang, J., Baeshen, N. A., Mutwakil, M., Jansen, R., & Ruhlman, T.** (2014). Evolutionary and biotechnology implications of plastid genome variation in the inverted-repeat-lacking clade of legumes. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 743–754. <https://doi.org/10.1111/pbi.12179>
- Sarı, H., Sarı, D., Adak, A., Çancı, H., İkten, C., Erler, F., Yıldırım, T., Toker, C., & Kahraman, A.** (2018). *Cicer echinospermum* P.H. Davis genotiplerinde nohut yaprak galeri sineğine [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] dayanıklılığın değerlendirilmesi. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 31(1), 71–75. <https://doi.org/10.29136/mediterranean.363722>
- Särkinen, T., & George, M.** (2013). Predicting plastid marker variation: Can complete plastid genomes from closely related species help? *PLoS ONE*, 8(11), 33–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082266>
- Saski, C., Lee, S. B., Daniell, H., Wood, T. C., Tomkins, J., Kim, H. G., & Jansen, R. K.** (2005). Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Molecular Biology*, 59(2), 309–322. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-8882-0>
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 6(5), 283–290. <https://doi.org/10.1093/dnares/6.5.283>
- Saxena, M. S., Bajaj, D., Das, S., Kujur, A., Kumar, V., Singh, M., Bansal, K. C., Tyagi, A. K., & Parida, S. K.** (2014). An integrated genomic approach for rapid delineation of candidate genes regulating agro-morphological traits in chickpea. *DNA Research*, 21(6), 695–710. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu031>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schwarz, E. N., Ruhlman, T. A., Sabir, J. S. M., Hajrah, N. H., Alharbi, N. S., Al-Malki, A. L., Bailey, C. D., & Jansen, R. K. (2015).** Plastid genome sequences of legumes reveal parallel inversions and multiple losses of rps16 in papilionoids. *Journal of Systematics and Evolution*, 53(5), 458–468. <https://doi.org/10.1111/jse.12179>
- Shi, C., Hu, N., Huang, H., Gao, J., Zhao, Y., & Gao, L. (2012).** *An Improved Chloroplast DNA Extraction Procedure for Whole Plastid Genome Sequencing*. 7(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031468>
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Sugiura, M. (1986).** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO Journal*, 5(9), 2043–2049. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x>
- Singh, R., Sharma, P., & Varshney, R. K. (2008).** Chickpea Improvement : Role of Wild Species and Genetic Markers Chickpea Improvement : Role of Wild Species and Genetic Markers. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, January. <https://doi.org/10.5661/bger-25-267>
- Singh, S., Gumber, R. K., Joshi, N., & Singh, K. (2005).** Introgression from wild *Cicer reticulatum* to cultivated chickpea for productivity and disease resistance. *Plant Breeding*, 124(5), 477–480. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01146.x>
- Somarathne, Y., Guan, D. L., Wang, W. Q., Zhao, L., & Xu, S. Q. (2019).** Complete chloroplast genome sequence of *Xanthium sibiricum* provides useful DNA barcodes for future species identification and phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, 305(10), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01614-1>
- Sugiura, M. (1992).** The Chloroplast Genome. *Plant Molecular Biology*, 19, 149–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00032-0>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sveinsson, S., & Cronk, Q.** (2016). Conserved gene clusters in the scrambled plastomes of IRLC legumes (*Fabaceae: Trifolieae* and *Fabeae*). *BioRxiv*, 040188. <https://doi.org/10.1101/040188>
- T. Cavalier-Smith.** (2002). Chloroplast Evolution : Secondary Symbiogenesis and Multiple Losses Chloroplasts originated from Cyanobacteria only. *Current Biology*, 12(01), 62–64.
- Tan, W., Gao, H., Zhang, H., Yu, X., Tian, X., Jiang, W., & Zhou, K.** (2020a). The complete chloroplast genome of Chinese medicine (*Psoralea corylifolia*): Molecular structures, barcoding and phylogenetic analysis. *Plant Gene*, 21(November 2019), 100216. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100216>
- Tangphatsornruang, S., Sangsrakru, D., Chanprasert, J., Uthapaisanwong, P., Yoocha, T., Jomchai, N., & Tragoonrung, S.** (2010). *The Chloroplast Genome Sequence of Mungbean (Vigna radiata) Determined by High-throughput Pyrosequencing : Structural Organization and Phylogenetic Relationships. December 2009*, 11–22. <https://doi:10.1093/dnares/dsp025>
- Tillich, M., Lehwark, P., Pellizzer, T., Ulbricht-Jones, E. S., Fischer, A., Bock, R., & Greiner, S.** (2017). GeSeq - Versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W6–W11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx391>
- Toker, C., Lluch, C., Serraj, R., & Siddique, K. H. M.** (2007). *Chickpea Breeding And Management* (Issue January).
- Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK.** (2020). <https://www.tuik.gov.tr/>
- Upadhyaya, H. D., Thudi, M., Dronavalli, N., Gujaria, N., Singh, S., Sharma, S., & Varshney, R. K.** (2011). Genomic tools and germplasm diversity for chickpea improvement. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 9(1), 45–58. <https://doi.org/10.1017/S1479262110000468>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Walther, A., Kohl, J., Dagan, T., Salamini, F., Martin, W., & Kilian, B.** (2002). *Molecular Diversity at 18 Loci in 321 Wild and 92 Domesticated Lines Reveal No Reduction of Nucleotide Diversity during Triticum monococcum (Einkorn) Domestication: Implications for the Origin of Agriculture*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm192>
- Wang, M., Cui, L., Feng, K., Deng, P., Du, X., Wan, F., Weining, S., & Nie, X.** (2015). Comparative Analysis of Asteraceae Chloroplast Genomes: Structural Organization, RNA Editing and Evolution. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(5), 1526–1538. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0853-2>
- Weng, M. L., Blazier, J. C., Govindu, M., & Jansen, R. K.** (2014). Reconstruction of the ancestral plastid genome in geraniaceae reveals a correlation between genome rearrangements, repeats, and nucleotide substitution rates. *Molecular Biology and Evolution*, 31(3), 645–659. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst257>
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J.** (2004). A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846–1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Wolfe, K. H., Morden, C. W., & Palmer, J. D.** (1992). Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10648–10652. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10648>
- Wu, F. H., Chan, M. T., Liao, D. C., Hsu, C. T., Lee, Y. W., Daniell, H., Duvall, M. R., & Lin, C. S.** (2010). Complete chloroplast genome of *Oncidium Gower Ramsey* and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidiinae*. *BMC Plant Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-68>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, C., Dong, W., Li, W., Lu, Y., Xie, X., Jin, X., Shi, J., He, K., & Suo, Z.** (2017). Comparative analysis of six *Lagerstroemia* complete chloroplast genomes. *Frontiers in Plant Science*, 8(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00015>
- Yang, X., Zhou, T., Su, X., Wang, G., Zhang, X., Guo, Q., & Cao, F.** (2021). Structural characterization and comparative analysis of the chloroplast genome of *Ginkgo biloba* and other gymnosperms. *Journal of Forestry Research*, 32(2), 765–778. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01088-4>
- Zhang, Yanjun, Du, L., Liu, A., Chen, J., Wu, L., Hu, W., Zhang, W., Kim, K., Lee, S. C., Yang, T. J., & Wang, Y.** (2016). The complete chloroplast genome sequences of five *Epimedium* species: Lights into phylogenetic and taxonomic analyses. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00306>
- Zhang, Yuerong, Nie, X., Jia, X., Zhao, C., Biradar, S. S., Wang, L., Du, X., & Weining, S.** (2012). Analysis of codon usage patterns of the chloroplast genomes in the *Poaceae* family. *Australian Journal of Botany*, 60(5), 461. <https://doi.org/10.1071/BT12073>
- Zong, D., Gan, P., Zhou, A., Li, J., Xie, Z., Duan, A., & He, C.** (2019). Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of seven *Populus* species: Insights into alternative female parents of *Populus tomentosa*. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218455>