

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Alper GÖKÇE

**YABANİ MAKARNALIK BUĞDAYDA (*Triticum dicoccoides*)
DNA METİLASYON ÇEŞİTLİLİĞİNİN MSAP
(METHYLATION-SENSITIVE AMPLIFICATION
POLYMORPHISM) TEKNİĞİNE GÖRE SAPTANMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YABANİ MAKARNALIK BUĞDAYDA (*Triticum dicoccoides*) DNA METİLASYON ÇEŞİTLİLİĞİNİN MSAP (METHYLATION-SENSITIVE AMPLIFICATION POLYMORPHISM) TEKNİĞİNE GÖRE SAPTANMASI

Mehmet Alper GÖKÇE

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Yıl: 2020, Sayfa: 113
Jüri : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Doç.Dr. Faheem Shehzad BALOCH

Bu çalışma, “Verimli Hilal” bölgesinin farklı bölgelerinden toplanmış olan yabancı gernik buğday (*T. dicoccoides*) genotiplerinde DNA Metilasyon varyasyonunu MSAP tekniği ile tanımlamak, bu varyasyonun yabancı gernik genotiplerinin toplandığı bölgelere göre değişip değişmediğini belirlemek ve DNA metilasyonunun makarnalık buğdayın evriminde nasıl bir rol oynadığını saptamaya çalışmak amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada 87 adet yabancı gernik genotipi ve 3 adet makarnalık buğday genotipi kullanılmıştır. Genomik DNA’nın metilasyon modelini belirlemek için 3 adet MSAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. *Thalos* transpozon elementini çevreleyen ‘CCGG’ bölgelerinin metilasyon modelini belirlemek için 1 adet TMD (Transposon-Methylation Display) primer kombinasyonu kullanılmıştır. Farklı ülke orijinli yabancı gernik popülasyonlarının ortalama metilasyon seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Yabancı gernik popülasyonunun makarnalık buğday popülasyonuna göre daha fazla metilasyon seviyesine sahip olduğu saptanmıştır. Genomik DNA’nın ve *Thalos* transpozon elementinin incelenen metilasyon seviyesi ve modeli bakımından geniş varyasyon gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışmada genomik DNA ve transpozon metilasyonunun genellikle orijinlerine özgü olduğu ve yabancı buğdayların kültür buğdaylarına göre daha yüksek metilasyon seviyesi ortaya koyduğu saptanmıştır. Bazı genotiplerin toplandıkları orijinlerinden bağımsız metilasyon modelleri sergileyebildiği, özellikle farklı metilasyon seviyesi ve modeline sahip genotiplerin farklı çevre şartları altında epigenetik yanıtın gen fonksiyonlarını nasıl düzenlendiğinin anlaşılması ile ilgili yapılacak çalışmalarda önem arz ettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yabancı Gernik, *Triticum dicoccoides*, DNA Metilasyonu, Epigenetik, MSAP, TMD

ABSTRACT

MSc. THESIS

DETERMINATION OF DNA METHYLATION DIVERSITY IN WILD DURUM WHEAT (*Triticum dicoccoides*) ACCORDING TO MSAP (METHYLATION SENSITIVE AMPLIFICATION POLYMORPHISM) TECHNIQUE

Mehmet Alper GÖKÇE

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Year: 2020, Pages: 113
Jury : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Assoc. Prof. Dr. Faheem Shehzad BALOCH

The purpose of this study was to determine variation of DNA metilation in the genotypes of wild emmer wheat collected from different parts of the "Fertile Crescent " region (*T. dicoccoides*) by the MSAP technique, to determine whether this variation varies according to regions where wild emmer genotypes were collected, and to determine how DNA methylation played a role in the evolution of durum wheat. In the study, 87 wild emmer genotypes and 3 durum wheat genotypes were used. To determine the methylation pattern of genomic DNA, 3 MSAP primer combinations were used. 1 TMD (Transposon-Methylation Display) primer combination was used to determine the methylation model of the 'CCGG' regions flanking the *Thalos* transposon element. It was determined that the average methylation levels of wild emmer populations of different country origin were close to each other. It was determined that the wild emmer population has a higher methylation level than the durum wheat population. It was determined that genomic DNA and *Thalos* transposon element showed wide variation in terms of methylation level and model.

In this study, it was determined that genomic DNA and transposon methylation are generally specific to their origin and that wild wheats exhibit higher methylation levels than culture wheats. It was concluded that some genotypes can exhibit methylation patterns independent of their origin, some genotypes may be important for future studies to understand the role of epigenetic factors on gene function under different environmental conditions.

Key Words: Wild emmer, *Triticum dicoccoides*, DNA Methylation, Epigenetic, MSAP, TMD

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

“Verimli Hilal” bölgesinin farklı bölgelerinden toplanmış olan yabancı gernik buğday genotiplerinde (*T. dicoccoides*) DNA Metilasyon varyasyonunu MSAP tekniği ile tanımlamak, bu varyasyonun yabancı gernik genotiplerinin toplandığı bölgelere göre değişip değişmediğini belirlemek ve DNA metilasyonunun makarnalık buğdayın evriminde nasıl bir rol oynadığını saptamaya çalışmak için 87 adet yabancı gernik genotipi ve 3 adet makarnalık buğday (Svevo, Karakılçık ve Çeşit4) genotipi kullanılmıştır. Yabancı gernik genotiplerinin 15 adedi İsrail, 49 adedi Türkiye, 10 adedi Suriye, 13 adedi Lübnan orjinlidir. Yabancı gernik popülasyonları ve makarnalık buğday çeşitleri 2018-2019 yetiştirme yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama Alanına 15 Kasım 2018 tarihinde el ile ekilmiştir.

Bu çalışmada 3 adet MSAP primer kombinasyonu kullanılarak 87 adet yabancı gernik ve 3 adet makarnalık buğdayının metilasyon çeşitliliği ve modeli belirlenmiştir. Bunlara ilave olarak yabancı gernik ve makarnalık buğdayın *Thalos* transpozon elementini çevreleyen ‘CCGG’ bölgelerinin metilasyon çeşitliliğini ve modelini belirlemek için 1 adet TMD (Transposon-Methylation Display) primer kombinasyonu kullanılmıştır.

Yabancı gernik popülasyonu içerisinde (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %45.54 ile %93.1 arasında, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %50 ile %92.31 arasında, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %48.5 ile %84.87 arasında, tüm primer kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesi %49.74 ile %90.48 arasında değişmiştir. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR43 olduğu, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR45

olduğu, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin LB61, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin SY42 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise TR24 olduğu belirlenmiştir.

Makarnalık buğday genotiplerinin “(E)-ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %62.65 ile %48.15 arasında, “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %63.41 ile %52.50 arasında, “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %78.63 ile %56.89 arasında, tüm primer kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesinin ise %53.21 ile %63.40 arasında değıştiği belirlenmiştir. “(E)-ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo olduğu, “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Çeşit4 olduğu, “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise Çeşit4 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip Çeşit4 olduğu belirlenmiştir.

Yabani gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin üç primer kombinasyonuna ait metilasyon tiplerine göre elde edilen metilasyon seviyeleri belirlenmiştir. Tüm primer çiftleri için yabani gerniğın makarnalık buğdaya göre metilasyon seviyesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm primer çiftleri incelendiğinde Tip 2 metilasyon durumu için makarnalık buğday genotiplerinin, Tip 3 metilasyon durumu için ise yabani gernik genotiplerinin metilasyon seviyesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yabani gernik buğdaylarının Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli genotipler arasında farklı

primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri belirlenmiştir. Tüm kombinasyonlar için Tip 2 metilasyon seviyesinin Tip 3 metilasyon seviyesinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Farklı ülke orjinli yabancı gernik popülasyonlarının ortalama metilasyon seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

Yabancı gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin tüm kombinasyonlardan metilasyona duyarlı lokus sayısının metillenmemiş lokuslara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm primer kombinasyonlarına göre popülasyonlar arası çeşitliliğin $P < 0.05$ içinde önemli, popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu belirlenmiştir. Farklı ülkelere ait yabancı gernik buğday popülasyonlarının tüm kombinasyonlardan elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde popülasyonlar arası çeşitliliğin $P < 0.01$ içinde önemli, popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır.

TMD analizi için *Thalos*/(HM)-TCAG primer çifti kullanılarak 87 adet yabancı gernik ve 3 adet makarnalık buğday genotipinde *Thalos* transpozonunun metilasyon seviyeleri belirlenmiştir. Yabancı gernik popülasyonu içerisinde *Thalos*/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %43.04 ile %75.93 arasında değişmiştir. *Thalos*/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre *Thalos* transpozon elementinin incelenen genotiplerde metilasyon seviyesi bakımından geniş varyasyon gösterdiği saptanmıştır. Yabancı gernik popülasyonu içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip SY60, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip ise Zavitan olmuştur. Makarnalık buğday genotipleri incelendiğinde *Thalos* transpozon elementinin metilasyon seviyesinin %56.04 ile %61.29 arasında değiştiği saptanmıştır. Makarnalık buğday genotipleri içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip Karakılçık88 olduğu belirlenmiştir. Metilasyon tiplerine göre *Thalos*/(HM)-TCAG” primeri çifti için yabancı gernik ve makarnalık buğday popülasyonları karşılaştırıldığında Tip2 ve Tip3 metilasyon seviyeleri birbirinden farklılık göstermesine rağmen toplam metilasyon seviyeleri

çok yakın değerlerde olduğu saptanmıştır. Yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonunda “*Thalos*/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Farklı ülke orijinli yabani gernik genotiplerinde “*Thalos*/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu bulunmuştur.

Tüm primer kombinasyonlarından elde edilen veriler kullanılarak Neighbor-Joining analizi yapılmış, analiz yapılırken her bir primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* verileri ile ayrı olacak şekilde dendogram oluşturulmuştur. Tüm kombinasyonların verileri birleştirilerek elde edilen dendogramlarda *HpaII* reaksiyonu için tüm primer kombinasyonlarına ait dendogram incelendiğinde genotipler 3 ana gruba ayrılmış, 2 grubu Türkiye genotipleri oluşturmuştur. LB21 ve SY62 genotipleri Türkiye popülasyonu ile birlikte kümelenmiştir. TR31, TR68, TR74, TR88 genotipleri diğer Türkiye genotiplerinden ayrı bir şekilde kümelenmiştir. TR67 genotipi İsrail, Lübnan, Suriye grubu içerisinde kümelenmiştir. *MspI* reaksiyonu için tüm primer kombinasyonlarına ait dendogram 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotiplerinin bir kısmı Lübnan, Suriye, İsrail genotipleriyle aynı ana grupta alt bir grup oluşturmuştur. SY62 genotipi Türkiye alt grubu içerisinde yer almıştır. Tüm dendogramlar göz önüne alındığında genellikle Türkiye genotipleri bir arada gruplanırken, Suriye, İsrail ve Lübnan genotipleri ayrı olarak gruplanmıştır. *Thalos*/(*HpaII*)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogram incelendiğinde 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye popülasyonu bir ana grup altında kümelenmiştir. TR88, TR68, TR74, TR31, TR53 genotipleri Suriye, Lübnan, İsrail popülasyonlarıyla aynı ana grupta, IS49 ve SY62 genotipleri ise Türkiye grubu içerisinde yer almıştır. *Thalos*/(*MspI*)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogram incelendiğinde dendogram 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotipleri bir ana grubu oluştururken, Türkiye genotiplerinin bazıları diğer ana gruplara dağılmıştır. SY62 genotipi Türkiye popülasyonu ile aynı grupta yer almıştır.

Bu araştırma kapsamında saptanan yukarıdaki bulgulara dayanarak, genomik DNA ve transpozon metilasyonunun genellikle genotiplerin orijinlerine özgü olduğu, yabani buğdayların kültür buğdaylarına göre daha yüksek metilasyon seviyesi ortaya koyduğu saptanmıştır. Bazı genotiplerin toplandıkları bölgelerden bağımsız metilasyon modelleri sergileyebildiği, özellikle farklı metilasyon seviyesi ve modeline sahip genotiplerin farklı çevre şartları altında epigenetik yanıtın gen fonksiyonlarını nasıl düzenlendiğinin anlaşılması ile ilgili yapılacak araştırmalarda önem arz ettiği sonucuna varılmıştır.





TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, teşvik eden, desteklerini hep yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübesi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İsrail'de aldığım eğitim süresinde bana laboratuvarlarını açan ve tez çalışmama katkı sağlayan Prof.Khalil Kashkush'a, bu süreçte desteklerini esirgemeyen Dr. Vadim Khasdan ve tüm laboratuvar ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yardım ve destekte bulunan Dr. Esra ÇAKIR, Dr. Mustafa TOPU, Dr. Uğur SESİZ, Yüksek Ziraat Mühendisi Buse TAGAY, Yüksek Ziraat Mühendisi İbrahim KARAHAN ve Ziraat Mühendisi Mihriban TAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatımın her döneminde bana desteklerini esirgemeyen, bana her zaman inanan, güvenen sevgili babam Bülend GÖKÇE, annem Medine GÖKÇE, kardeşlerim Esra GÖKÇE ve Ahmet Ersin GÖKÇE'ye sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Farklı Bitki Türlerinde DNA Metilasyonunun Varyasyonları	9
2.2. Farklı Bitkilerin Organ ve Dokularında DNA Metilasyon Profilleri	10
2.3. Buğdayda Metilasyon Çalışmaları	12
2.4. Diğer Bitkilerde Metilasyon Çalışmaları	14
3. MATERYAL ve METOD	21
3.1. Bitki Materyali	21
3.2. DNA İzolasyonu	24
3.2.1. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi	27
3.3. MSAP (Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm) Analizi	29
3.3.1. Adaptörlerin Hazırlanması	31
3.3.2. Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonu	31
3.3.3. Ön Selektif PCR (Preamplifikasyon) Aşaması	33
3.3.4. Selektif PCR Aşaması	34
3.4. Transposon Metilasyon Görüntüsü (TMD) Analizi	35
3.4.1. Adaptörlerin Hazırlanması	36
3.4.2. TMD Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonu	36
3.4.3. Ön Selektif PCR (Preamplifikasyon) Aşaması	37
3.4.4. Selektif PCR Aşaması	38

3.5. Kapiler Elektroforez’de Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması	38
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	39
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) Analizi	41
4.1.1. Genotiplerin DNA Metilasyon Seviyeleri.....	41
4.1.2. Yabani Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre DNA Metilasyon Seviyeleri	45
4.1.3. Farklı Orijinli Yabani Gernik Genotiplerinin Metilasyon Tiplerine Göre DNA Metilasyon Seviyeleri	50
4.1.4. Yabani Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonunun Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi.....	56
4.1.5. Yabani Gernik Popülasyonlarının Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi	60
4.2. TMD (Transposon Methylation Display) Analizi.....	63
4.2.1. Tüm Genotiplerin Thalos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri.....	63
4.2.2. Yabani Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre Thalos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri	65
4.2.3. Farklı Orijinli Yabani Gernik Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre Thalos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri	67
4.2.4. Yabani Gernik ve Makarnalık Buğday genotiplerinin Thalos Transpozonu Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi	68
4.2.5. Yabani Gernik Popülasyonlarının Thalos Transpozonu Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi.....	70
4.3. Neighbor-Joining(NJ) Analizi	71

4.3.1. (E)ACT/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar	72
4.3.2. (E)AGC/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar	75
4.3.3. (E)ACG/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar	78
4.3.4. Tüm Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar	80
4.3.5. Thallos/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar	83
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
5.1. MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) Analizi	87
5.2. TMD (Transposon Methylation Display) Analizi.....	94
5.3. Neighbor-Joining(NJ) Analizi	94
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	113



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	İncelenen 87 yabancı gernik genotipine ait toplanma yeri ve bölgesi	22
Çizelge 3.2.	<i>HpaII/MspI</i> kesim enzimlerinin CpG bölgelerinde sitozin metilasyonuna duyarlılıklarının şematik gösterimi	30
Çizelge 3.3.	MSAP için kullanılan adaptör ve tüm primerlerin listesi.....	30
Çizelge 3.4.	TMD için kullanılan adaptör ve tüm primerlerin listesi.....	35
Çizelge 3.5.	Bant profillerine göre örnek skorlama.....	40
Çizelge 4.1.	Yabancı gernik genotiplerinin primer kombinasyonlarına göre metilasyon seviyesi	41
Çizelge 4.2.	Makarnalık buğday genotiplerinin primer kombinasyonlarına göre metilasyon seviyesi	44
Çizelge 4.3.	Yabancı ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında farklı primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri	46
Çizelge 4.4.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik popülasyonları arasında farklı primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri.....	51
Çizelge 4.5.	Yabancı gernik ve makarnalık buğday popülasyonlarına göre primer kombinasyonlarının lokus bilgileri	57
Çizelge 4.6.	Yabancı gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	59
Çizelge 4.7.	Farklı ülkelere ait yabancı gernik popülasyonlarına göre primer kombinasyonlarının lokus bilgileri.....	60
Çizelge 4.8.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY), Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik genotiplerinin moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	62

Çizelge 4.9.	Tüm genotiplerin Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre metilasyon % seviyesi.....	64
Çizelge 4.10.	Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri.....	65
Çizelge 4.11.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	67
Çizelge 4.12.	Yabani gernik ve makarnalık buğday genotiplerine göre Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun lokus bilgileri	69
Çizelge 4.13.	Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonlarının moleküler varyans analiz (AMOVA) sonuçları	69
Çizelge 4.14.	Farklı ülkelere ait yabani gernik popülasyonlarına göre primer kombinasyonunun lokus bilgileri	70
Çizelge 4.15.	Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonlarının moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	71

Şekil 2.1.	Bitkilerde DNA metilasyonunun düzenlenmesi (Zhang ve ark, 2018).....	9
Şekil 3.1.	Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama Alanına ekilen yabancı genotipleri	24
Şekil 3.2.	Yaprak örneklerinin havanda öğütülmesi.....	25
Şekil 3.3.	Kloroform isoamyl alkol eklenmesinin ardından üst faz görüntüsü ve fazın yeni tüp içine aktarımı	26
Şekil 3.4.	İzopropanol eklenerek elde edilen DNA örneği ve üst faz dökülerek kurutmaya bırakılan tüpler	26
Şekil 3.5.	DNA örneklerinin kantitatif miktarı ve kalitesi DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer cihazı ile ölçülmesi.....	27
Şekil 3.6.	DNA örneklerinin kalitatif analizi için kullanılan transilluminatör ve ultraviyale jel dökümantasyon sistemi.....	28
Şekil 3.7.	DNA'nın kalitatif analizi için agaroz jel görüntüsü	29
Şekil 3.8.	Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonlarının %0.8'lik agaroz jelde kontrolü	33
Şekil 3.9.	Ön Selektif PCR reaksiyonlarının %1.5'lik agaroz jelde kontrolü.....	34
Şekil 4.1.	Yabancı ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	47
Şekil 4.2.	Yabancı ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	48
Şekil 4.3.	Yabancı ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)-ACG/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	49

Şekil 4.4.	Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında primer kombinasyonlarının ortalamasının metilasyon tiplerine göre seviyelerini gösteren histogram.....	50
Şekil 4.5.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında “(E)ACT/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	52
Şekil 4.6.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında “(E)-AGC/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	53
Şekil 4.7.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında “(E)-ACG/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	54
Şekil 4.8.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında primer kombinasyonlarının ortalamasının metilasyon tiplerine göre seviyeleri.....	56
Şekil 4.9.	Yabani ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	66
Şekil 4.10.	Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabani gernik popülasyonları arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri	68
Şekil 4.11.	(E)ACT/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	73
Şekil 4.12.	(E)ACT/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	74

Şekil 4.13. (E)AGC/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı :Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	76
Şekil 4.14. (E)AGC/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	77
Şekil 4.15. (E)ACG/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitlerve Zavitan genotipini ifade etmektedir) ...	78
Şekil 4.16. (E)ACG/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitlerve Zavitan genotipini ifade etmektedir) ...	79
Şekil 4.17. Tüm Primer Kombinasyonun <i>HpaII</i> verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	80
Şekil 4.18. Tüm Primer Kombinasyonun <i>Msp</i> verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitlerve Zavitan genotipini ifade etmektedir) ...	81
Şekil 4.19. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna <i>HpaII</i> verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	84
Şekil 4.20. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna <i>MspI</i> verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir).....	85



SİMGELER VE KISALTMALAR

MSAP	: Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing (Metilasyona Duyarlı Parça Uzunluk Polimorfizmi)
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
TE	: Transposable Element(Transpoze Olabilen Element)
TMD	: Transposon-Methylation Display
MITE	: Miniature inverted-repeat transposable element
CMT	: Chromomethlase
DRM	: Domains Rearranged
RdDM	: RNA-directed DNA Methylation
PEG	: Polietilen Glisol
CTAB	: Cetyl Trimethyl Amonyum Bromide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi- Nükleozid Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
g	: Gram
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MQM	: Multiple QTL Mapping (Çoklu QTL Haritalama)
NaCl	: Sodyum klorür
ng	: Nanogram
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
TE	: Tris/ EDTA Tampon çözeltisi
UV	: Ultraviolet

μl : Mikrolitre
 μM : Mikromolar



1.GİRİŞ

Yaklaşık 12.000 yıl önce ‘Verimli Hilal’ olarak adlandırılan (Türkiye’nin Güneydoğusu, Irak, İran, Suriye, Filistin, İsrail ve Ürdün) bölgede ‘avcı toplayıcı’ şeklinde yaşayan bir grup insan tarafından bitkiler yetiştirilmeye başlanmış ve kültüre alınmıştır (Childe, 1953; Salamini ve ark, 2002). Verimli Hilal bölgesinde başlayan tarım aynı zamanda nüfusun artışına neden olmuş ve bununla birlikte kültürel gelişim hız kazanmıştır. Tahıl türlerinin yabani ataları olan yabani buğdaylar (*Triticum urartu*, *T. boeoticum* ve *T. dicoccoides*), yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) ve yabani çavdar’ın (*Secale vavilovii*) “Verimli Hilal” bölgesinde dağılım gösterdiği Salamini ve ark, (2002) tarafından bildirilmiştir. Özellikle arkeolojik kayıtlar bu bölgede yaşayan insanların, yabani tahılları kültüre almadan önce doğadan direk olarak hasat ettiğini bize göstermiştir (Moore ve ark, 2000; Zohary ve ark, 2000; Gopher ve ark., 2002; Salamini ve ark, 2002).

Buğday grubu içinde bulunan *Triticum* cinsi, kromozom sayısına göre diploid ($2n=14$), tetraploid ($2n=28$) ve hekzaploid ($2n=42$) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Feldman ve Levy, 2005). Kültüre alınmış makarnalık buğdayın yabani progenitörü olan *T. dicoccoides* hem makarnalık buğdayın, hem de makarnalık buğdayın *Ae. tauschii* ($2n=14$, DD) ile doğal melezlenmesi ve kromozomlarının katlanması sonucu meydana gelmiş ekmeklik buğdayın oluşmasına direk katkısı nedeniyle “Buğdayın Anası” olarak da adlandırılmaktadır. Yabani gernik buğdayı (*T.dicoccoides*) iki farklı genomu (AA ve BB) barındıran allotetraploid bir türdür. Bu tür “Verimli Hilal” bölgesinde doğal olarak dağılım göstermektedir (Feldman ve Millet, 2001; Salamini ve ark, 2002; Özkan ve ark, 2011).

Bitki ıslahında modern tekniklerin hızlı bir şekilde kullanılmaya başlanması, aynı anaçların bitki ıslahında kullanılması gibi nedenlerden dolayı kültür bitkilerinin genetik tabanının gitgide daraldığı ifade edilmiştir (Frankel ve Soule, 1981). Özellikle bazı kültür bitkilerinde genetik çeşitlilik oldukça azalmış ve bu durumda bu kültür bitkilerinin hastalıklara, zararlılara ve çevresel streslere karşı

giderek daha duyarlı hale gelmesine vesile olmuştur. Özellikle kültür bitkilerinin yabani akraba türlerinin bu stres faktörlerine karşı daha dayanıklı olduğu ve bitki ıslahında kullanılabileceği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Richards ve ark, 2009; Pigliucci, 2010; Martin ve ark, 2011). Bu sebeple kültür bitkilerinin yabani akrabalarının önemi her geçen gün daha da artmış ve bu yabani kültür bitkileri kullanılarak “Ön ıslah” programları bir çok ülkede başlatılmıştır.

“Verimli Hilal” bölgesinde doğal dağılım gösteren yabani gernik buğday popülasyonlarının, kültür buğdaylarından daha geniş bir genetik varyasyona sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Joshi ve Nguyen, 1993; Özkan ve ark, 2011). Bu genetik varyasyonun genetik temelinin araştırılması, nedenlerinin ortaya çıkarılması ileriye dönük yapılacak olan buğday ıslah çalışmalarına önemli katkı sağlayacaktır. Son yıllarda genetik varyasyonların oluşmasında Epigenetiğin etkisinin ne olduğu üzerine bir çok araştırma yapılmış ve farklı hipotezler öne sürülmüştür (Salmon ve ark, 2008; Tok ve ark, 2011; Sa’ ez-Laguna ve ark, 2014, Venetsky ve ark, 2015). Epigenetik, DNA sekansındaki değişiklikler ile açıklanamayan gen ekspresyonunda ve fonksiyonunda ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerin araştırılması olarak ifade edilmiştir (Richards, 2006; Bird, 2007). Epigenetik değişikliklerin belirli genleri aktive edebilen, genin etkisini azaltan veya tamamen devre dışı bırakabilen bir dizi moleküler sürece dayandığı ve kalıtsal olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark, 2004; Bird, 2007). Epigenetik değişiklikler DNA’nın sitozin metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA aracılı gen susturma süreçlerini kapsamaktadır (Grant-Downton ve Dickinson, 2005; Berger, 2007). Epigenetik mekanizmalar, DNA sekansını değiştirmeden gen ekspresyonunu ve organizma fonksiyonunu değiştirebilmekte ve fenotipik varyasyona neden olabilmektedir (Cubas ve ark, 1999; Morgan ve ark, 1999; Rakyen ve ark, 2003; Manning ve ark, 2006; Richards, 2006; Kucharski ve ark, 2008). Hipermetilasyon (hypermethylation) gen ekspresyonunun azalması ile ilişkiliyken, hipometilasyon (hypomethylation) gen ekspresyonunun artması ile ilişkilidir (Gonzalzo ve Jones, 1997). Yapılan çalışmalarda metilasyonun

tekrarlayan DNA’larda yoğunlukla görülmesinden dolayı transpozonların (Transposable Elements- TEs) susturulmasının DNA metilasyonunun görevlerinden olduğu ileri sürülmüştür (Yaakov ve Kashkush, 2011; Mengi ve ark, 2012).

DNA metilasyon varyasyonunun belirlenmesinde Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP, Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) ve bisulfite dizileme teknikleri yoğun olarak kullanılmış olup halen kullanılmaya devam edilmektedir (Salmon ve ark, 2008; Li ve ark, 2008; Yaakov ve Kashkush, 2011; Sa’ ez-Laguna ve ark, 2014; Venetsky ve ark, 2015; Song ve ark, 2018). MSAP tekniği, standart bir AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) protokolündeki *MseI* enziminin yerine metilasyona duyarlı enzimlerin (*MspI* ve *HpaII*) kullanılmasıyla geliştirilmiş olup halen çoklu-lokus epigenotipinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Vos ve ark, 1995). MSAP tekniği kullanılarak bir çok kültür bitkisinde metilasyon varyasyonu araştırılmıştır. Yabani gernikte Venetsky ve ark (2015) tarafından sadece İsrail orijinli materyal kullanılarak genetik varyasyon tanımlanmaya çalışılmıştır. Ancak, “Verimli Hilal” bölgesinden toplanmış materyalde bu tip bir araştırma henüz yapılmamıştır.

Bundan dolayı bu çalışma, “Verimli Hilal” bölgesinin farklı bölgelerinden toplanmış olan yabani gernik buğday genotiplerinde (*T. dicoccoides*) a) DNA Metilasyon varyasyonunu MSAP tekniğine ile tanımlamak, b) bu varyasyonun yabani gernik genotiplerinin toplandığı bölgelere göre değişip değişmediğini belirlemek ve c) DNA metilasyonunun makarnalık buğdayın evriminde nasıl bir rol oynadığını saptama amaçlarıyla yürütülmüştür.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yabani gernik buğdayı (*T.turgidum* ssp. *dicoccoides*) iki farklı genomu (AA ve BB) barındıran allotetraploid bir türdür. Bu tür “Verimli Hilal” bölgesinde (Türkiye’nin güneydoğusu, Irak, İran, Suriye, Filistin, İsrail ve Ürdün) doğal olarak dağılım göstermektedir (Feldman ve Millet, 2001; Salamini ve ark, 2002). *T.turgidum* ssp. *dicoccoides*, makarnalık buğdayın yabani atasıdır (Feldman ve Sears, 1981). Hem makarnalık buğdayın hem de makarnalık buğdayın *Ae. tauschii* ile doğal melezlenmesi ve kromozomlarının katlanması sonucu ekmeklik buğdayın ortaya çıkmasına doğrudan katkı yaptığı için “buğdayın anası” olarak da ifade edilmektedir (Feldman ve Millet, 2001; Salamini ve ark, 2002; Özkan ve ark, 2011).

Üzerinde yaşadığımız dünyada bulunan kültür bitkilerinin yabani formları insan eliyle ortaya çıkan felaketler dolayısıyla hızlı bir şekilde azalmaktadır (Avery, 1985). Bundan dolayı, kültür bitkilerinin yabani gen kaynaklarının ivedilikle dağılım gösterdiği ekolojik alanlardan toplanması, tanımlanması ve koruma altına alınıp gelecek nesillere aktarılması gerekmektedir. Son yıllarda yoğun olarak yapılan bitki ıslahı çalışmaları, aynı anaçların melezlemelerde kullanılmasına zemin hazırlamış ve bu durum da kültür bitkilerinde genetik çeşitliliğin azalmasına yol açmıştır (Frankel ve Soule, 1981). Özellikle kültür bitkilerinin yabani akrabalarının abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı daha dayanıklı olduğu ve bitki ıslahında kullanılabileceği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Richards ve ark., 2009; Pigliucci, 2010; Martin ve ark., 2011). Bu durum kültür bitkilerinin yabani akrabalarının önemini her geçen gün daha da artırmaktadır.

Farklı bölgelerden toplanmış olan yabani gernik buğdayının genetik yapısının bitkinin yetiştiği yerin eko-coğrafik özelliğinden, iklim ve toprak faktörlerinden kaynaklandığı, bunda genetik çeşitliliği arttırdığı rapor edilmiştir (Nevo ve Beiles, 1989; Li ve ark, 1999; Li ve ark, 2000; Li ve ark, 2002; Li ve ark,

2003; Li ve ark, 2008; Peng ve ark, 2011). Örneğin, allozim (allozyme, alloenzyme) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markörleri kullanılarak yapılan bir çalışma İsrail'deki mikrocoğrafik bölgelerde yetişen yabani gernik buğday popülasyonlarında, farklı toprak, topoğrafya ve iklim koşullarının genetik çeşitliliğe neden olduğu bildirilmiştir (Li ve ark, 2000). İsrail'de “terra rosa” ve “bazalt” toprak tiplerinde yetişen *T.dicoccoides* popülasyonları kullanılarak yapılan bir çalışmada, popülasyonlar arasında genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu, bu varyasyonun hem genetik hem de ekolojik faktörler tarafından etkilendiği Li ve ark, (2000) tarafından öne sürülmüştür.

Epigenetik, DNA sekansındaki değişiklikler ile açıklanamayan gen ekspresyonunda ve fonksiyonunda ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerin araştırılması olarak ifade edilmektedir (Richards, 2006; Bird, 2007). Epigenetik değişiklikler, belirli genleri aktive edebilen, azaltan veya tamamen devre dışı bırakabilen bir dizi moleküler sürece dayandığı, aynı zamanda kalıtsal olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark, 2004; Bird, 2007). Epigenetik değişiklikler DNA'nın sitozin metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA aracılı gen susturma süreçlerini kapsadığı rapor edilmiştir (Grant-Downton ve Dickinson, 2005; Berger, 2007).

Geçmişte, epigenetik terimi genotipin fenotipe nasıl dönüştüğünü belirleyen ve böylece gelişimsel biyoloji alanının çoğunu kapsayan tüm süreçleri içerecek şekilde daha geniş bir anlamda kullanılmıştır (Richards, 2006; Bird, 2007). Tarihsel olarak, “epigenetik” kelimesi genetik prensiplerle açıklanamayan olayları tanımlamak için kullanılmıştır. Waddington (1940), epigenetik terimini “fenotipi ortaya çıkaran genler ve ürünleri arasındaki etkileşimleri araştıran biyoloji dalı” olarak tanımlamıştır. Belirlenen ilk epigenetik moleküler faktörü 1970'lerde keşfedilen DNA metilasyonudur. Holliday ve Pugh (1975) yaptıkları çalışmada, sitozin-guanin (CpG) dinükleotidlerinin metilasyonunu içeren kimyasal DNA modifikasyonlarını keşfetmişler ve epigenetiğin moleküler mekanizmasını ilk olarak ortaya çıkarmışlardır. 1980'lerin sonlarında ve 1990'ların başlarında DNA metilasyonu'nun dişilerde (XX) bir X kromozomunun inaktivasyonu ve genomik

baskılanma (imprinting) yani genin aktivitesini durdurucu etkisi üzerinde durulmuştur. Daha sonraki çalışmalarda, X kromozomu inaktivasyonunun ve genomik baskılanmanın (imprinting) epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlendiği, epigenetik gen regülasyon mekanizmalarının kalıtsal değişiklikler meydana getirdiği rapor edilmiştir. (Monk, 1988; Willard ve ark, 1993; Chen ve Riggs, 2005). Belirlenen bir sonraki epigenetik faktör ise histon modifikasyonları ve genomun düzenlenmesinde kromatin yapısının öneminin anlaşılması olmuştur (Turner, 1988). Bunu, 2000 yılında protein kodlamayan RNA'nın belirlenmesi ve 2005 yılında ilk epigenom analizi çalışması takip etmiştir (Pokholok ve ark, 2005).

Ekolojik epigenetik, epigenetik varyasyon ile ekolojik olarak ilgili fenotipik varyasyon arasındaki ilişkiyi araştırmaktadır (Schrey ve ark, 2013). Epigenetik mekanizmalar, DNA sekansını değiştirmeden gen ekspresyonunu değiştirebilmekte ve morfolojik karakterlerde varyasyona neden olabilmektedir. (Cubas ve ark, 1999; Morgan ve ark, 1999; Rakyan ve ark, 2003; Richards, 2006; Manning ve ark, 2006; Kucharski ve ark, 2008). Epigenetik değişiklikler, ilgili genin fonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilmekte ve bu sayede bir organizmanın belirli çevresel koşullara adaptasyonunu etkileyebilmektedir (Flavia ve ark, 2019).

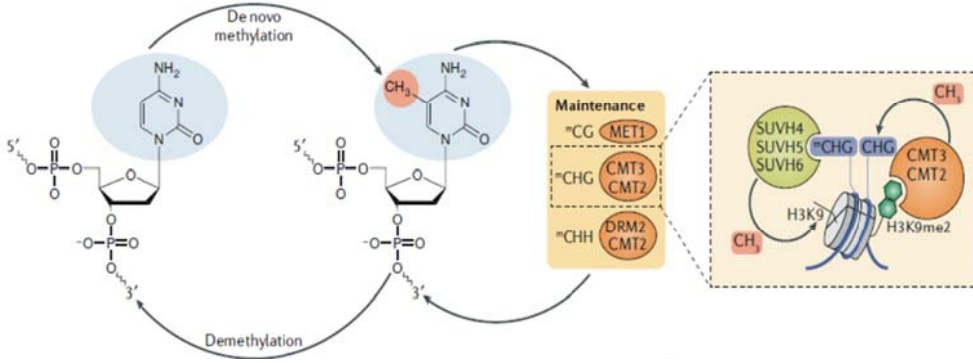
Epigenetik regülasyon, gen diziliminin DNA sekansı dışındaki modifikasyonlarla kalıtsal olarak değiştirilebilmesidir. Çoğunlukla CG ve CHG (H; A, C, T) bölgelerinin 5-sitosin metilasyonundan meydana gelmektedir (Gruenbaum ve ark, 1982). Genel bir kural olarak, hipermetilasyon (hypermethylation) gen ekspresyonunun azalması ile ilişkiliyken, hipometilasyon (hypomethylation) gen ekspresyonunun artması ile ilişkilidir (Gonzalvo ve Jones, 1997).

Kültür bitkileri ve bunların yabani formlarında metilasyon temelli epigenetik varyasyonun yapısı ve kapsamı hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu konuda yapılmış çalışmalarda Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP, Methylation Sensitive Amplified Polymorphism; Reyna-Lopez ve ark., 1997) ve bisulfit dizileme tekniklerinin yoğun olarak kullanıldığı görülmektedir

(Gardiner ve ark, 2005; Salmon ve ark, 2008; Li ve ark, 2008; Yaakov ve Kashkush, 2011; Sa' ez-Laguna ve ark, 2014; Venetsky ve ark, 2015; Song ve ark, 2018). MSAP tekniğinin DNA'nın metilasyonundaki varyasyonları doğru ve maliyetsiz bir şekilde tarayabileceği bildirilmiştir (Schrey ve ark., 2013). MSAP, standart bir AFLP protokolündeki *MseI*'in yerini metilasyona duyarlı enzimlerin (*MspI* ve *HpaII*) kullanılmasıyla gerçekleştirilir. *MspI* ve *HpaII* enzimleri, CCGG tanıma dizisinin sitozin metilasyonuna farklı hassasiyet göstermeleri sayesinde MSAP analizi yapılabilir (Reyna-Lopez ve ark, 1997; Salmon ve ark, 2008). MSAP analiz metodu kullanılarak *Hordeum vulgare* (Li ve ark, 2008), *Viola cazorlensis* (Herrera ve Bazaga, 2010), *Triticum aestivum* (Zhong ve ark, 2009) ve *Arabidopsis thaliana* (Cervera ve ark, 2002) gibi birçok kültür ve yabancı bitkide CCGG bölgelerindeki metilasyon varyasyonunun yapısı ve oranı hakkında bilgi elde edilmiştir. MSAP analiz metodu oldukça fazla avantaja sahiptir. Genom dizisi bilinmeyen canlılarda dahil olmak üzere model dışı sistemler üzerinde araştırma yapılmasına olanak sağlamaktadır.

5-metilsitozin ilk olarak 1925 yılında tüberkül basillerinin DNA'sından kristal bir pikrat olarak elde edildiğinde nükleik asidin bir bileşeni olarak rapor edilmiştir (Johnson ve Coghill, 1925). Metillenmiş DNA, başka teknikler kullanılarak tespit edilemese de 1950'de, birçok hayvan ve buğday DNA'sında metillenmiş sitozinin varlığı ve miktarı rapor edilmiştir (Vischer ve ark., 1949; Wyatt, 1950). Sonraki yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda 5-metilsitozin miktarının (metilleşme miktarının) şeker pancarı, eğrelti otu, yonca, lahana, çavdar, mısır, yerfıstığı, ayçiçeği ve pamukta yüksek seviyede bulunduğu rapor edilmiştir (Thomas ve Sherrat, 1956; Ergle ve Katterman, 1961). Hem bitkilerde hem hayvanlarda sitozinin esas olarak CG dinükleotit bölgelerinde metilleştiği rapor edilmiştir (Gruenbaum, 1981). Bununla birlikte, bazı bitki türlerinde bulunan yüksek miktarda 5-metilsitozin metilasyonunun CG dizileriyle sınırlı olmadığını ve sitozinin CNG'de (N= C,G, A,T) ve daha az miktarda CNN sekanslarında da metillendiğini gösterilmiştir (Gruenbaum, 1981).

Metiltransferazlar, sitozinin 5. karbonuna S- adenosyl-l- methionine metil grubunu ekleyerek sitozin metilasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark, 2018). Metiltransferazlar CG, CHG ve CHH bölgelerini metillemelerine göre 3 sınıfa ayrıldığı bildirilmiştir (Şekil 2.1) (Zhang ve ark, 2018). MET1 metiltransferaz, yeni sentezlenen DNA'yı metile ederek CG metilasyonunu sürdürürken, CHG (H; A, T veya C'yi temsil eder) metilasyonunu CMT3 (Chromomethlase 3) veya CMT2'nin sağladığı bildirilmiştir. CHH metilasyonu, genomik bölgeye bağlı olarak DRM2 (Domains Rearranged Methylase 2) veya CMT2 ile sağladığı saptanmıştır (Zhang ve ark, 2018). RdDM (RNA- directed DNA methylation) yoluyla DRM2, transpozonların kenarlarında bulunan tekrar dizileri üzerinde CHH metilasyonunu sürdürdüğü bildirilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bitkilerde DNA metilasyonunun düzenlenmesi (Zhang ve ark, 2018)

2.1. Farklı Bitki Türlerinde DNA Metilasyonunun Varyasyonları

Bugüne kadar, yosunlardan tahıllara, sebzelerden ağaçlara kadar birçok bitki türünde DNA metilasyonu çalışılmıştır. Metilom verileri olan 30'dan fazla bitki türü arasında, vasküler olmayan tek hücreli *Chlamydomonas reinhardtii* (yeşil algler)'in en düşük DNA metilasyonuna sahip olduğu (CG, CHG ve CHH sırasıyla (%5,4, %2,6 ve %2,5) rapor edilmiştir (Feng ve ark, 2010). Yapılan bilimsel çalışmalar tarla bitkilerinin genel olarak özellikle CG ve CHG bakımından yüksek seviyede DNA metilasyonuna sahip olduğunu göstermiştir (Bartels ve ark., 2018).

Canlılarda CG metilasyonu, CHG (H ; A,C, T) ve CHH metilasyonuna göre daha yüksek bir frekansta görülmektedir (Niederhurth ve ark., 2016; Takuno ve ark., 2016). Örneğin buğdaygillerde meydana gelen stozin metilasyonunun %50'sinin CG metilasyonu olduğu rapor edilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016). CHG ve CHH metilasyon seviyeleri, türler arasında CG metilasyonundan daha geniş ölçüde varyasyon göstermektedir. Örneğin, *B. vulgaris* metilasyonunun %81,2'i CHG ve %18,9'i CHH metilasyonu iken, *Eutrema salsugineum*'in metilasyonunun %9,3'ünün CHG metilasyonu, %38,2'sinin CG metilasyonu ve %6,1'inin ise CHH metilasyonu olduğu rapor edilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016). *Vitis vinifera* metilasyonunun %46,0'sının CG metilasyonu, %20,4'sinin CHG metilasyonu ve %1,2'si CHH metilasyonu olduğu bildirilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016). Türler arasında metilasyon tiplerinin geniş varyasyona sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Zemach ve ark., 2010; Feng ve ark., 2010; Takuno ve ark., 2016; An ve ark., 2017). Turpgillerde CG ve CHG metilasyonunu düşük iken CHH metilasyonunun yüksek olduğu, ancak bazı buğdaygil türlerinde ise CHH metilasyonunun bulunmadığı belirtilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016; Bartels ve ark., 2018). Cokus ve ark., (2008) *Arabidopsis* genomunun %24'ünün metillenmiş CG bölgesi, %6,7'sinin metillenmiş CHG bölgesi (H = A, C veya T) ve %1,7'sinin metillenmiş CHH bölgeleri içerdiğini, aynı zamanda *Arabidopsis* genomunda bulunan transpoze olabilen element (TEs) dizilerinin çoğunluğunun metilleştiğini rapor etmişlerdir.

2.2. Farklı Bitkilerin Organ ve Dokularında DNA Metilasyon Profilleri

Bilimsel çalışmalar; farklı türler, organlar, dokular ve hücreler arasında geniş bir DNA metilasyon varyasyonu olduğunu ortaya koymuştur (Bartels ve ark., 2018). Genom büyüklüğü ile DNA metilasyon seviyesi, genomun sahip olduğu GC içeriği ve kromatin yapısı arasında bugüne kadar olumsuz ve/veya olumlu bir ilişki rapor edilmemiştir. Ancak, *C. elegans*'ın genomunda DNA metilasyonunun görülmediği, *Drosophila melanogaster* genomunun çok düşük düzeyde metilasyon görüldüğü veya hiç görülmediği, bazı mantar türlerinde nispeten düşük metilasyon

seviyesinin tespit edildiği, angiosperm ve memelilerin ise nispeten yüksek metilasyona seviyesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Bartels ve ark., 2018).

Bitkilerin farklı organlarında bulunan metilasyon seviyesinde farklı olduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (Hsieh ve ark., 2009; Becker ve ark., 2011; Calarco ve ark., 2012; Ibarra ve ark., 2012; Lin ve ark., 2017; Ganguly ve ark., 2017). Örneğin, domates ve Arabidopsis gibi birçok türde yapılan bilimsel çalışmalarda kotiledonların bitki yaprakları, sürgünleri ve köklerine göre daha düşük bir DNA metilasyonun seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir (Messegue ve ark., 1991; Zluvova ve ark., 2001; Ruiz-Garcia ve ark., 2005). Şeftalide olgunlaşmamış sürgün apikal meristemin (SAM), olgun SAM ile karşılaştırıldığında daha düşük DNA metilasyonuna sahip olduğu rapor edilmiştir (Bitonti ve ark., 2002). Arabidopsis kök meristemin hücrelerinin metilleşme oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Kawakatsu ve ark., 2016). Çeltikte, CG ve CHG metilasyon seviyelerinin incelenen organlar arasında (embriyolar, sürgünler, kökler ve yapraklar) çok benzer olduğu, ancak CHH metilasyon seviyesinin embriyolardan genç sürgünlere ve köklere doğru yükseliş gösterdiği, olgun yapraklarda ise en yüksek seviyelere ulaştığı rapor edilmiştir (Zemach ve ark., 2010). Aynı araştırmacılar, çeltik embriyosunda saptanan üç tür metilasyon (CG, CHG, CHH) seviyesinin çeltik endospermde saptanan metilasyon seviyelerinden daha yüksek olduğunu, diğer bir deyişle endospermde bulunan metilasyon seviyesinin düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Arabidopsis bitkisinin yaprakları kullanılarak yapılan bir çalışmada, arabidopsisin yapraklarında %30.5 CG, %10.0 CHG ve %3.9 CHH metilasyon seviyesi bulunduğu rapor edilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016). Arabidopsis kullanılarak yapılan bir çalışmada CG metilasyon seviyesinin incelenen tüm bitki organlarında aynı seviyede olduğu ancak endospermde düşük bulunduğu rapor edilmiştir (Bartels ve ark., 2018). Çeltik yapraklarının ise CG'nin %58.4'ü, CHG'nin %31.0'ı ve CHH bölgesinin %5.1'inin metilasyona uğradığı belirtilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016). *Beta vulgaris* bitkisinin yapraklarının ise CG'nin %92.6, CHG'nin %81.2 ve CHH bölgesinin ise

%18.9'nin metilleştiği rapor edilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016; Bartels ve ark., 2018)

2.3. Buğdayda Metilasyon Çalışmaları

Venetsky ve ark (2015), İsrail'in 5 farklı ekolojik bölgesinden toplamış oldukları *Triticum dicoccoides* genotiplerinde kalıtsal metilasyona dayalı epigenetik varyasyonun yapısı ve kapsamı araştırdıkları bu çalışmada, Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) ve Transposon Metilasyon Polimorfizmi tekniklerini kullandıklarını, kalıtsal epigenetik varyasyonun değerlendirilmesini sağlamak için tüm genotipleri iki generasyon boyunca aynı şartlarda yetiştirdiklerini, TE'leri çevreleyen CCGG bölgeleri de dahil olmak üzere CCGG bölgelerinin metilasyon seviyesinin %46 ile %76 arasında değiştiğini, metilasyon modelinin genotipler arasında belirgin olarak farklı olduğunu, istatistiksel olarak anlamlı popülasyona özgü metilasyon modelini saptadıklarını, metilasyona dayalı epigenetik çeşitliliğin eko-coğrafik olarak düzenlenmiş olabileceğini ve kısmen iklim ve toprak faktörleri tarafından belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Kaur ve ark (2018), yaptıkları çalışmada metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm (MSAP) yöntemini kullanarak kuraklığa dayanıklı ve dayanıksız iki buğday genotipinde su stresinin metilleşmeye etkisini belirlemek amacıyla metilasyon modellerinin analizini yaptıkları bu çalışmada, kuraklığa dayanıklı genotip ile kuraklığa dayanıksız genotip karşılaştırıldığında kuraklığa dayanıklı genotipte demetilasyonun yüksek olduğunu, köklerde ve yapraklarda metilasyon seviyelerinin farklı olmasından dolayı metilasyonun dokuya özgü olduğunu, kuraklığa toleranslı ve kuraklığa hassas çeşitler arasında stabil olarak DNA metilasyon farklılıkları olan birkaç bölge bulunduğunu bildirerek genotipe özel epigenetik markörler tanımladıklarını rapor etmişlerdir.

Zhong ve ark (2009), yaptıkları çalışmada tuza toleransı farklı olan iki ekmeklik buğday çeşidinde (tuza toleranslı Dekang-961 ve hassas Lumai-15) tuz

stresi ile ortaya çıkan DNA metilasyon değişikliğini MSAP tekniğini kullanarak incelediklerini, Dekang-961 çeşidinin CCGG bölgesinin Lumai-15 çeşidine göre fazla metillendiğini, NaCl stresinin hem Dekang-961 hem de Lumai-15 çeşitlerinde CCGG bölgelerinin demetilasyonuna ve bazı bölgelerin ise hipermetilasyonuna neden olduğunu, her iki çeşitte de tuz stresinin DNA metilasyonunda belirgin bir değişikliğe neden olduğunu, metilasyon seviyesinin uygulanan NaCl dozuna göre değiştiğini, bu değişikliklerin tuz stresi altında bitkilerin adaptasyonu için bir mekanizma olabileceğini rapor etmişlerdir.

Yaakov ve Kashkush (2011), yaptıkları çalışmada yeni sentezlenen alloheksaploid buğdayın ilk dört generasyonunda üç adet TE (Transpoze olabilen element) ailesini (Balduin, Apollo ve Thalos) çevreleyen CCGG bölgelerinin metilasyon modellerini transpozon metilasyon görüntüleme tekniğini (TMD) kullanarak incelediklerini, üç TE ailesini çevreleyen CCGG bölgelerinin %54 oranında hipermetilasyonun gösterdiğini, yeni sentezlenen buğday alloheksaploidinin ilk dört generasyonunda metilasyon modellerinde değişiklikler belirlendiğini, en fazla metilleşmenin (%70) yeniden sentezlenen alloheksaploid buğdayının ilk iki generasyonunda görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Song ve ark (2018), Xinong 1376 ekmeklik buğda çeşidinin albino mutantındaki (*Triticum aestivum* L.) yaprak rengini düzenleyen epigenetik mekanizmalar araştırmak için yaptıkları çalışmada, Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) analizi ile epigenetik değişiklikleri tespit ettiklerini, beyaz veya kırmızı yaprakların daha yüksek sitozin metilasyon seviyelerine sahip olduğunu, MSAP analizi sonucunda 150 adet DNA parçasını sekansladıklarını, sekanslanan bu 150 adet DNA fragmentinin BLAST analizi sonucunda 77 adedinin kodlanan bölgelerde bulunduğunu, sekans bigilerinin homolojisinin araştırılması sonucunda bu dizilerin çoğunluğunun sinyal iletimi, transkripsiyon düzenlemesi, transkripsiyon sonrası düzenleme, DNA modifikasyonu ve onarımı, taşıma, selüloz biyosentezi, fotosentez, protein

ubikitinasyonu, stres yanıtları ve retropozisyon gibi işlemlerde yer aldığını bildirmişlerdir.

Mengi ve ark (2012), MSAP tekniğini kullanarak buğday tohumlarının çimlenmesi sırasında DNA metilasyon dinamikleri incelemek için yaptıkları çalışmada, kuru tohumlar ile çimlendirilmiş tohumların embriyo ve endosperm dokularında genomik DNA'nın MSAP profillerini incelediklerini, sitozin metilasyonunda belirgin değişiklikleri tespit ettiklerini, farklı dokulardaki MSAP profillerini karşılaştırmaları sonucunda kuru tohumlardaki metilasyon seviyesinin yüksek bulunduğunu, metilasyonun her iki grupta meydana gelmesine rağmen demetilasyonun çimlenmekte olan buğday tohumlarında daha baskın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, MSAP analizi sonucunda, 16 adet polimorfik DNA fragmentini klonlayıp sekansladıklarını, sekanslanan bu 16 adet DNA fragmentinden 9 adedinin CCGG bölgesi içerdiğini, BLAST analizi sonucunda klonlanmış dizilerin 4 adedinin kodlanan bölgelerde bulunduğunu, 16 adet DNA fragmentinden üçünün retrotranspozonlara homolog olduğunu rapor etmişlerdir.

2.4. Diğer Bitkilerde Metilasyon Çalışmaları

Li ve ark (2008), MSAP tekniğini kullanarak çok yıllık bir yabancı arpa türü olan *Hordeum brevisubulatum* popülasyonları içinde ve popülasyonlar arasında DNA metilasyon çeşitliliğini inceledikleri çalışmada, Kuzeydoğu Çin'deki Songnen Prairie'de dağılım gösteren *H. brevisubulatum*'un dört doğal popülasyonunu temsil eden 24 genotipi incelediklerini, bir popülasyondaki bireyler arasında DNA metilasyon modellerinde yüksek polimorfizm seviyesinin tespit edildiğini, dört popülasyon arasında ortaya çıkan metilasyon modellerinde (metilasyona dayalı epigenetik popülasyon yapısı) popülasyonlar arası farklılıkların bulunduğunu, *Hordeum brevisubulatum* popülasyonları arasında DNA metilasyon modellerinde polimorfizmi tespit etmek için MSAP tekniğinin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Li ve ark (2009), yaptıkları çalışmada pamuk (*Gossypium hirsutum L.*) genomundaki sitozin metilasyonunu ve tuz stresi altında sitozin metilasyon modelindeki değişiklikleri incelemek amacıyla kendinlenmiş pamuk hattı olan YZ1'in çimlendirilmiş tohumlarını 3 hafta boyunca 100 ila 200 mmol NaCl çözeltisine maruz bıraktıklarını ve gelişimlerini gözlemlediklerini, 100 mmol NaCl'nin bitki boyunu ve pamuk fidelerinin kök uzunluğunu arttırdığını, 200 mmol NaCl'nin bitki büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığını, NaCl konsantrasyonu 100 ila 200 mmol arasında arttırıldığında, yan köklerin sayısının tuz stresi ile büyük ölçüde inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirdikleri örnekleri 3 hafta sonra hasat ettiklerini ve bu örneklerde yetiştirilen bitki örnekleri 3 hafta sonra hasat ettiklerini, genomik DNA ve toplam RNA izolasyonu yaptıklarını, metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm (MSAP) yöntemi kullanarak DNA metilasyon seviyesini tanımladıklarını, DNA metilasyon seviyesinin tuz konsantrasyonu arttıkça % 41.2'den % 34.5'e düştüğünü, uygulanan tuz konsantrasyonu ile DNA metilasyon düzeyi arasında anlamlı derecede ($r = -0.986$, $P < 0.05$) negatif korelasyon bulunduğu, 100, 150 ve 200 mmol NaCl çözeltisine maruz bırakılmış genotiplerde, kontrol DNA'ya (0 mmol NaCl) göre metilasyon oranlarının sırasıyla %6.4, %7.6 ve %11.3, demetilasyon oranlarının ise sırasıyla %12.7, %11.1 ve %8.2 olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark (2016), pamukta tuz toleransı ve heterozisin DNA metilasyon seviyesini ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada, bir adet melez pamuk çeşidi olan CCRI 29 ve onun iki anacını materyal olarak kullandıklarını, DNA metilasyon seviyesini belirlemek için MSAP yöntemini kullandıkları bildirmişlerdir. Araştırmacılar, melez CCRI 29 çeşidinin her iki anaca göre daha yüksek tuz toleransı seviyesine sahip olduğunu, tuz stresi altında melez CCRI 29'daki toplam DNA metilasyon seviyesinin önemli ölçüde artarken iki ebeveynin tuz stresi ile kontrolleri arasında önemli bir değişiklik gözlemlenmediğini, melez CCRI29'daki hipermetilasyonun hipometilasyondan önemli ölçüde daha yüksek olarak

bulduklarını, pamuk genomunda toplam DNA metilasyon seviyesinin ve ayrıca farklı metilasyon tiplerinin artmasının, metilasyonun pamuğun tuza toleransında önemli bir rol oynadığını, hem hipometilasyonun hem de hipermetilasyonun farklı genler üzerinde meydana geldiğini, bazı genlerin tuz stresinden sonra aynı metilasyon seviyesini koruduğunu, bunun da pamukta tuz stresine yanıt verirken karmaşık gen ekspresyon değişikliklerini ortaya çıkardığını rapor etmişlerdir. Melez CCRI 29'daki çoğu sitozin metilasyon bölgesinin ebeveynlerden en az biriyle aynı statüyü paylaşmasına rağmen, melez CCRI29'da hem kontrol hem de tuz stresi altındaki ebeveynlere kıyasla hipometilasyonun hipermetilasyondan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve bunun sonucu olarak demetilasyonun pamuk melezinde heterozisi açıklayacak bir mekanizma olabileceğini bildirmişlerdir.

Tan (2010), mısır fidelerinde PEG (Polyethylene glycol) ve NaCl muamelesi ile ortaya çıkan metilasyon değişikliğini saptamak için yaptığı çalışmada MSAP tekniğini kullandığını, stresle ilişkili 25 adet DNA fragmentini klonladığını ve sekansladığını, iki adet fragmentin (LP166 ve LPS911) GagePol Retrotranspozon protein genlerine homolog bulunduğunu ve ozmotik stresin retrotranspozonların metilasyonunu arttırdığını bildirmiştir.

Ashikawa (2001), çeltik genomunda CCGG sekansının metilasyon durumunu metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm(MSAP) tekniği kullanılarak araştırdığı bir çalışmada, CpG bölgesinin metilasyon durumunun iki sınıfa ayrıldığını, birinci sınıfta CpG bölgesindeki metilasyon durumunun tüm çeltik çeşitleri arasında benzer bulunurken, ikinci sınıf CpG bölgesindeki metilasyon durumunun çeşitlere göre farklılık gösterdiğini, iki sınıf arasındaki metilasyon polimorfizminin görülme sıklığının genetik uzaklıkla ilişkili olmadığını rapor etmiştir.

Ruiz-Garcı'a ve ark (2005), yaptıkları çalışmada Arabidopsis gelişimi boyunca DNA metilasyonunun stabilitesini analiz etmek için Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP) yöntemini kullandıklarını, yaptıkları çalışma

sonucunda kotiledonlardan vejetatif organlara ve üreme organlarına kadar ilerleyen bir DNA metilasyon eğilimi saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Salmon ve ark (2008), yaptıkları çalışmada yüksek düzeyde fenotipik değişkenlik gösteren bir tür olan *Brassica oleracea*'nın genom metilasyonunun derecesini değerlendirmek ve metilasyon polimorfizmini fenotipik değişkenlikle ilişkilendirmek için metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) tekniğini 30 *B. oleracea* popülasyonunda ve tür çeşitliliğini temsil eden hatlarda kullandıklarını, bu türde yüksek bir metilasyon oranının ortaya çıktığını (%52-60 aralığında), MSAP fragmentlerinin % 30-41'inin *MspI* tarafından ve %17-27'sinin ise *HpaII* tarafından kesildiğini, metillenmiş fragmentlerin çoğunun (%95) popülasyonlar ve hatlar arasında polimorfik olduğunu rapor etmişlerdir.

Portis ve ark (2004), biber tohumlarının çimlenmesi sırasında MSAP tekniğini kullanarak sitozin metilasyonunun durumunu tespit etmeye çalıştıkları bu çalışmada, kuru tohumların ve çimlenme aşamasındaki tohumların embriyo dokularından elde edilen genomik DNA'nın MSAP profillerinde belirgin değişiklikler tespit edildiğini, kuru tohumlarda saptanmayan fragmentlerin çimlenme sırasında belirli bir aşamada hem *EcoRI/HpaII* hem de *EcoRI/MspI* ile kesimden sonra mevcut olduğunu, kuru tohumlarda her iki enzim ile kesim sonrasında mevcut bazı fragmentlerin çimlenme sırasında saptanmadığını, demetilasyon olaylarının çimlenme sırasında transkripsiyonel aktivasyon için meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Sa' ez-Laguna ve ark (2014), çok düşük seviyede genetik çeşitlilik ve önemli derecede fenotipik plastisite derecesi ile karakterize edilen *Pinus pinea*'da sitozin metilasyon modelinin genom çapında analizi ile ilgili yaptıkları bu çalışmada, İspanyol *P. pinea* popülasyonlarından vejetatif olarak çoğaltılmış ağaçların DNA metilasyon profillerini Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP) tekniği ile analiz ettiklerini, sonuçlara göre yüksek derecede sitozin metilasyonu (skorlanan tüm DNA parçalarının %64,36'sı) saptandığını, yüksek derecede epigenetik çeşitlilik tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Transpoze olabilen element dizilerinin (TE'ler) bitkilerde diğer genlere kıyasla daha fazla hipermetilasyona uğradığı rapor edilmiştir (Kumar ve Benetzen, 1999; Rabinowicz ve ark, 2003; Madlug ve Comai, 2004). Yapılan çalışmalarda, metilasyonun tekrarlayan DNA'larda yoğunlukla görülmesi, transpozonların (Transposable Elements- TEs) susturulmasının DNA metilasyonunun birincil görevi olduğunun düşünülmesine neden olmuştur (Gehring ve Henikoff, 2008). Ökaryotik evrimin çok erken safhalarında DNA metilasyonunun ortak atalarda var olabileceği rapor edilmiştir (Zemach ve ark, 2010). DNA metilasyonu ökaryotik evrim sırasındaki farklı türlerin oluşumunda doğal varyasyonların ayrılmaz bir parçası olduğu bildirilmiştir (Bartels ve ark, 2018). DNA metilasyonu evrimsel süreçte karmaşık yol izlemiştir. DNA metilasyonunun önemli etkilerinden biri transpoze olabilen elementlerin (TE) genişlemesi ve daralmasından sonra proliferasyonunu sınırlandırmasıdır. TE'lerde yüksek metilasyon seviyelerinin anlamı, çoğu bitki türünde TE'leri susturmaktır. Transpoze olabilen elementleri (TE) kontrol altında tutmasının yanında epigenetik gen düzenlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin mısır, dizilenmiş metilomlar arasında en büyük genomu olan bir türdür. Büyük genom boyutuna rağmen, genlerin çoğu DNA metilasyonunun doğal hedefi olan TE'ler (transpoze olabilen elementler) ile ilişkilidir. Bu, mısırdaki neden bu kadar yüksek metilasyon olduğunu açıklar (CG, CHG ve CHH'de sırasıyla %86, %74 ve %5). TE'lerdeki bu metilasyon bölgelerinin milyonlarca yıllık evrimden sonra bazı spesifik dokularda veya hücrelerde gen düzenlemesinin ayrılmaz bir parçası haline geldiği düşünülmektedir. DNA metilasyonu, patojenler ve abiyotik stresler gibi farklı çevresel uyaranlar tarafından değiştirilebilir. Bitkiler bu dinamik geçici metilasyon değişiklikleri evrim sırasında korumayabilir. Farklı bitki türleri aynı veya benzer DNA metilasyon modellerine sahip olmadığı bilinmektedir. Çünkü farklı DNA metiltransferazlara (MET1, CMT2, CMT3, DRM1 ve DRM2) ve demetilazlara (DME, ROS1, DML2 ve DML3) sahiptirler. Anjiyospermilerdeki DNA metilasyon

modellerinin kompleks ve dinamik yapıda, evrim sırasında epigenomun ayrılmaz bir parçası olduğu ileri sürülmüştür (Bartels ve ark., 2018)





3. MATERYAL ve METOD**3.1. Bitki Materyali**

Bu çalışmada “Verimli Hilal” bölgesinde toplanmış olan 87 adet yabancı gernik genotipi ile 3 adet makarnalık buğday çeşidi (Svevo, Karakılçık ve Çeşit4) materyal kullanılmıştır. Yabancı gernik genotiplerinin 15 adedi İsrail, 49 adedi Türkiye, 10 adedi Suriye, 13 adedi Lübnan orjinlidir. Kullanılan bitki materyaline ait detaylı bilgi Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.’de verilmiştir. Yabancı gernik popülasyonları ve makarnalık buğday çeşitleri 2018-2019 yetiştirme yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama Alanına 15 Kasım 2018 tarihinde el ile ekilmiştir (Şekil 3.1).

Tarla denemesi, tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Genotipler 1m uzunluğundaki sıralara, sıra üzeri 10 cm ve sıra arası 50 cm olacak şekilde elle ekilmiştir. Dekara toplam 16 kg saf N ve 8 kg P₂O₅ gelecek şekilde gübreleme yapılmıştır. Ekimden önce dekara 8 kg/da saf N ve 8 kg P₂O₅ gelecek şekilde 20-20-0 kompoze gübre verilerek azotun yarısı ve fosforun tamamı toprağa atılmıştır. Azotun diğer yarısı ise kardeşlenme-sapa kalkma dönemlerinde iki eşit kısımda üre gübresi olarak verilmiştir. Yabancı ot kontrolü elle yapılmıştır.

Çizelge 3.1. İncelenen 87 yabani gernik genotipine ait toplanma yeri ve bölgesi

Genotip No	Toplandığı Ülke	Toplanma Yeri
TR1	TÜRKİYE	Kilis'in 37 km kuzeydoğusundan Gaziantep'e doğru
TR2	TÜRKİYE	Ovadağ'ın 12 km kuzeybatısından Pirinçlik'e doğru
TR3	TÜRKİYE	Siverek'in 20.2 km doğusu
TR4	TÜRKİYE	Narlı'nın 39 km güneydoğusu
TR5	TÜRKİYE	Kilis'in 37 km kuzeydoğusundan Gaziantep'e doğru
IS6	İSRAİL	Taiba
TR7	TÜRKİYE	Siverek Karakeçi yolu Azemi Köyü
IS8	İSRAİL	Taiba
TR9	TÜRKİYE	Siverek'in 4 km güneyinde Karakeçili yolu
TR10	TÜRKİYE	Diyarbakır'ın 25 km güney batısı
IS11	İSRAİL	BatShelemo
TR12	TÜRKİYE	Diyarbakır karayolu ve Karacadağ kavşağının 3 km güneybatısı
TR13	TÜRKİYE	Diyarbakır'ın 24 km güneybatısından Ovadağ'a doğru
TR14	TÜRKİYE	Diyarbakır'ın 50 km kuzey batısı
TR15	TÜRKİYE	Siverek Karakeçi yolu Azemi Köyü
LB16	LÜBNAN	Kfarkouk ve Aiha arasında
TR17	TÜRKİYE	Siverek Karakeçi yolu Azemi Köyü
TR18	TÜRKİYE	Karacadağ'ın 20 km doğusu
LB19	LÜBNAN	Aiha'dan 1 km sonra Kfarkouk ve Aiha arasında
TR20	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 33.6 km batısı
LB21	LÜBNAN	Rashaya yakınları
TR22	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 52.6 km batısı
TR23	TÜRKİYE	Ovadağ'ın 18.5 km kuzeybatısından Pirinçlik'e doğru
TR24	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 44 km batısı
TR25	TÜRKİYE	Karabahçe'nin 37.9 km güneybatısı
LB26	LÜBNAN	Rashaya yakınları
TR27	TÜRKİYE	Ovadağ'ın 18.5 km kuzeybatısından Pirinçlik'e doğru
TR28	TÜRKİYE	Karabahçe'nin 37.9 km güneybatısı
IS29	İSRAİL	Bat Shelemo
TR30	TÜRKİYE	Siverek'in 20.2 km doğusu
TR31	TÜRKİYE	Kahramanmaraş'ın 112 km kuzeybatısı
TR32	TÜRKİYE	Kilis'in 37 km kuzeydoğusundan Gaziantep'e doğru
SY33	SURİYE	Atareb'den 7 km Qalaat Saman'a doğru, Aleppo
TR35	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 33.6 km batısı
SY36	SURİYE	Kazrin
TR37	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 32.6 km batısı
TR38	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 44 km batısı
TR39	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 52 km batısı
IS40	İSRAİL	En haShofet and Daliyya arasında

Çizelge 3.1'in devamı.

Genotip No	Toplandığı Ülke	Toplanma Yeri
TR41	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 36.2 km batısı
SY42	SURİYE	Kazrin
TR43	TÜRKİYE	Diyarbakır'ın 24 km güneybatısından Ovadağ'a doğru
TR44	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 36.2 km batısı
TR45	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 36.2 km batısı
TR46	TÜRKİYE	Narlı'nın 34 km güneydoğusu
LB47	LÜBNAN	Mt.Hermon
TR48	TÜRKİYE	Kilis'in 37 km kuzeydoğusundan Gaziantep'e doğru
IS49	İSRAİL	Afula-Tiberias
SY50	SURİYE	Damaskus
LB51	LÜBNAN	Kfarkouk ve Aiha arasında
IS52	İSRAİL	Afula-Tiberias
TR53	TÜRKİYE	Narlı'nın 34 km güneydoğusu
Zavitan	İSRAİL	-----
TR55	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 52 km batısı
TR56	TÜRKİYE	Karakeçi çayırı
TR57	TÜRKİYE	Karabahçe'nin 41.6 km güneybatısı
SY58	SURİYE	Sweida'nın 32 km Sale ve Malah arasında
SY59	SURİYE	Nawa
SY60	SURİYE	Aleppo-Afrin'den sonra Aleppo-Abeen yolu
LB61	LÜBNAN	Sahlet'in yukarısında Aiha-Kfarkouk
SY62	SURİYE	Sweida
IS63	İSRAİL	Bet Me'ir
IS64	İSRAİL	Bet Me'ir
TR65	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 51 km batısı
TR67	TÜRKİYE	Kilis'in 37 km kuzeydoğusundan Gaziantep'e doğru
TR68	TÜRKİYE	Siir-Pervari yolu üzeri Umurlu Köyü'nün 5km doğusu
IS69	İSRAİL	Rosh Pinna'nın 1-2 km güneyinden Safad'a doğru
LB70	LÜBNAN	Sahlet'in yukarısında Aiha-Kfarkouk
LB71	LÜBNAN	Sahlet'in yukarısında Aiha-Kfarkouk
LB72	LÜBNAN	Hermon Dağı
IS73	İSRAİL	Rosh Pinna'nın 1-2 km güneyinden Safad'a doğru
TR74	TÜRKİYE	Kozluk yolunun 6.8km kuzeyinde Gümüşörgü'ye doğru
SY75	SURİYE	Dera
TR76	TÜRKİYE	İdil'den 34.9 km batıya, Mardin
TR77	TÜRKİYE	Ovadağ'ın 12.9 km kuzeybatısından Pirinçlik'e doğru
SY79	SURİYE	Krayya
IS80	İSRAİL	Rosh Piina yolu üzeri Safad şehir sınırı
LB81	LÜBNAN	Hermon Dağı
TR82	TÜRKİYE	Karakeçi Yolu

Çizelge 3.1'in devamı.

Genotip No	Toplandığı Ülke	Toplanma Yeri
IS83	İSRAİL	Rosh Piina yolu üzeri Safad şehir sınırı
IS84	İSRAİL	Kokhav haShahar
TR85	TÜRKİYE	Karabahçe'nin 41.6 km güneybatısı
LB86	LÜBNAN	Hermon Dağı
TR88	TÜRKİYE	Siirt-Eruh yolu üzeri üzümlik köyünün 6 km batısı
TR89	TÜRKİYE	Karacadağ'da Diyarbakır'ın 36.2 km batısı
LB90	LÜBNAN	Ainata ve Ain Harch arası



Şekil 3.1. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama Alanına ekilen yabancı gernik genotipleri

3.2. DNA İzolasyonu

Araştırmada kullanılan 90 buğday genotipin her birinden tek bitki olacak şekilde genç yaprak örnekleri metilasyon değişikliğine karşı eş zamanlı olarak hasat edilmiş, hasat edilen örnekler laboratuvara getirilmiş ve doğrudan DNA izolasyonuna başlanmıştır. Yaprak örnekleri 23 Mart 2019 tarihinde saat 08:45-

09:15 aralığında hasat edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu için CTAB protokolü kullanılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). Bu yöntemde; yaş yaprak örneklerinin her birinden 0.8 g tartılarak havan içerisinde sıvı azot kullanılarak öğütülmüştür (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Yaprak örneklerinin havanda öğütülmesi

Öğütülmüş yaprak örnekleri bulunan tüpler içerisine, 0.9 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na₂S₂O₅) ilave edilmiş ve elle birkaç defa hafifçe çalkalanmıştır. Örnekler sıcaklığı 65°C olan su banyosuna yerleştirilmiştir. Örnekler her 10 dakikada bir hafifçe çalkalanmak suretiyle 1 saat 15 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir.

Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 15 dk soğumaya bırakılmış ve daha sonra tüplerin içerisine ekstraksiyon tampon çözeltisi ile eşit oranda (0.9 ml), kloroform: isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir. Tüpler yavaşça ve sürekli olarak 15 dakika boyunca çalkalanmıştır. Tüpler 15 dakika boyunca 14000 rpm devirde santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra her tüp içerisindeki sıvı iki faz haline gelmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kloroform isoamyl alkol eklenmesinin ardından üst faz görüntüsü ve fazın yeni tüp içine aktarımı

Santrifüj olan örneklerin üst fazları alınarak (yaklaşık 0.7 ml) 1.5 ml'lik yeni bir tüpe aktarılmış, yeni tüpün içerisine soğuk (-25°C 'de bekletilmiş) isopropanol (0.65 ml) ilavesi yapılmıştır. Tüpler çok yavaş bir şekilde pellet görülünceye kadar birkaç defa çalkalanmıştır.



Şekil 3.4. İzopropanol eklenerek elde edilen DNA örneği ve üst faz dökülerek kurutmaya bırakılan tüpler

Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tüp içerisindeki DNA'nın çökmesi sağlanmış ve isopropanol tüpten boşaltılmıştır. Daha sonra tüpün

içerisine, içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan %76'lık etanol'den 0.60 ml ilave edilmiş ve tüpler 30 dakika çalkalandıktan sonra 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst faz dökülerek gece boyunca doğal olarak kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan DNA'nın üzerine 500 µl ultra saf su (ddH₂O) eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirilmiş ve çözdürülen DNA örnekleri -25°C saklanmıştır.

3.2.1. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin kantitatif miktarı ve kalitesi DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer cihazı ile ölçülmüştür. DNA miktarı 400ng/µl ile 1000ng/µl arasında değişmektedir. Ayrıca 260/280 ve 260/230 değerleri de kontrol edilmiştir (Şekil 3.5.).



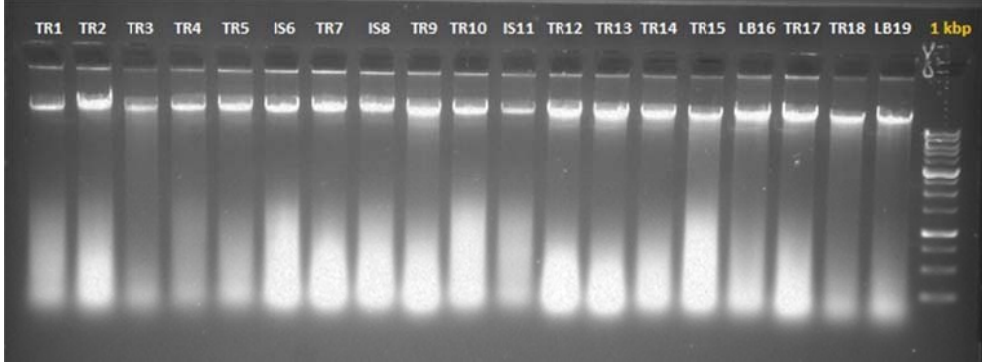
Şekil 3.5. DNA örneklerinin kantitatif miktarı ve kalitesi DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer cihazı ile ölçülmesi.

DNA'nın kalitatif analizi için 4 µl DNA 0.5 ml'lik tüplere konulmuş ve bunun üzerine 2 µl Loading Dye ve 6 µl ultra saf su eklenerek toplam hacim 12 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 12 µl alınarak 0.5X TAE solüsyonu

içerisinde bulunan önceden hazırlanmış %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve agaroz jele yüklenen bu örnekler 100 voltta 40 dakika koşturulmuştur. Kontrolü sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 1 kbp ladder DNA yüklenmiştir. Agaroz jeldeki DNA örnekleri ultraviyole transilluminatör yardımıyla görüntülenmiş, daha sonra ultraviyale jel dökümantasyon sisteminde görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 3.6.). Bu işlemler sonucunda DNA miktarı 100ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.6. DNA örneklerinin kalitatif analizi için kullanılan transilluminatör ve ultraviyale jel dökümantasyon sistemi



Şekil 3.7. DNA'nın kalitatif analizi için agaroz jel görüntüsü

3.3. MSAP (Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm) Analizi

MSAP yöntemi, Vos ve ark, (1995)'nin geliştirdiği AFLP (Standart Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) tekniğinin değiştirilmiş versiyonudur. MASP tekniği Reyna-Lopez ve ark, (1997) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte kesici enzim olarak *HpaII* ve *MspI* kullanılır. Her iki enzimde metillenmemiş CCGG bölgelerini keser. *HpaII* DNA'nın çift zincirinde bir yada iki sitozinin metilasyonuna ($^mC^mCGG$, C^mCGG , mCCGG) karşı duyarlılığından dolayı kesim yapmazken, *MspI* iç sitozinin metillenmesi (C^mCGG) durumunda kesim yapar (Çizelge 3.2.). Dıştaki sitozinin yarı metilasyonu durumunda, yani sadece tek zincirde dışta kalan sitozin metillendiğinde *HpaII* kesim yapabilirken *MspI* enzimi kesim yapamaz (Shaked ve ark., 2001).

Çizelge 3.2. *HpaII/MspI* kesim enzimlerinin CpG bölgelerinde sitozin metilasyonuna duyarlılıklarının şematik gösterimi

Metilasyon tipi	Metilleşme durumu			<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
Tip 1	CCGG GGCC			+	+
Tip 2	^m CCGG GGCC			+	-
Tip 3	C ^m CG G G GC ^m C	C ^m CG G G GC C		-	+
Tip 4	^m C ^m CGG G G C ^m C ^m	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CG G G GCC	-	-

+:Enzim kesim yapar; -:Enzim kesim yapmaz; Tip 1: Metilasyon durumu yok; Tip 2: Dış sitozin yarı metilasyonu; Tip 3: İç sitozin metilasyonu veya yarı metilasyonu; Tip 4: Her iki sitozin metilasyonu, dış sitozin metilasyonu veya her iki sitozin yarı metilasyonu

MSAP analizi için Reyna-Lopez ve ark,(1997)'nın geliştirdiği metot kullanılmıştır. MSAP reaksiyonlarında ön selektif PCR aşamasında 1 seçici nükleotit içeren *EcoRI* primeri olarak *EcoRI*+A ve seçici nükleotit içermeyen *HpaII/MspI* primerleri kullanılmıştır. Seçici PCR aşamasında 3 seçici nükleotid içeren floresan boylarla etiketli *EcoRI* primerleri ve 4 seçici nükleotit içeren etiketsiz *HpaII/MspI* primerlerinin kombinasyonu kullanılmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. MSAP için kullanılan adaptör ve tüm primerlerin listesi

Primer/		
Adaptör	EcoR I (E)	Hpa II/Msp I (H/M)
Adaptör1	CTCGTAGACTGCGTACC	GATCATGAGTCCTGCT
Adaptör2	AATTGGTACGCAGTCTAC	CGAGCAGGACTCATGA
Ön Selektif Primer		
	GACTGCGTACCAATTC+A	ATCATGAGTCCTGCTCGG
Selektif Primerler		
	GACTGCGTACCAATTC+ ACT	ATCATGAGTCCTGCTCGG+ TCAG
	GACTGCGTACCAATTC+ AGC	
	GACTGCGTACCAATTC+ ACG	

3.3.1. Adaptörlerin Hazırlanması

Adaptörler, konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde 100 µl'lik stoklar halinde hazırlanmıştır. *EcoRI*-Adaptör1, *EcoRI*-Adaptör2, *HpaII/MspI*-Adaptör1, *HpaII/MspI*-Adaptör2 tek zincirli oligonükleotid dizileri ilk önce seyreltilerek adaptör karışımını hazırlamak için 1 µg/µl konsantrasyona sahip stok haline getirilmiştir.

Tek zincirli *EcoRI* adaptörlerinden 180 µl'lik adaptör karışımı hazırlanmıştır. Bu işlem için 5.1 µl stok *EcoRI*-Adaptör1 0.2 ml'lik pcr tüpüne eklenmiştir. Üzerine 4.5 µl stok *EcoRI*-Adaptör2 eklenmiştir. 170.4 µl ultra saf su eklenerek hacim 180 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tek zincirli *HpaII/MspI* adaptörlerinden 180 µl'lik adaptör karışımı hazırlanmıştır. Bu işlem için 45 µl stok *HpaII/MspI*-Adaptör1 0.2 ml'lik PCR tüpüne eklenmiştir. Üzerine 45 µl stok *HpaII/MspI*-Adaptör2 eklenmiştir. 90 µl ultra saf su eklenerek hacim 180 µl'ye tamamlanmıştır.

Adaptör karışımları 95°C'de 5 dakika boyunca PCR cihazında inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından adaptör karışımları PCR tüplerinden 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Bu işlem ile tek zincirli *EcoRI* ve *HpaII/MspI* oligonükleotidleri dimer yapısı oluşturarak çift zincirli *EcoRI* ve *HpaII/MspI* adaptörü haline getirilmiştir. Bu reaksiyonlar Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonunda adaptör olarak kullanılmak üzere -20 °C'de derecede saklanmıştır.

3.3.2. Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonu

Restriksiyon ve Ligasyon reaksiyonu tek bir tüp içerisinde bir arada gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon ile restriksiyon enzimleri genomik DNA'yı kendilerine özgü bölgelerden kesmiş, aynı reaksiyon içerisinde kesilen bölgelere özgü adaptörlerin (*EcoRI* enzimi için *EcoRI* adaptörü, *HpaII/MspI* enzimleri için *HpaII/MspI* adaptörleri) ligasyonu sağlanmıştır. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu

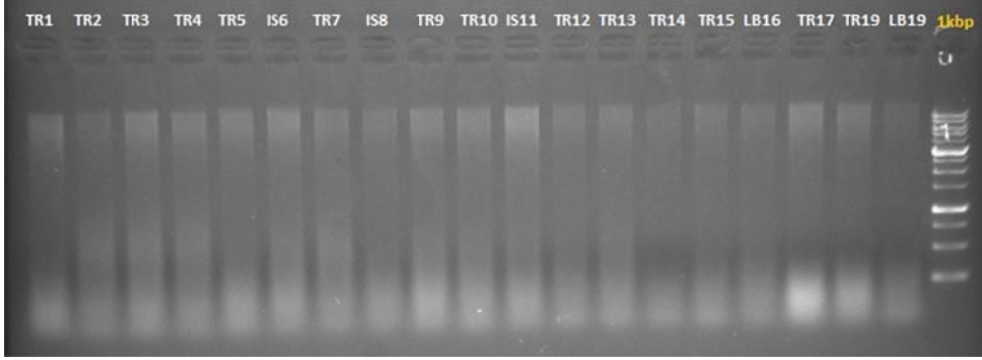
hacmi 10 µl olarak hazırlanmıştır. Reaksiyon 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisinde gerçekleştirilmiştir.

MspI için Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu; 1 µl 10X DNA ligaz buffer, 1 µl 0.5 M NaCl, 1 µl *HpaII/MspI* Adaptörü, 1 µl *EcorI* adaptörü, 0.1 µl *MspI* restriksiyon enzimi(20000U/ml), 0.1 µl *EcorI* restriksiyon enzimi(20000U/ml), 0.3 µl *T4 DNA Ligaz*(400000u/ml), 4 µl genomik DNA ve 1.5 µl ultra saf su içermektedir. *HpaII* için Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu; 1 µl 10X DNA ligaz buffer, 1 µl 0.5 M NaCl, 1 µl *HpaII/MspI* Adaptörü, 1 µl *EcorI* adaptörü, 0.2 µl *HpaII* restriksiyon enzimi(10000U/ml), 0.1 µl *EcorI* restriksiyon enzimi(20000U/ml), 0.3 µl *T4 DNA Ligaz* (400000u/ml), 4 µl genomik DNA ve 1.4 µl ultra saf su içermektedir.

90 DNA örneği ve negatif kontroller için restriksiyon/ligasyon karışımı hazırlanmış ve tüplere 6 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Üzerine 4 µl genomik DNA eklenerek pipetleme yöntemiyle karıştırılmıştır. Negatif kontroller için DNA yerine 4 µl ultra saf su kullanılmıştır.

Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu inkübatör içerisinde 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler içerisine 90 µl ultra saf su eklenerek seyreltilmiştir.

Seyreltilmiş reaksiyonun her birinden kontrol için 10 µl alınarak %0.8'lik agaroz jel içerisindeki kuyucuklara yüklenmiş ve 40 dakika boyunca koşurulmuştur (Şekil 3.8). Kontrolü sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 1 kbp ladder DNA yüklenmiştir. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonları ön selektif PCR aşaması için -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.8. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonlarının %0.8'lik agaroz jelde kontrolü

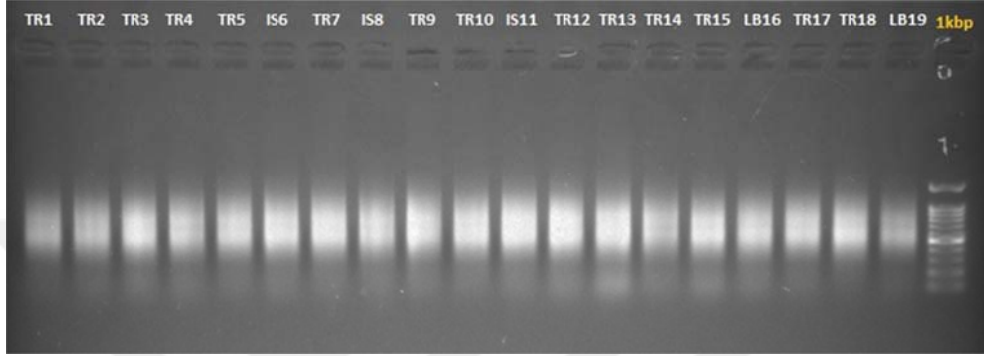
3.3.3. Ön Selektif PCR (Preamplifikasyon) Aşaması

Çalışmada kullanılan ön selektif PCR amplifikasyonu aşaması için reaksiyonun hacmi 20 µl olarak hazırlanmıştır. Ön selektif PCR reaksiyonu; 8.9 µl ultra saf su, 2 µl 10X *Taq* DNA Polimeraz buffer, 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.8 µl 2.5 mM dNTP, 0.3 µl *Taq* DNA Polimeraz (5U/ µl), 1 µl HM (*MspI-HpaII*) ön selektif primeri, 1 µl *EcoRI* primeri ve 4 µl seyreltilmiş Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu DNA'sı içermektedir. Öncelikle 90 örnek ve negatif kontroller için PCR karışımı hazırlanmış ve PCR tüplerinin her birine 16 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından 4 µl seyreltilmiş Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu DNA'sı eklenerek pipetleme yöntemiyle karıştırılmış. Negatif kontroller için DNA yerine 4 µl ultra saf su kullanılmıştır.

Ön selektif PCR döngü koşulları; 94°C'de 3 dakika, 30 döngü boyunca denatürasyon aşaması, 94°C'de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması, 60°C'de 30 saniye, uzama aşaması 72°C'de 1 dakika ve sonlandırma aşaması 4°C olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ön selektif PCR reaksiyonlarından 10 µl alınarak 1.5 ml'lik tüplere aktarılmış, üzerine 190 µl ultra saf su eklenerek seyreltilmiştir. Selektif PCR aşamasında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

PCR tüplerinde kalan 10 µl ön selektif PCR ürünlerinin üzerine 2 µl loading dye eklenerek %1.5'lik agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 3.9). Kontrolü

sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 100 bp ladder DNA yüklenmiştir. Ön selektif PCR reaksiyonu *MspI* ve *HpaII* restriksiyon/ligasyon DNA ürünleri için aynı şartlar altında birbirinden bağımsız gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Ön Selektif PCR reaksiyonlarının %1.5'lik agaroz jelde kontrolü

3.3.4. Selektif PCR Aşaması

Çalışmada kullanılan selektif PCR amplifikasyonu aşaması için reaksiyonun hacmi 20 µl olarak hazırlanmıştır. Ön selektif PCR reaksiyonu; 10 µl ultra saf su, 2 µl 10X *Taq* DNA Polimeraz buffer, 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.8 µl 2.5 mM dNTP, 0.2 µl *Taq* DNA Polimeraz(5U/ µl), 1 µl FAM ile işaretlenmiş HM(*MspI*-*HpaII*) selektif primeri, 1 µl *EcoRI* primeri ve 3 µl seyreltilmiş ön selektif PCR ürünü içermektedir. Öncelikle 90 örnek ve negatif kontroller için PCR karışımı hazırlanmış ve PCR tüplerinin her birine 17 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından 3 µl seyreltilmiş ön selektif PCR eklenerek pipetleme yöntemiyle karıştırılmıştır. Negatif kontroller için DNA yerine 3 µl ultra saf su kullanılmıştır.

Selektif PCR döngü koşulları; 94°C'de 2 dakika, denatürasyon aşaması 94°C'de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması 63°C'den 57 °C'ye (her döngüde 1°C azalarak) 30 saniye, uzama aşaması 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 7 döngü , denatürasyon aşaması 94°C'de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması

56°C’de 30 saniye, uzama aşaması 72°C’de 1 dakika olmak üzere toplam 25 döngü ve sonlandırma aşaması 15°C şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Transposon Metilasyon Görüntüsü (TMD) Analizi

TMD, CCGG bölgelerinin metilasyon durumunu TE (Transpoze olabilen element)'leri çevreleyen dizilerde genom çapında analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Transpozonların metilasyon durumunu analiz etmek için MSAP yöntemi değiştirilerek uygulanmıştır. Bu yöntemde *EcoRI* restriksiyon enzimi restriksiyon/ligasyon aşamasına dahil edilmemiş, DNA örnekleri *MspI* ve *HpaII* ile birbirinden bağımsız olarak kesilmiştir. Yine aynı şekilde *EcoRI* adaptörleri kullanılmamış, *MspI* restriksiyon/ligasyon reaksiyonu için *MspI* adaptörü, *HpaII* restriksiyon/ligasyon reaksiyonu için *HpaII* adaptörü kullanılmıştır.

Bu yöntem ile MITE (a miniature inverted-repeat transposable element) transpozon ailesine ait olan sınıf 2 transpozon elementi Thalos’un metilasyon durumu analiz edilmiştir. TMD reaksiyonlarında ön selektif PCR aşamasında Thalos spesifik primer ve seçici nükleotit içermeyen *HpaII/MspI* primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Seçici PCR aşamasında flourosan boya ile etiketli Thalos spesifik primeri ve 4 seçici nükleotit içeren etiketsiz *HpaII/MspI* primeri kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. TMD için kullanılan adaptör ve tüm primerlerin listesi

Primer/		
Adaptör	Thalos 5’ -3’	Hpa II/Msp I (H/M) 5’ -3’
Adaptör1	-	GATCATGAGTCCTGCT
Adaptör2	-	CGAGCAGGACTCATGA
Ön Selektif Primer		
	GCTCCGTATGTAGTCACTTATTGA	ATCATGAGTCCTGCTCGG
Selektif Primerler		
	GCTCCGTATGTAGTCACTTATTGA	ATCATGAGTCCTGCTCGG+ TCAG

3.4.1. Adaptörlerin Hazırlanması

Adaptörlerden 1µg/µl olacak şekilde 100 µl'lik stoklar hazırlanmıştır. *HpaII/MspI*-Adaptör1, *HpaII/MspI*-Adaptör2 olmak üzere 2 farklı stok hazırlanmıştır.

HpaII/MspI tek zincirli adaptörlerinden 180 µl'lik adaptör karışımı hazırlanmıştır. Bu işlem için 45 µl stok *HpaII/MspI*-Adaptör1 0.2 ml'lik pcr tüpüne eklenmiştir. Üzerine 45 µl stok *HpaII/MspI*-Adaptör2 eklenmiştir. 90 µl ultra saf su eklenerek hacim 180 µl'ye tamamlanmıştır.

Adaptör karışımları 95°C'de 5 dakika boyunca PCR cihazında inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir ve ardından adaptör karışımları PCR tüplerinden 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Bu reaksiyonlar Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonunda adaptör olarak kullanılmak üzere -20 °C'de derecede saklanmıştır.

3.4.2. TMD Restriksiyon/Ligasyon Reaksiyonu

Restriksiyon ve Ligasyon reaksiyonu tek bir tüp içerisinde bir arada gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon ile restriksiyon enzimi genomik DNA'yı kendine özgü bölgelerden kesmiş, aynı reaksiyon içerisinde kesilen bölgelere özgü *HpaII/MspI* adaptörleri ile ligasyon sağlanmıştır. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyon hacmi 10 µl olarak hazırlanmıştır. Reaksiyon 1.5 ml'lik tüpler içerisinde gerçekleştirilmiştir.

MspI için Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu; 1 µl 10X DNA ligaz buffer, 1 µl 0.5 M NaCl, 1 µl *HpaII/MspI* Adaptörü, 0.1 µl *MspI* restriksiyon enzimi(20000U/ml), 0.3 µl *T4 DNA Ligaz*(400000U/ml), 2 µl genomik DNA ve 4.6 µl ultra saf su içermektedir. *HpaII* için Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu; 1 µl 10X DNA ligaz buffer, 1 µl 0.5 M NaCl, 1 µl *HpaII/MspI* Adaptörü, 0.2 µl *MspI* restriksiyon enzimi(20000U/ml), 0.3 µl *T4 DNA Ligaz*(400000u/ml), 2 µl genomik DNA ve 4.5 µl ultra saf su içermektedir.

90 DNA örneği ve negatif kontroller için restriksiyon/ligasyon karışımı hazırlanmış ve tüplere 8 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Üzerine 2 µl genomik DNA eklenerek pipetaj yöntemiyle karıştırılmıştır. Negatif kontroller için DNA yerine 2 µl ultra saf su kullanılmıştır. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu inkübatör içerisinde 37 °C’de 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler içerisine 90 µl ultra saf su eklenerek seyreltilmiştir.

Seyreltilmiş reaksiyonun her birinden 10 µl alınarak %0.8’lik agaroz jel içerisindeki kuyucuklara yüklenmiş ve 40 dakika boyunca koşturulmuştur. Kontrolü sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 1 kbp ladder DNA yüklenmiştir. Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonları ön selektif PCR aşaması için -20 °C’de derecede saklanmıştır.

3.4.3. Ön Selektif PCR (Preamplifikasyon) Aşaması

Çalışmada kullanılan ön selektif PCR amplifikasyonu aşaması için reaksiyonun hacmi 20 µl olarak hazırlanmıştır. Ön selektif PCR reaksiyonu; 8.9 µl ultra saf su, 2 µl 10X *Taq* DNA Polimeraz buffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 0.8 µl 2.5 mM dNTP, 0.3 µl *Taq* DNA Polimeraz(5U/ µl), 1 µl HM(*MspI-HpaII*) ön selektif primeri, 1 µl transpozon primeri ve 4 µl seyreltilmiş Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu DNA’sı içermektedir. Öncelikle 90 örnek ve negatif kontroller için PCR karışımı hazırlanmış ve PCR tüplerinin her birine 16 µl olacak şekilde dağıtılmıştır Ardından 4 µl seyreltilmiş Restriksiyon/Ligasyon reaksiyonu DNA’sı eklenerek pipetleme yöntemiyle karıştırılmıştır. Negatif kontroller için DNA yerine 4 µl ultra saf su kullanılmıştır.

Ön selektif PCR döngü koşulları; 94 °C’de 3 dakika, 30 döngü boyunca denatürasyon aşaması, 94 °C’de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması, 60 °C’de 30 saniye, uzama aşaması 72 °C’de 1 dakika ve sonlandırma aşaması 4 °C şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ön selektif PCR reaksiyonlarından 10 µl alınarak 1.5 ml’lik tüplere aktarılmış, üzerine 190 µl ultra saf su eklenerek seyreltilmiştir. Selektif PCR aşamasında kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır. PCR tüplerinde kalan

10 µl ön selektif PCR ürünlerinin üzerine 2 µl loading dye eklenerek %1.5'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Kontrolü sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 100 bp ladder DNA yüklenmiştir. Ön selektif PCR reaksiyonu *MspI* ve *HpaII* restriksiyon/Ligasyon DNA ürünleri için aynı şartlar altında birbirinden bağımsız gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Selektif PCR Aşaması

Çalışmada kullanılan selektif PCR amplifikasyonu aşaması için reaksiyonun hacmi 20 µl olarak hazırlanmıştır. Ön selektif PCR reaksiyonu; 10 µl ultra saf su, 2 µl 10X *Taq* DNA Polimeraz buffer, 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.8 µl 2.5 mM dNTP, 0.2 µl *Taq* DNA Polimeraz(5U/ µl), 1 µl FAM ile işaretlenmiş HM(*MspI*-*HpaII*) primeri, 1 µl FAM ile işaretlenmiş transpozon primeri ve 3 µl seyreltilmiş ön selektif PCR ürünü içermektedir. Öncelikle 90 örnek ve negatif kontroller için PCR karışımı hazırlanmış ve PCR tüplerinin her birine 17 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından 3 µl seyreltilmiş ön selektif PCR eklenerek pipetaj yöntemiyle karıştırılmıştır. Negatif kontroller için DNA yerine 3 µl ultra saf su kullanılmıştır.

Ön selektif PCR döngü koşulları; 94 °C'de 2 dakika, denatürasyon aşaması 94 °C'de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması 63 °C'den 57 °C'ye (her döngüde 1°C azalarak) 30 saniye, uzama aşaması 72 °C'de 1 dakika olmak üzere toplam 7 döngü , denatürasyon aşaması 94 °C'de 30 saniye, primerin bağlanma aşaması 56 °C'de 30 saniye, uzama aşaması 72 °C'de 1 dakika olmak üzere toplam 25 döngü ve sonlandırma aşaması 15 °C şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kapiler Elektroferez'de Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması

MSAP ve TMD selektif PCR işlemi sonrası, her bir örnek için, 2.5 µl selektif PCR ürünü alınarak 9.9 µl Hi-Di Formamid ve 0.6 µl LIZ-500 size standart ile birlikte 96'lık platelerin her bir kuyucuğuna yüklenmiştir. Daha sonra plate santrifüj cihazında plate kısa süreli santrifüj edilerek baloncukların

giderilmesi sağlanmıştır. Örnekler Applied Biosystems 3730 xl DNA analizatör cihazına yüklenmiş ve okuma yapılmıştır.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Kapiler Elektroforez'den alınan veriler GeneMapper 4.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* için alınan verileri GeneMapper 4.0 programında bir arada analiz edilerek genotiplerin metilasyon durumlarının belirlenmesi sağlanmıştır. Analiz sonuçlarında her bir alel (bant) grafikte pik olarak kendini göstermiştir.

MSAP ve TMD analizleri için tüm örneklerde baz büyüklüklerine göre her bir pik (alel) '1' ile skorlanırken olmayan aleller '0' ile skorlanmıştır. Skorlama işlemi için 'Excel' paket programı kullanılmıştır. Skorlama yapılırken kombinasyonlar birbirinden ayrı şekilde değerlendirilmiştir. Her bir genotip için metillenen alelleri ifade eden *HpaII* '1' *MspI* '0' ve *HpaII* '0' *MspI* '1' , metillenmeyen alelleri ifade eden *HpaII* '1' *MspI* '1', Tip 4 metilasyonu ve alelin genotipte bulunmamasını ifade eden *HpaII* '0' *MspI* '0' şeklinde skor tablosu oluşturulmuştur. Daha sonra metillenen alellerin sayısı toplam alellerin sayısına bölünerek metilasyon yüzdeleri belirlenmiştir. Tip 4 metilasyonu ifade etse de alelin bulunmama durumunu da ifade edebileceği için metilasyon yüzdesi hesaplanırken toplam alel sayısına dahil edilmemiştir(Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Bant profillerine göre örnek skarlama

Bant Profili				Skor			
Genotip 1		Genotip 2		Genotip 1		Genotip 2	
<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
+	+	+	-	1	1	1	0
+	-	+	+	1	0	1	1
-	+	-	-	0	1	0	0
+	-	+	-	1	0	1	0
+	+	-	+	1	1	0	1

‘*msap*’ R paket programı (Pérez-Figueroa, 2013) kullanılarak Moleküler Varyans analizleri(AMOVA) yapılmıştır. Ayrıca alel sayısı, metillenen alel sayısı, metillenmeyen alel sayısı hesaplanmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için DARwin 6.0 paket programı kullanılmıştır (Perrier ve Jocquemoud-Collet, 2006).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) Analizi

4.1.1. Genotiplerin DNA Metilasyon Seviyeleri

Bu çalışmada 3 adet primer çifti kombinasyonu kullanılarak 87 adet yabancı gernik ve 3 adet makarnalık buğday genotipinin metilasyon seviyeleri belirlenmiştir. Üç primere ait elde edilen sonuçlar detaylı olarak Çizel 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yabancı gernik genotiplerinin primer kombinasyonlarına göre metilasyon seviyesi

Genotipler	(E)-ACT/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)-AGC/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)ACG/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	Ortalama Metilasyon Seviyesi (%)
TR1	62.03	61.19	59.48	60.90
TR2	65.00	-	53.13	59.07
TR3	76.25	-	64.62	70.44
TR4	70.51	63.04	56.06	63.20
TR5	61.73	69.00	59.03	63.25
IS6	55.21	68.93	52.49	58.88
TR7	71.25	-	62.32	66.79
IS8	-	70.80	-	70.80
TR9	67.62	62.73	57.87	62.74
TR10	-	70.00	-	70.00
IS11	60.24	60.91	52.26	57.80
TR12	72.94	75.93	59.04	69.30
TR13	70.51	69.09	68.84	69.48
TR14	69.84	63.55	75.41	69.60
TR15	73.42	56.36	61.14	63.64
LB16	57.14	68.64	62.21	62.66
TR17	68.83	54.74	57.14	60.24
TR18	68.67	66.67	55.78	63.71
LB19	77.68	-	73.13	75.41
TR20	80.81	69.09	67.91	72.60
LB21	65.12	64.60	60.84	63.52

Çizelge 4.1.'in devamı

Genotipler	(E)-ACT/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)-AGC/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)ACG/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	Ortalama Metilasyon Seviyesi (%)
LB21	65.12	64.60	60.84	63.52
TR22	62.71	-	61.21	61.96
TR23	78.21	72.41	63.87	71.50
TR24	90.48	-	-	90.48
TR25	69.01	58.76	60.00	62.59
LB26	53.03	66.25	57.38	58.89
TR27	88.89	80.00	70.59	79.83
TR28	68.42	69.31	61.59	66.44
IS29	47.13	68.69	51.55	55.79
TR30	66.20	-	60.36	63.28
TR31	54.21	66.94	58.08	59.74
TR32	74.07	68.69	62.03	68.26
SY33	53.66	66.98	58.29	59.64
TR34	50.59	70.59	54.38	58.52
TR35	53.33	-	55.56	54.45
SY36	61.45	71.29	65.75	66.16
TR37	68.12	64.95	59.35	64.14
TR38	67.82	63.74	58.48	63.35
TR39	52.38	69.14	65.28	62.27
IS40	-	73.56	-	73.56
TR41	-	74.67	64.83	69.75
SY42	61.25	77.27	84.87	74.46
TR43	93.10	-	68.29	80.70
TR44	66.18	74.12	56.16	65.49
TR45	77.03	92.31	61.29	76.88
TR46	74.32	73.33	64.29	70.65
LB47	68.92	75.31	73.83	72.69
TR48	64.38	68.35	63.03	65.25
IS49	62.86	65.22	57.59	61.89
SY50	51.95	72.84	76.34	67.04
LB51	53.66	73.91	52.67	60.08
IS52	59.78	-	70.59	65.19
TR53	70.42	71.43	57.50	66.45

Çizelge 4.1.'in Devamı

Genotipler	(E)-ACT/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)-AGC/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)ACG/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	Ortalama Metilasyon Seviyesi (%)
TR55	69.07	74.70	61.94	68.57
TR56	64.58	65.00	57.74	62.44
TR57	56.10	64.84	84.25	68.40
SY58	60.61	63.04	72.03	65.23
SY59	57.29	55.70	60.36	57.78
SY60	-	60.23	54.17	57.20
LB61	47.31	57.95	48.50	51.25
SY62	52.56	64.63	53.52	56.90
IS63	-	67.09	57.23	62.16
IS64	54.00	63.33	59.04	58.79
TR65	58.82	59.76	61.25	59.94
TR67	60.47	70.00	57.83	62.77
TR68	80.19	62.65	52.10	64.98
IS69	66.23	66.22	59.63	64.03
LB70	64.10	76.47	51.19	63.92
LB71	50.00	62.03	51.43	54.49
LB72	-	68.06	63.09	65.58
IS73	66.28	58.97	54.97	60.07
TR74	45.54	50.00	53.57	49.70
SY75	48.89	70.10	57.84	58.94
TR76	70.37	-	51.97	61.17
TR77	72.41	73.03	58.13	67.86
SY79	56.00	69.41	59.60	61.67
IS80	-	68.63	56.73	62.68
LB81	55.10	56.82	56.79	56.24
TR82	56.18	65.52	60.22	60.64
IS83	52.83	59.04	51.85	54.57
IS84	62.14	87.01	58.58	69.24
TR85	56.25	64.37	53.05	57.89
LB86	62.07	83.33	56.16	67.19
TR88	54.95	53.75	57.41	55.37
TR89	58.43	-	59.88	59.16
LB90	60.23	64.94	61.69	62.29
Zavitan	68.42	61.18	60.98	63.53

Çizelge 4.2. Makarnalık buğday genotiplerinin primer kombinasyonlarına göre metilasyon seviyesi

Genotipler	(E)-ACT/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)-AGC/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	(E)ACG/ (HM)-TCAG Metilasyon Seviyesi (%)	Ortalama Metilasyon Seviyesi (%)
Svevo	62.65	52.50	-	57.58
Karakılçık88	47.17	55.56	56.89	53.21
Çeşit 4	48.15	63.41	78.63	63.40

Çizelge 4.1’den görüldüğü gibi, yabancı gernik pupülasyonu içerisinde (E)-ACT/(HM)-TCAG Primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %45.54 ile %93.1 arasında, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %50 ile %92.31 arasında, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %48.5 ile %84.87 arasında, tüm primer kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesi %49.74 ile %90.48 arasında değişmiştir. Venetsky ve ark, (2015) İsrail orjinli yabancı gernik popülasyonlarını içerisinde metilasyon seviyesinin %63.7 ile %71.3 arasında olduğunu bildirmiştir. Elde ettiğimiz bulgularda metilasyon seviyesi aralığının Venetsky ve ark, (2015) bildirdiği bulgulara göre daha geniş aralıkta olmasının sebebi popülasyonlarımızın daha geniş bir coğrafi dağılım göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İncelenen genotiplerin metilasyon seviyeleri bakımından geniş bir varyasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR43 olduğu, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR45 olduğu, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin LB61, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin SY42 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en

düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise TR24 olduğu belirlenmiştir.

Makarnalık buğday genotipleri için Çizelge 4.2. incelendiğinde (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %62.65 ile %48.15 arasında, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %63.41 ile %52.50 arasında, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %78.63 ile %56.89 arasında, tüm primer kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesinin ise %53.21 ile %63.40 arasında değiştiği ortaya çıkmaktadır. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo olduğu, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Çeşit4 olduğu, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise Çeşit4 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip Çeşit4 olduğu belirlenmiştir.

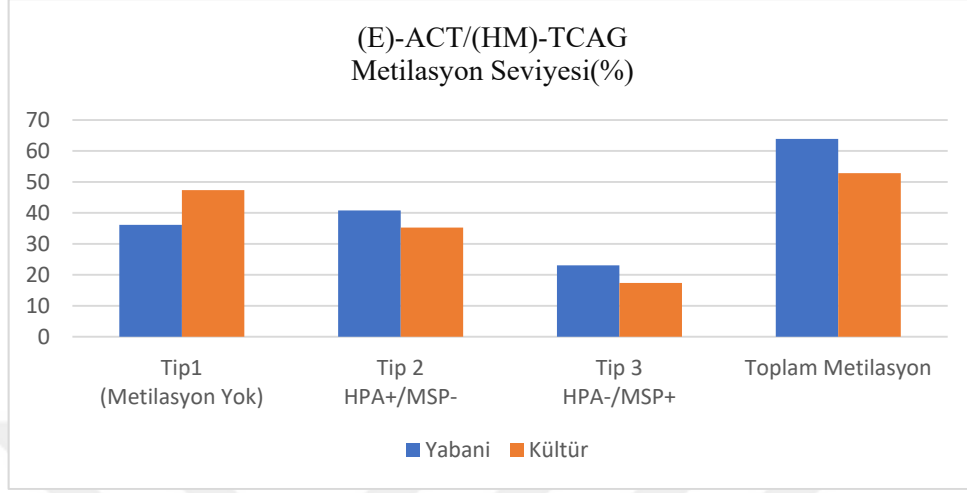
4.1.2. Yabani Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre DNA Metilasyon Seviyeleri

Yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonlarının üç primer kombinasyonuna ait metilasyon tiplerine göre elde edilen metilasyon seviyeleri detaylı olarak Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Çizelge 4.3. incelendiğinde, (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyon durumuna göre yabani gernik genotiplerinde lokusların %40.808 'i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %35.268'i metillenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde ise bu değerlerin %23.063 ve %17.388 olarak saptandığı ortaya çıkmaktadır. Toplam metilasyon durumu

değerlendirildiğinde yabancı gernik genotiplerinin lokusların %63.871 'i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %52.806'sı metillenmiştir. Metilasyona uğramayan lokuslar yabancı gernik genotipleri için %36.129 seviyesinde iken, makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %47.344'lük kısmını kapsamaktadır. Bu verilerin sonucunda (E)-ACT/(HM)-TCAG primeri çifti için yabancı gernik popülasyonlarının makarnalık buğday popülasyonlarına göre metilasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1.). Venetsky ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada yabancı gernik buğdayının metilasyon seviyesinin makarnalık buğdaya göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

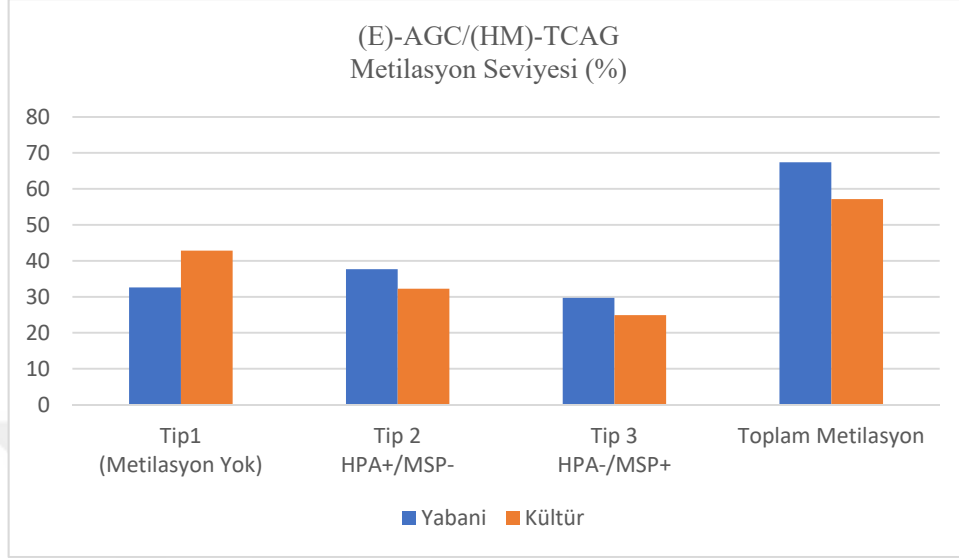
Çizelge 4.3. Yabancı ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında farklı primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Primer Kombinasyon Adı	Yabancı (%)	Kültür (%)
(E)-ACT/(HM)-TCAG		
Tip 1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	36.129	47.344
Tip 2 HPA+/MSP-	40.808	35.268
Tip 3 HPA-/MSP+	23.063	17.388
Toplam Metilasyon	63.871	52.806
(E)-AGC/(HM)-TCAG		
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	32.625	42.843
Tip 2 HPA+/MSP-	37.673	32.256
Tip 3 HPA-/MSP+	29.702	24.901
Toplam Metilasyon	67.375	57.157
(E)-ACG/(HM)-TCAG		
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	39.658	32.244
Tip 2 HPA+/MSP-	34.945	52.480
Tip 3 HPA-/MSP+	25.396	15.276
Toplam Metilasyon	60.342	67.756
Primerlerin ortalaması		
Tip 1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	36.137	40.810
Tip 2 HPA+/MSP-	37.809	40.001
Tip 3 HPA-/MSP+	26.054	19.188
Toplam Metilasyon	63.863	59.240



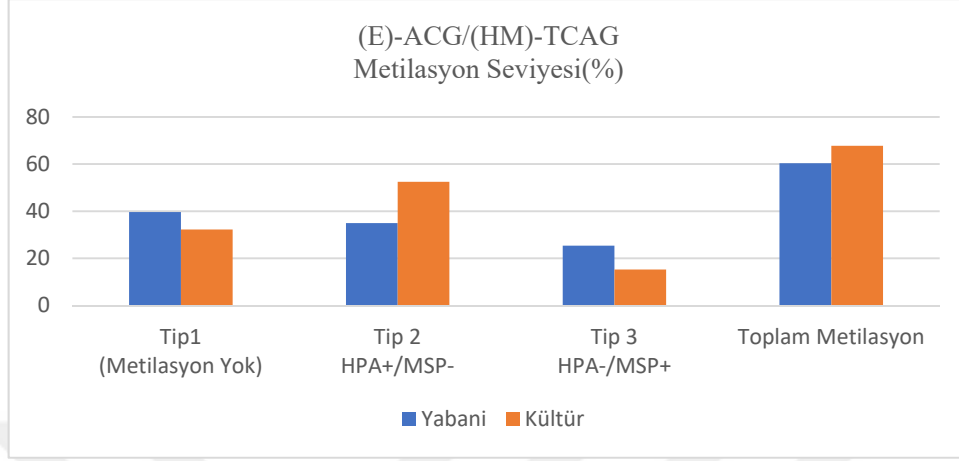
Şekil 4.1. Yabani ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

(E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda yabani gernik popülasyonlarında lokusların Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik popülasyonlarında lokusların %37.673’ünün, makarnalık buğday popülasyonlarında ise lokusların %32.256’sının metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik popülasyonlarında lokusların %29.702’si metillenmişken makarnalık buğday popülasyonlarında lokusların %24.901’inin metillenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum toplam metilasyon durumu için değerlendirildiğinde yabani gernik popülasyonlarında lokusların %67.375’sinin, makarnalık buğday popülasyonlarında lokusların %57.157’sinin metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Metilasyona uğramayan lokuslar ise yabani gernik popülasyonları için %32,625’lik bir kısmı kapsarken makarnalık buğday popülasyonları için lokusların %42.843’ünü oluşturmuştur. Bu verilerin sonucunda (E)-AGC/(HM)-TCAG primeri çifti için yabani gernik popülasyonlarının makarnalık buğday popülasyonlarına göre metilasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Yabani ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

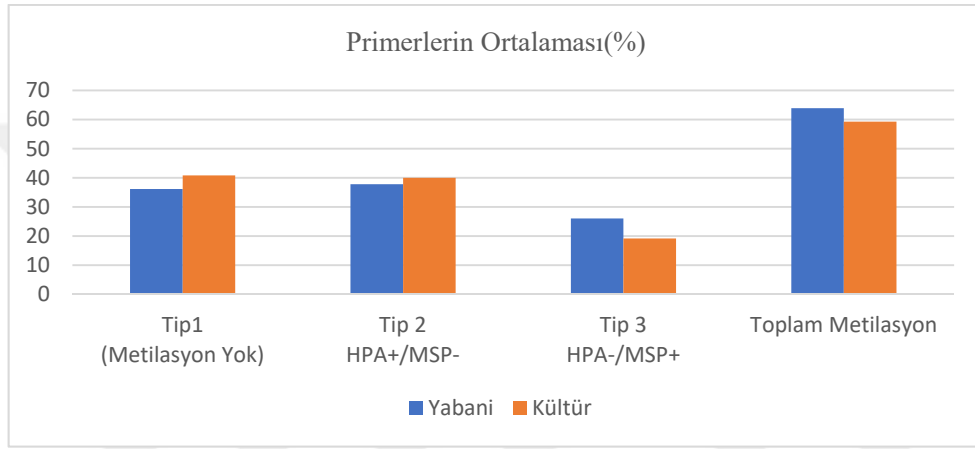
(E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik genotiplerinde lokusların %34.945’i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %52.480’inin metillenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde yabani gernik genotiplerinde lokusların %25.396’sı metillenmişken makarnalık buğday popülasyonlarında lokusların %15.276’sının metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde yabani gernik genotiplerinin lokusların %60.342’si metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinin lokusların %67.756’sının metillendiği anlaşılmaktadır. Yabani gernik genotiplerinde lokusların %39.658’unda metilasyon durumu bulunmazken, makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %32.244’u metilasyon durumu içermemiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Yabani ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “(E)-ACG/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Tüm primer kombinasyonlarının ortalaması değerlendirildiğinde Tip 2 metilasyon durumu incelendiğinde yabani gernik genotiplerinde lokusların %37.809’ü makarnalık buğday genotiplerinde ise %40.001’inin metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik genotiplerinde lokusların %26.054’ü makarnalık buğday genotiplerinde ise %19.188’inin metillendiği ortaya çıkmaktadır. Toplam metilasyon durumu incelendiğinde yabani gernik genotiplerinde lokusların %63.863’ü makarnalık buğday genotiplerinde ise lokusların %59.240’ının metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Yabani gernik genotiplerinde lokusların %36.137’sinde metilasyon durumu oluşmazken, makarnalık buğday genotiplerinde bu durum %40.810’luk seviyede olduğu sonucuna varılmıştır .Bu verilerin sonucunda tüm primer çiftleri için yabani gerniğin makarnalık buğdaya göre metilasyon seviyesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Venetsky ve ark, (2015) İsrail orjinli yabani gernik popülasyonlarının ortalama %66.4 metilasyon seviyesinde olduğunu bildirmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların Venetsky ve ark, (2015) ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Tip 2 metilasyon durumu için makarnalık buğday genotiplerinin, Tip 3 metilasyon durumu için ise yabani gernik genotiplerinin metilasyon seviyesinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.4). Bununla birlikte toplam metilasyon durumunun yabani gernik popülasyonlarında daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.4. Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında primer kombinasyonlarının ortalamasının metilasyon tiplerine göre seviyelerini gösteren histogram

4.1.3. Farklı Orijinli Yabani Gernik Genotiplerinin Metilasyon Tiplerine Göre DNA Metilasyon Seviyeleri

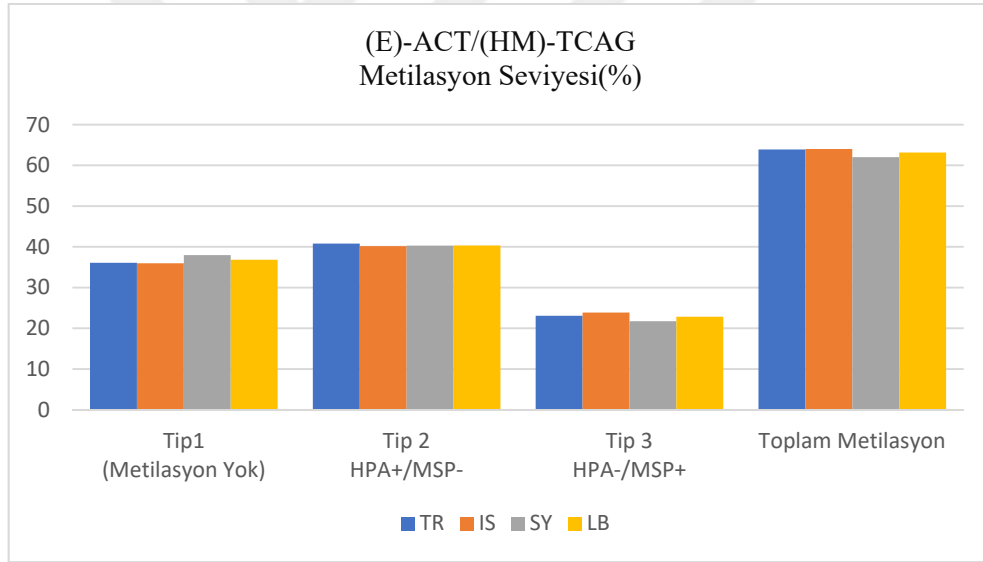
Yabani gernik buğdayların Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli genotipler arasında farklı primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gergin popölasyonları arasında farklı primer kombinasyonlarının metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Primer Adı / Metilasyon Tipi	Ülkeler			
(E)-ACT/(HM)-TCAG	TR (%)	IS (%)	SY (%)	LBN (%)
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	36.083	35.966	37.989	36.830
Tip 2 HPA+/MSP-	40.821	40.180	40.273	40.336
Tip 3 HPA-/MSP+	23.096	23.854	21.738	22.834
Toplam Metilasyon	63.917	64.034	62.011	63.170
(E)-AGC/(HM)-TCAG				
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	32.750	32.623	32.406	32.545
Tip 2 HPA+/MSP-	37.588	37.551	37.193	37.317
Tip 3 HPA-/MSP+	29.662	29.826	30.401	30.138
Toplam Metilasyon	67.250	67.377	67.594	67.455
(E)-ACG/(HM)-TCAG				
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	39.675	39.344	39.303	39.619
Tip 2 HPA+/MSP-	34.952	35.054	33.916	33.809
Tip 3 HPA-/MSP+	25.374	25.602	26.781	26.572
Toplam Metilasyon	60.325	60.656	60.697	60.381
Primerlerin Ortalaması				
Tip 1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	36.169	35.978	36.566	36.331
Tip 2 HPA+/MSP-	37.787	37.595	37.127	37.154
Tip 3 HPA-/MSP+	26.044	26.427	26.307	26.515
Toplam Metilasyon	63.831	64.022	63.434	63.669

Çizelge 4.4.'den görüleceği gibi (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %40.821'i, İsrail orijinli genotiplerde %40.180'i, Suriye orijinli

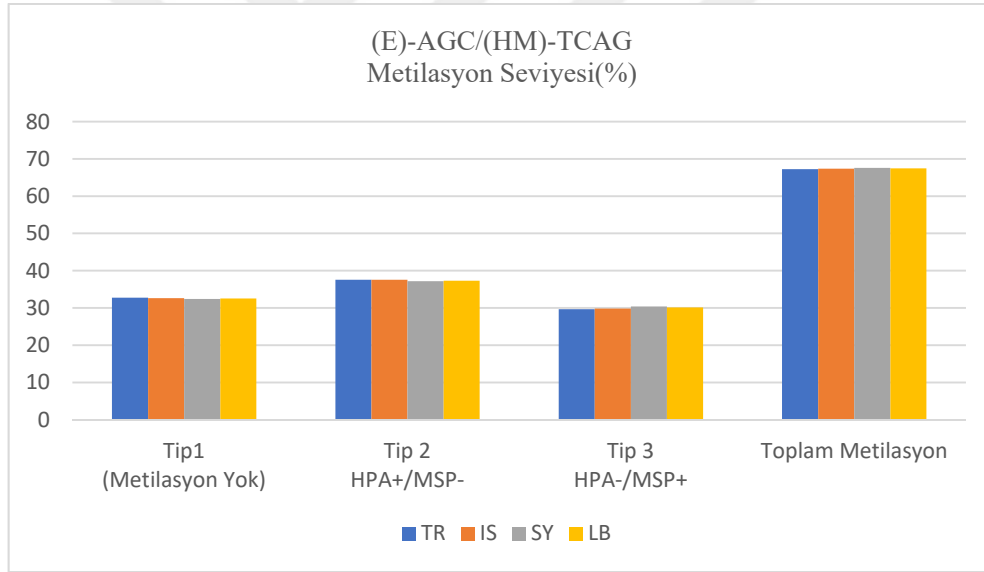
genotiplerde %40.273'u, Lübnan orijinli genotiplerde %40.336'ü metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından ise, Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %23.096'i, İsrail orijinli genotiplerde %23.854'ü, Suriye orijinli genotiplerde %21.738'u, Lübnan orijinli genotiplerde ise %22.834'ü metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu açısından ise, Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %63.917'si, İsrail orijinli genotiplerde %64.034'ü, Suriye orijinli genotiplerde %62.011'u, Lübnan orijinli genotiplerde ise %63.170'i metillenmiştir. Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %36.083'ü, İsrail orijinli genotiplerde %35.966'sı, Suriye orijinli genotiplerde %37.989'u, Lübnan orijinli genotiplerde %36.833'ünde metilasyon durumları bulunmamaktadır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı genetik popülasyonları arasında “(E)ACT/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

“(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunda ise Tip 2 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %37.588'i, İsrail orijinli genotiplerde %37.551'i, Suriye orijinli genotiplerde %37.193'ü, Lübnan

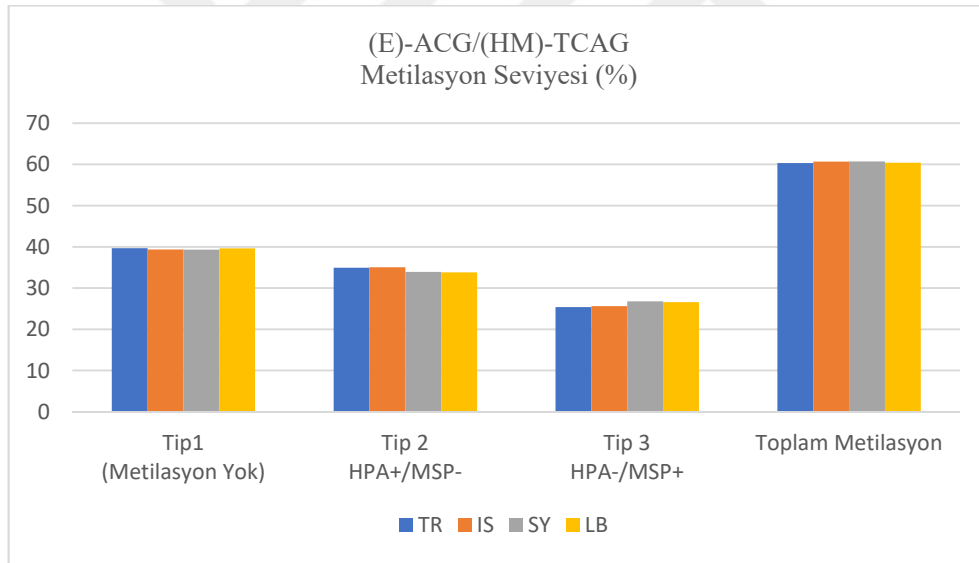
orijinli genotiplerde %37.317'si metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından ise, Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %29.826'sı, İsrail orijinli genotiplerde %29.826'sı, Suriye orijinli genotiplerde %30.401'i ve Lübnan orijinli genotiplerde ise %30.138'i metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %67.250'si, İsrail orijinli genotiplerde lokusların %67.377'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %67.594'ü, Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %67.455'i metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Metilasyon durumu içermeyen lokuslar ise Türkiye orijinli genotiplerde %32.750, İsrail orijinli genotiplerde %32.623, Suriye orijinli genotiplerde %32.406, Lübnan orijinli genotiplerde %32.545'lik bir kısmı oluşturmuştur. (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gennik popölasyonları arasında “(E)-AGC/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

(E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %39.675'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %39.344'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %39.303'ü ve Lübnan orijinli

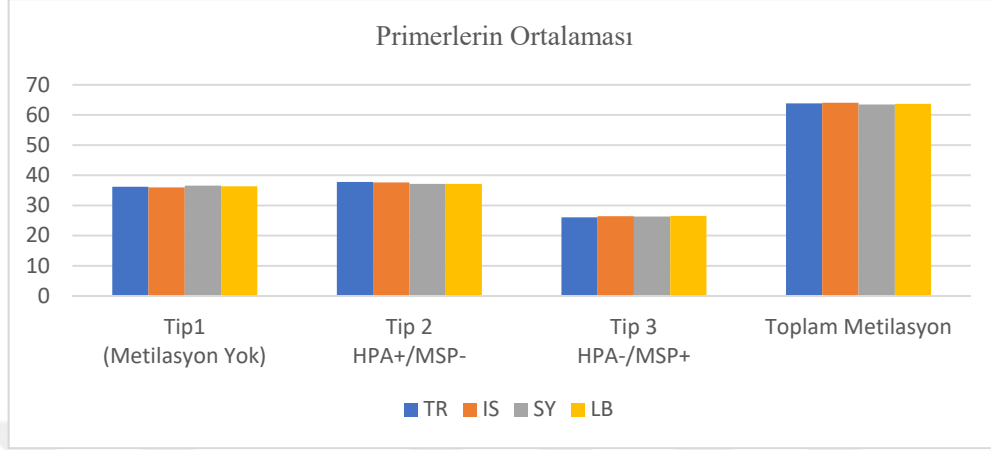
genotiplerde lokuslarının %39.619'u metillenmemiştir. Tip 2 metilasyonu açısından, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %34.952'sini kapsarken, İsrail orijinli genotiplerde %35.054'ünü, Suriye orijinli genotiplerde %33.916'sını ve Lübnan orijinli genotiplerde %33.809'unu kapsamıştır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %25.374'ü, İsrail orijinli genotiplerde %25.602'si, Suriye orijinli genotiplerde %26.781'i ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %26.572'sinin metillenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Toplam metilasyon durumu açısından, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %60.325'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %60.656'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %60.697'si ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %60.381'i metillenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gerginik popölasyonları arasında “(E)-ACG/(HM)-TCAG” kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Tüm primer kombinasyonlarının ortalaması değeriendirildiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %36.169'u, İsrail orijinli genotiplerde

lokuslarının %35.978'i, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %36.566'sı ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %36.331'inde metilasyon bulunduğu anlaşılmaktadır. Tip 2 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %37.787'si, İsrail orijinli genotiplerde lokusların %37.595'i, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %37.127'si ve Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %37.154'ü metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %26.044'i, İsrail orijinli genotiplerde lokusların %26.427'si, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %26.307'si ve Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %26.515'si metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %63.831'i, İsrail orijinli genotiplerde lokusların %64.022'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %63.434'ü ve Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %63.669'unun metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Tüm kombinasyonlar için Tip 2 metilasyon seviyesinin Tip 3 metilasyon seviyesinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Farklı ülke orijinli yabancı gernik genotiplerinin ortalama metilasyon seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8) Venetsky ve ark, (2015) İsrail orijinli yabancı gernik popülasyonlarında metilasyon seviyelerini belirlemişler, yabancı gernik buğday popülasyonları arasında ortalama metilasyon seviyelerinin birbirlerine yakın olduğunu fakat metilasyon modellerinin belirgin şekilde farklı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular Venetsky ve ark, (2015)'nin bulguları ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.8. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik popülasyonları arasında primer kombinasyonlarının ortalamasının metilasyon tiplerine göre seviyeleri

4.1.4. Yabancı Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonunun Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi

Yabancı gernik ve makarnalık buğday popülasyonunun primer kombinasyonlarına göre toplam lokus sayısı, analiz edilen genotip sayısı, metilasyona duyarlı lokus sayısı, metillenmemiş lokus sayısı, metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı, metillenmemiş polimorfik lokus sayısı bilgileri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonlarına göre primer kombinasyonlarının lokus bilgileri

	(E)ACT/ (HM)-TCAG	(E)AGC/ (HM)-TCAG	(E)ACG/ (HM)-TCAG	T.K
Lokus Sayısı	270	244	360	874
Toplam Genotip Sayısı	82	78	85	69
Yabani	79	75	83	67
Makarnalık	3	3	2	2
Metilasyona Duyarlı Lokus Sayısı	175	180	279	645
Metillenmemiş Lokus Sayısı	95	64	81	229
Metilasyona Duyarlı Polimorfik Lokus Sayısı	160	154	263	584
Metillenmemiş Polimorfik Lokus Sayısı	94	63	81	225

T.K= Tüm Primer Kombinasyonları

Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi, “(E)ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için 82 genotip analiz edilmiş, 270 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 175’inin metilasyona duyarlı 95’inin ise metillenmemiş olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 160’ı polimorfik iken metillenmemiş lokusların 94’ü polimorfik olarak bulunmuştur. “(E)AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için 78 genotip analiz edilmiş, 244 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 180’inin metilasyona duyarlı 64’ünün ise metillenmemiş olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 154’ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların 63’ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir. “(E)ACG/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için 85 genotip analiz edilmiş, 360 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 279’unun metilasyona duyarlı 81’inin ise metillenmemiş olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 263’ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların tamamının polimorfik olduğu bulunmuştur. Tüm kombinasyonlardan elde edilen lokusların verileri birleştirilerek analiz edildiğinde, 69 genotip için toplam 874 lokus elde edilmiş, bu lokusların 645’inin metilasyona duyarlı

229'unun ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 584'ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların 225'i polimorfik olduğu saptanmıştır. Çizelge 4.5.'de verilen bilgilere göre tüm kombinasyonlarda metilasyona duyarlı lokus sayısının metillenmemiş lokuslara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Hem metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı hem de metillenmemiş polimorfik lokus sayısının toplam lokus sayısına oranı genetik ve epigenetik çeşitliliğin yüksek olduğunu göstermektedir.

Yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonları arasında ve popülasyon içerisinde farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla Moleküler Varyans (AMOVA) analizi yapılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Yabani gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
(E)ACT/(HM)-TCAG				
Populasyonlar Arası	1	50.83	50.83	3.347
Populasyon İçi	80	2518	31.48	31.48***
Toplam	81	2569	31.72	
Phi ST	0.09612 (P= 0.0161)			
(E)AGC/(HM)-TCAG				
Populasyonlar Arası	1	46.55	46.55	3.006
Populasyon İçi	74	2162	29.22	29.22***
Toplam	75	2209	29.45	
Phi ST	0.09328 (P= 0.0069)			
(E)ACG/(HM)-TCAG				
Populasyonlar Arası	1	45.69	45.69	-1.432
Populasyon İçi	83	4257	51.29	51.29***
Toplam	84	4302	51.22	
Phi ST	-0.02873 (P= 0.7195)			
Tüm Primer Kombinasyonları				
Populasyonlar Arası	1	134.8	134.8	5.256*
Populasyon İçi	67	7665	114.4	114.4***
Toplam	68	7800	114.7	
Phi ST	0.04392 (P= 0.0958)			

SD: Serbestlik Derecesi KT: Kareler Toplamı KO: Kareler Ortalaması Phi: Phi İstatistik katsayısı; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 hata sınırları içinde önemli

Çizelge 4.6 incelendiğinde (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin P<0.001 içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin P<0.001 içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)ACG/(HM)-TCAG primer

kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Tüm Primer Kombinasyonlarının AMOVA sonuçları değerlendirildiğinde popülasyonlar arası çeşitliliğin $P<0.05$ içinde önemli, popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çeşitliliğin istatistiki olarak yüksek ve önemli olduğu belirlenmiştir.

4.1.5. Farklı Orijinli Yabani Gernik Genotiplerinin Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi

Farklı ülke orijinli yabani gernik buğday genotiplerinin primer kombinasyonlarına göre toplam lokus sayısı, analiz edilen genotip sayısı, metilasyona duyarlı lokus sayısı, metillenmemiş lokus sayısı, metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı, metillenmemiş polimorfik lokus sayısı bilgileri çizelge 4.7.'de verilmiştir. Eksik verilere sahip genotipler analize dahil edilmemiştir.

Çizelge 4.7. Farklı ülkelere ait yabani gernik popülasyonlarına göre primer kombinasyonlarının lokus bilgileri

	(E)ACT/ (HM)-TCAG	(E)AGC/ (HM)-TCAG	(E)ACG/ (HM)-TCAG	T.K
Lokus Sayısı	270	244	360	874
Toplam Genotip Sayısı	78	74	82	66
Türkiye	47	40	47	37
İsrail	10	12	12	9
Lübnan	12	12	13	11
Suriye	9	10	10	9
Metilasyona Duyarlı Lokus Sayısı	171	188	280	635
Metillenmemiş Lokus Sayısı	99	56	80	239
Metilasyona Duyarlı Polimorfik Lokus Sayısı	155	161	262	569
Metillenmemiş Polimorfik Lokus Sayısı	97	55	80	234

T.K= Tüm Primer Kombinasyonları

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi, (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 78 genotip analiz edilmiş, 270 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 171’inin metilasyona duyarlı 99’unun ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 155’i polimorfik iken metillenmemiş lokusların 97’sinin polimorfik olduğu sonucuna varılmıştır. (E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 74 genotip analiz edilmiş, 244 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 188’inin metilasyona duyarlı 56’sının ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 161’i polimorfik iken metillenmemiş lokusların 55’inin polimorfik olduğu sonucuna varılmıştır. (E)ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 82 genotip analiz edilmiş, 360 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 280’inin metilasyona duyarlı 80’inin ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 262’si polimorfik iken metillenmemiş lokusların tamamının polimorfik olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm kombinasyonlardan elde edilen lokusların verileri birleştirilerek analiz edildiğinde, 66 genotip için toplam 874 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 635’i metilasyona duyarlı 239’unun ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 569’u polimorfik iken metillenmemiş lokusların 234’ünün polimorfik olduğu bilgisi elde edilmiştir. Çizelge 4.7.’de verilen bilgilere göre tüm kombinasyonlarda metilasyona duyarlı lokus sayısının metillenmemiş lokuslara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Farklı ülke orijinli yabancı gernik genotipleri içerisinde hem metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı hem de metillenmemiş polimorfik lokus sayısı genetik ve epigenetik çeşitliliğin yüksek olduğunu göstermektedir.

Yabancı makarnalık buğdayların Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY), Lübnan (LB) orijinli genotipler arasında ve popülasyonlar içerisinde farklılık olup olmadığını belirlemek ve farklılığın derecesini belirlemek amacıyla Moleküler Varyans (AMOVA) analizi yapılmıştır (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY), Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik genotiplerinin moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
(E)ACT/(HM)-TCAG				
Populasyonlar Arası	3	160.5	53.51	1.545
Populasyon İçi	74	2226	30.08	30.08***
Toplam	77	2386	30.99	
Phi ST	0.04885 (P= 1e-04)			
(E)AGC/(HM)-TCAG				
Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
Populasyonlar Arası	3	134.9	44.98	0.9622
Populasyon İçi	68	2057	30.26	30.26***
Toplam	71	2192	30.88	
Phi ST	0.03088 (P= 0.0011)			
(E)ACG/(HM)-TCAG				
Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
Populasyonlar Arası	3	273.7	91.22	2.497
Populasyon İçi	78	3868	49.58	49.58***
Toplam	81	4141	51.13	
Phi ST	0.04794 (P<0.0001)			
Tüm Primer Kombinasyonları				
Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
Populasyonlar Arası	3	522.6	174.2	4.763**
Populasyon İçi	62	6769	109.2	109.2***
Toplam	65	7291	112.2	
Phi ST	0.0418 (P<0.0001)			

SD: Serbestlik Derecesi KT: Kareler Toplamı KO: Kareler Ortalaması Phi: Phi İstatistik katsayısı; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 hata sınırları içinde önemli

Çizelge 4.8 incelendiğinde (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Tüm Primer Kombinasyonlarının AMOVA sonuçları değerlendirildiğinde popülasyonlar arası çeşitliliğin $P<0.01$ içinde önemli, popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çeşitliliğin istatistiki olarak yüksek ve önemli olduğu saptanmıştır.

4.2. TMD (Transposon Methylation Display) Analizi

4.2.1. Tüm Genotiplerin Thallos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri

Bu çalışmada Thallos/(HM)-TCAG primer çifti kullanılarak 87 adet yabani gernik ve 3 adet makarnalık buğdayın thallos traspozonunun metilasyon seviyeleri incelenmiştir. Thallos/(HM)-TCAG primer çiftine ait elde edilen sonuçlar detaylı olarak Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Tüm genotiplerin Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre

metilasyon % seviyesi					
Genotip	TMS*(%)	Genotip	TMS*(%)	Genotip	TMS*(%)
TR1	63,77	SY33	55.26	TR67	59.26
TR2	59,42	TR34	61.97	TR68	57.50
TR3	61,04	TR35	52.00	IS69	58.62
TR4	62,92	SY36	52.05	LB70	-
TR5	61,33	TR37	51.85	LB71	-
IS6	62,82	TR38	58.90	LB72	66.25
TR7	54,79	TR39	63.16	IS73	71.21
IS8	44,29	IS40	60.87	TR74	49.32
TR9	60,00	TR41	64.71	SY75	63.74
TR10	52,54	SY42	61.11	TR76	59.05
IS11	60,00	TR43	59.49	TR77	60.53
TR12	44,62	TR44	62.37	SY79	57.33
TR13	60,94	TR45	58.51	IS80	59.21
TR14	56,96	TR46	57.95	LB81	65.17
TR15	53,23	LB47	67.14	TR82	60.00
LB16	62,34	TR48	64.13	IS83	57.69
TR17	53,73	IS49	54.17	IS84	53.16
TR18	51,32	SY50	47.89	TR85	57.95
LB19	63,74	LB51	61.97	LB86	54.64
TR20	63,77	IS52	59.14	TR88	63.41
LB21	56,38	TR53	-	TR89	58.54
TR22	49,30	TR55	62.67	LB90	64.47
TR23	60,00	TR56	58.67	Zavitan	75.93
TR24	64,06	TR57	55.84	Svevo	56.04
TR25	50,00	SY58	-	Karakılçık88	61.29
LB26	66,67	SY59	58.43	Çeşit 4	58.14
TR27	58,82	SY60	43.04		
TR28	60,53	LB61	65.06		
IS29	56,10	SY62	54.88		
TR30	59,49	IS63	68.18		
TR31	51,16	IS64	59.52		
TR32	50,75	TR65	60.26		

*TMS (%): Thalos Metilasyon Seviyesi (%)

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi, farklı orijinli yabancı gernik genotipleri içerisinde Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %43.04 ile %75.93 arasında değişmiştir. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre Thalos transpozon elementinin incelenen genotiplerde metilasyon seviyesi bakımından geniş varyasyon gösterdiği saptanmıştır. Çizelge

4.9.'da verilen bilgilere göre farklı orijinli yabancı gernik genotipleri içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip SY60, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip ise Zavitan olmuştur. Makarnalık buğday genotipleri incelendiğinde Thallos transpozon elementinin metilasyon seviyesinin %56.04 ile %61.29 arasında değiştiği saptanmıştır. Çizelge 4.9.'da verilen bilgilere göre makarnalık buğday genotipleri içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip Karakılçık88 olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. Yabancı Gernik ve Makarnalık Buğday Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre Thallos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri

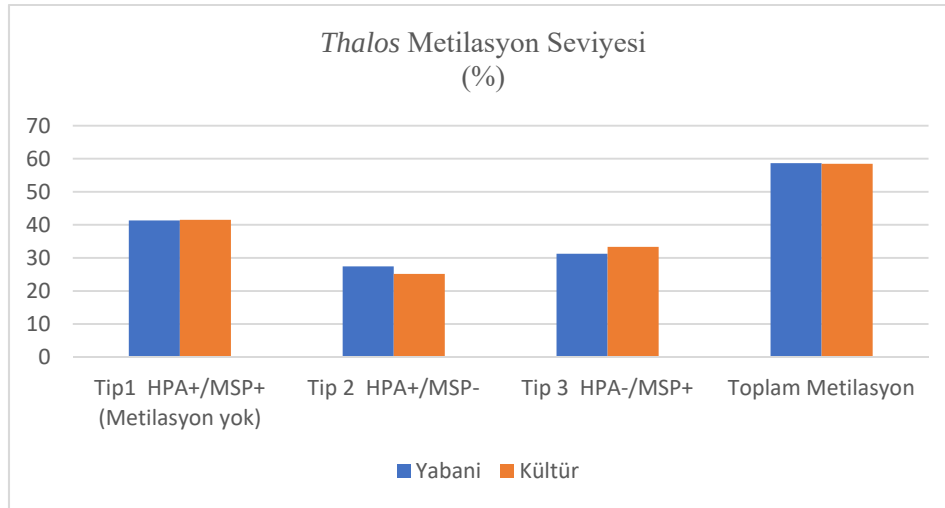
Yabancı gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin Thallos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna ait metilasyon tiplerine göre elde edilen metilasyon seviyeleri detaylı olarak Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Yabancı ve kültür makarnalık buğday popülasyonları arasında Thallos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Thallos/(HM)-TCAG	Yabancı (%)	Kültür (%)
Tip 1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	41.336	41.509
Tip 2 HPA+/MSP-	27.425	25.137
Tip 3 HPA-/MSP+	31.239	33.354
Toplam Metilasyon	58.664	58.491

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, "Thallos/(HM)-TCAG" primer kombinasyonuna göre yabancı gernik genotip lokuslarının %41.336'sı metillenmemişken, makarnalık buğday genotip lokuslarının %41.509'u metillenmemiştir. Tip 2 metilasyonu açısından, yabancı gernik genotip lokuslarının %27.425'i metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %25.137'si metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından yabancı gernik genotip lokuslarının %31.239'u metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %33.354'ü metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, yabancı gernik

genotip lokuslarının %58.664'ü metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %58.491'inin metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu verilerin sonucunda “Thalos/(HM)-TCAG” primeri çifti için yabancı gernik ve makarnalık buğday popülasyonları karşılaştırıldığında Tip2 ve Tip3 metilasyon seviyeleri birbirinden farklılık göstermesine rağmen toplam metilasyon seviyelerinin çok yakın değerlerde olduğu görülmektedir (Şekil 4.9.). Venetsky ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada Thalos elementinin ortalama metilasyon seviyesinin yabancı gernikte %54 makarnalık buğdayda ise %36 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular yabancı gernik popülasyonunun ortalama metilasyon seviyesi ile Venetsky ve ark, (2015) 'nın bildirdiği bulgular uyumluluk gösterirken, makarnalık buğday popülasyonları için farklılık göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan makarnalık buğday genotipleri ile Venetsky ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada kullandıkları makarnalık buğday genotiplerinin farklı olması transpozonlarda epigenetik varyasyonun kültür buğdaylarında da oldukça geniş olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.9. Yabancı ve kültür makarnalık buğday genotipleri arasında “Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

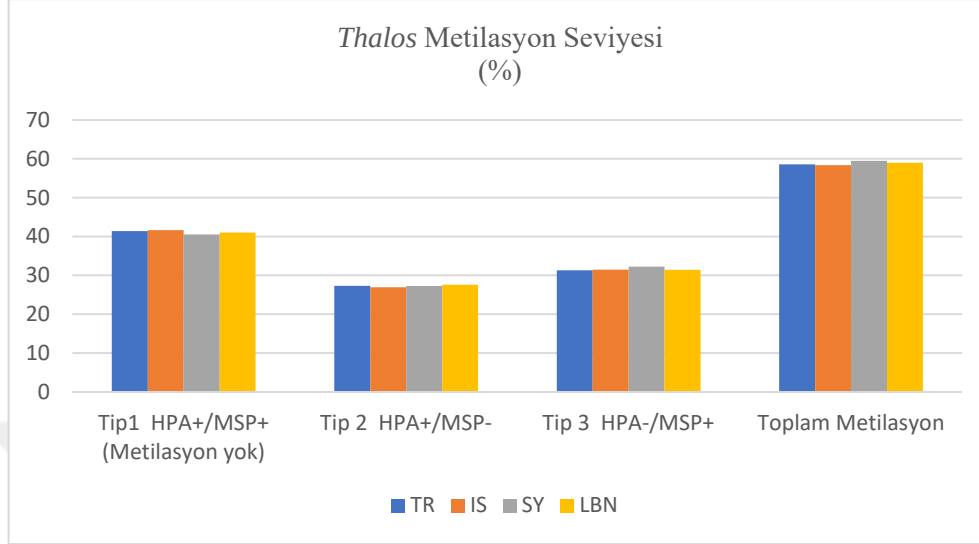
4.2.3. Farklı Orijinli Yabani Gernik Popülasyonlarının Metilasyon Tiplerine Göre Thalos Transpozonu Metilasyon Seviyeleri

Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik genotipleri arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre metilleşme seviyeleri Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik popülasyonları arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

Thalos/(HM)-TCAG	TR (%)	IS (%)	SY (%)	LBN (%)
Tip1 HPA+/MSP+ (Metilasyon yok)	41,408	41,626	40,515	41,018
Tip 2 HPA+/MSP-	27,308	26,910	27,245	27,566
Tip 3 HPA-/MSP+	31,284	31,464	32,240	31,416
Toplam Metilasyon	58,592	58,374	59,485	58,982

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi, Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunda Türkiye orijinli genotip lokuslarının %41.408’i, İsrail orijinli genotip lokuslarının %41.626’sı, Suriye orijinli genotip lokuslarının %40.515’i ve Lübnan orijinli genotip lokuslarının %41.018’i metillenmemiştir. Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotip lokuslarının %27.308’i, İsrail orijinli genotip lokuslarının %26.910’u, Suriye orijinli genotip lokuslarının %27.245’i ve Lübnan orijinli genotip lokuslarının %27.566’sının metillenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotip lokuslarının %31.284’ü, İsrail orijinli genotip lokuslarının %31.464’ü, Suriye orijinli genotip lokuslarının %32.240’ı ve Lübnan orijinli genotip lokuslarının %31.416’sının metillenmiş olduğu görülmektedir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, Türkiye orijinli genotip lokuslarının %58.592’si, İsrail orijinli genotip lokuslarının %58.374’ü, Suriye orijinli genotip lokuslarının %59.485’i ve Lübnan orijinli genotip lokuslarının %58.982’si metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY) ve Lübnan (LB) orijinli yabancı gernik popülasyonları arasında Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun metilasyon tiplerine göre seviyeleri

4.2.4. Yabancı Gernik ve Makarnalık Buğday genotiplerinin Thalos Transpozonu Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi

Yabancı gernik ve makarnalık buğday genotiplerinin “Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonuna göre toplam lokus sayısı, analiz edilen genotip sayısı, metilasyona duyarlı lokus sayısı, metillenmemiş lokus sayısı, metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı, metillenmemiş polimorfik lokus sayısı bilgileri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi, “Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonu için 86 genotip analiz edilmiş, 280 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 164’ü metilasyona duyarlı 116’sı ise metillenmemiş olarak bulunmuştur. Metilasyona duyarlı lokusların 147’si polimorfik iken metillenmemiş lokusların 114’ünün polimorfik olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.12. Yabani gernik ve makarnalık buğday genotiplerine göre Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun lokus bilgileri

	Thalos/(HM)-TCAG
Lokus Sayısı	280
Genotip Sayısı	86
Yabani Gernik Genotip Sayısı	83
Makarnalık Buğday Genotip Sayısı	3
Metilasyona Duyarlı Lokus Sayısı	164
Metillenmemiş Lokus Sayısı	116
Metilasyona Duyarlı Polimorfik Lokus Sayısı	147
Metillenmemiş Polimorfik Lokus Sayısı	114
T.K= Tüm Primer Kombinasyonları	

Yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonları arasında ve popülasyonlar içerisinde Thalos transpozonu için metilasyon modellerinde farklılık olup olmadığını belirlemek ve farklılığın derecesini belirlemek amacıyla Moleküler Varyans (AMOVA) analizi yapılmıştır (Çizelge 4.13.). Çizelge 4.13. incelendiğinde Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.13. Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonlarının moleküler varyans analiz (AMOVA) sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
Populasyonlar Arası	1	49.58	49.58	3.835
Populasyon İçi	84	2300	27.38	27.38***
Toplam	85	2349	27.64	
Phi ST	0.1229 (P= 0.007)			

SD: Serbestlik Derecesi KT: Kareler Toplamı KO: Kareler Ortalaması Phi: Phi İstatistik katsayısı; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ hata sınırları içinde önemli

4.2.5. Yabani Gernik Popülasyonlarının Thalos Transpozonu Polimorfik Lokus Bilgileri ile Moleküler Varyans (AMOVA) Analizi

Farklı ülkelere ait yabani gernik buğday popülasyonlarının Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre toplam lokus sayısı, analiz edilen genotip sayısı, metilasyona duyarlı lokus sayısı, metillenmemiş lokus sayısı, metilasyona duyarlı polimorfik lokus sayısı, metillenmemiş polimorfik lokus sayısı bilgileri çizelge 4.14.'de verilmiştir. Eksik verilere sahip genotipler analize dahil edilmemiştir.

Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi, Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 82 genotip analiz edilmiş, 280 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 165'i metilasyona duyarlı 115'ininise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 147'si polimorfik iken metillenmemiş lokusların 112'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı ülkelere ait yabani gernik popülasyonlarına göre primer kombinasyonunun lokus bilgileri

	Thalos/(HM)-TCAG
Lokus Sayısı	280
Toplam Genotip Sayısı	82
Türkiye	49
İsrail	14
Lübnan	11
Suriye	8
Metilasyona Duyarlı Lokus Sayısı	165
Metillenmemiş Lokus Sayısı	115
Metilasyona Duyarlı Polimorfik Lokus Sayısı	147
Metillenmemiş Polimorfik Lokus Sayısı	112

T.K= Tüm Primer Kombinasyonları

Türkiye (TR), İsrail (IS), Suriye (SY), Lübnan (LB) popülasyonları arasında ve popülasyonlar içerisinde Thalos transpozonu için metilasyon modellerinde farklılık olup olmadığını belirlemek ve farklılığın derecesini

belirlemek amacıyla Moleküler Varyans(AMOVA) analizi yapılmıştır (Çizelge 4.15). Çizelge 4.15. incelendiğinde Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P<0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.15. Yabani ve kültür makarnalık buğday popülasyonlarının moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	Varyans
Populasyonlar Arası	3	139.6	46.54	1.235
Populasyon İçi	78	2086	26.74	26.74***
Toplam	81	2226	27.48	
Phi ST	0.04415 (P= 3e-04)			

SD: Serbestlik Derecesi KT: Kareler Toplamı KO: Kareler Ortalaması Phi: Phi İstatistik katsayısı; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ hata sınırları içinde önemli

TMD analizinden elde edilen bulgular incelendiğinde Thalos transpozonunu çevreleyen CCGG bölgelerinde DNA metilasyon varyasyonunun yüksek ve önemli olduğu saptanmıştır.

4.3. Neighbor-Joining (NJ) Analizi

Tüm primer kombinasyonlarından elde edilen veriler kullanılarak DARwin 6.0 paket programında Neighbor-Joining analizi yapılmıştır. Analiz yapılırken her bir primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* verileri ile ayrı olacak şekilde dendrogram oluşturulmuştur. Aynı kesim bölgesini tanıyan ama farklı metilasyon duyarlılıklarına sahip 2 izoşimer enzimin verileri ile oluşturulan dendogramlar değerlendirilmiştir.

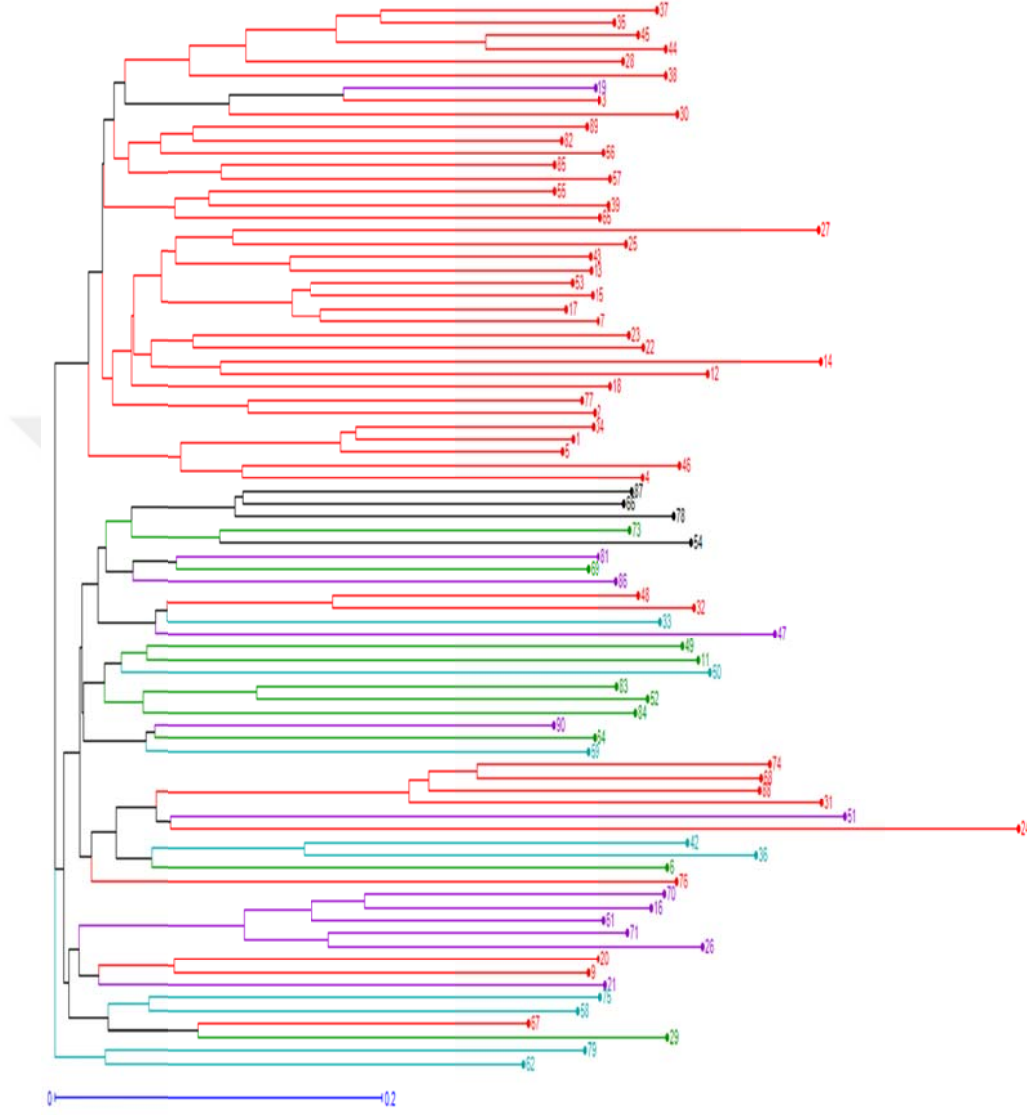
Genotiplerin coğrafi dağılımları harita üzerinden incelendiğinde 3 bölgede kümeleniği görülmektedir. Özellikle İsrail ve Lübnan ile Suriye genotiplerinin bazıları birbirlerine yakın bölgelerde dağılım göstermektedir. Bir diğer grubu ise Türkiye'nin Gaziantep-Maraş bölgesinde bulunan genotipler ile Suriye'nin kuzey bölgesinde bulunan birkaç Suriye genotipleri oluşturmaktadır. 3. Grubu ise

Mardin-Diyarbakır çevresinde gruplanmış genotipler oluşturmaktadır. Bu grubun içerisinde Siirt ve çevresine yakın bazı genotipler diğerlerine göre ayrı dağılım göstermiştir.

4.3.1. (E)ACT/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar

(E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* kesim enzimlerine göre oluşturulan dendogramlar sırasıyla Şekil 4.11 ve 4.12’de verilmiştir.

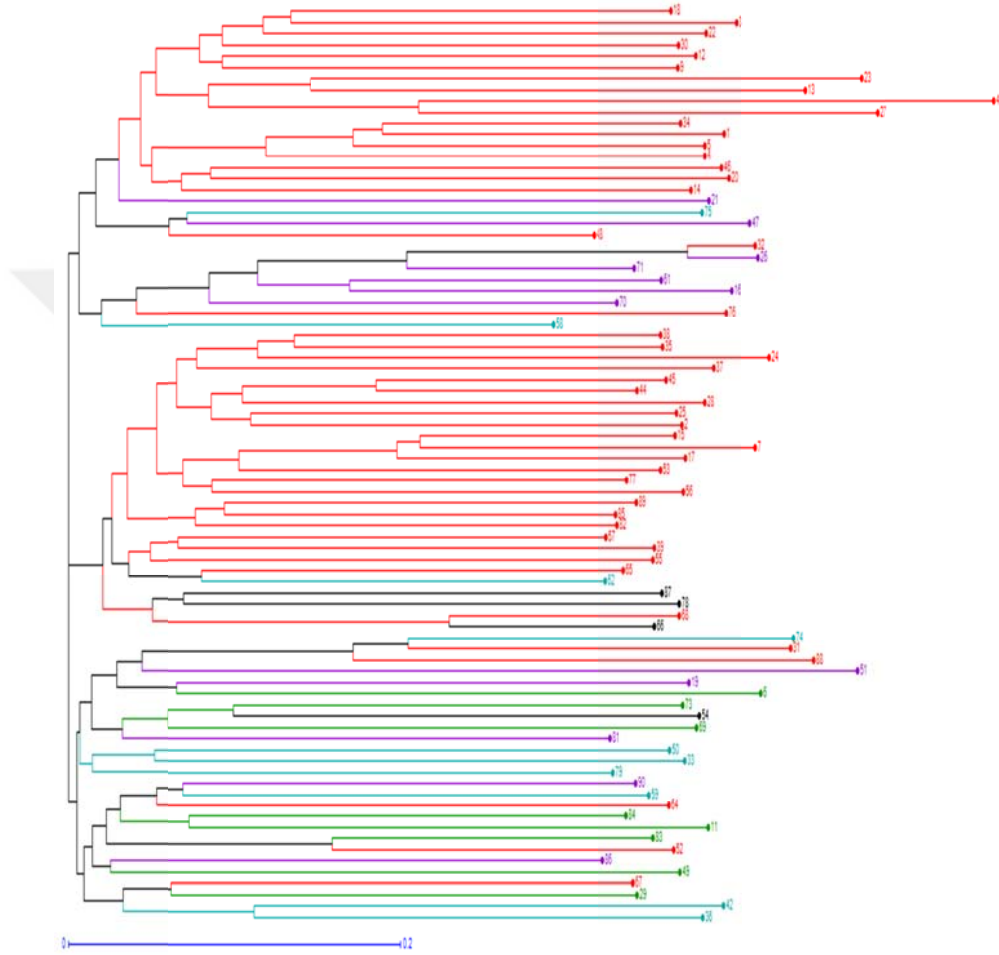
Şekil 4.11’de görüldüğü gibi, incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye orijinli genotipler bir gruba ayrılırken Lübnan, Suriye, İsrail orijinli genotipler diğer grubu oluşturmuştur. Bazı Türkiye orijinli genotipler diğer ülkelerle kümelenmiştir. SY62 ve SY79 bağımsız bir grup oluşturmuştur. 3 makarnalık buğday çeşidi ve ‘Zavitan’ aynı alt grup içerisinde yer almıştır.



Şekil 4.11. (E)ACT/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram
(Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye,
Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.12. incelendiğinde, dendogramda incelenen genotiplerin 3 ana gruba ayrıldığı, 2 grubu ağırlıklı olarak Türkiye genotipleri oluştururken 3. grupta çoğunlukla İsrail, Lübnan, Suriye genotipleri yer aldığı görülmektedir. Farklı bir

şekilde 6 Lübnan genotipi Türkiye genotipleri ile birlikte kümelenmiştir. Makarnalık buğday genotipleri ise Türkiye genotipleri ile kümelenmiştir.



Şekil 4.12. (E)ACT/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendrogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

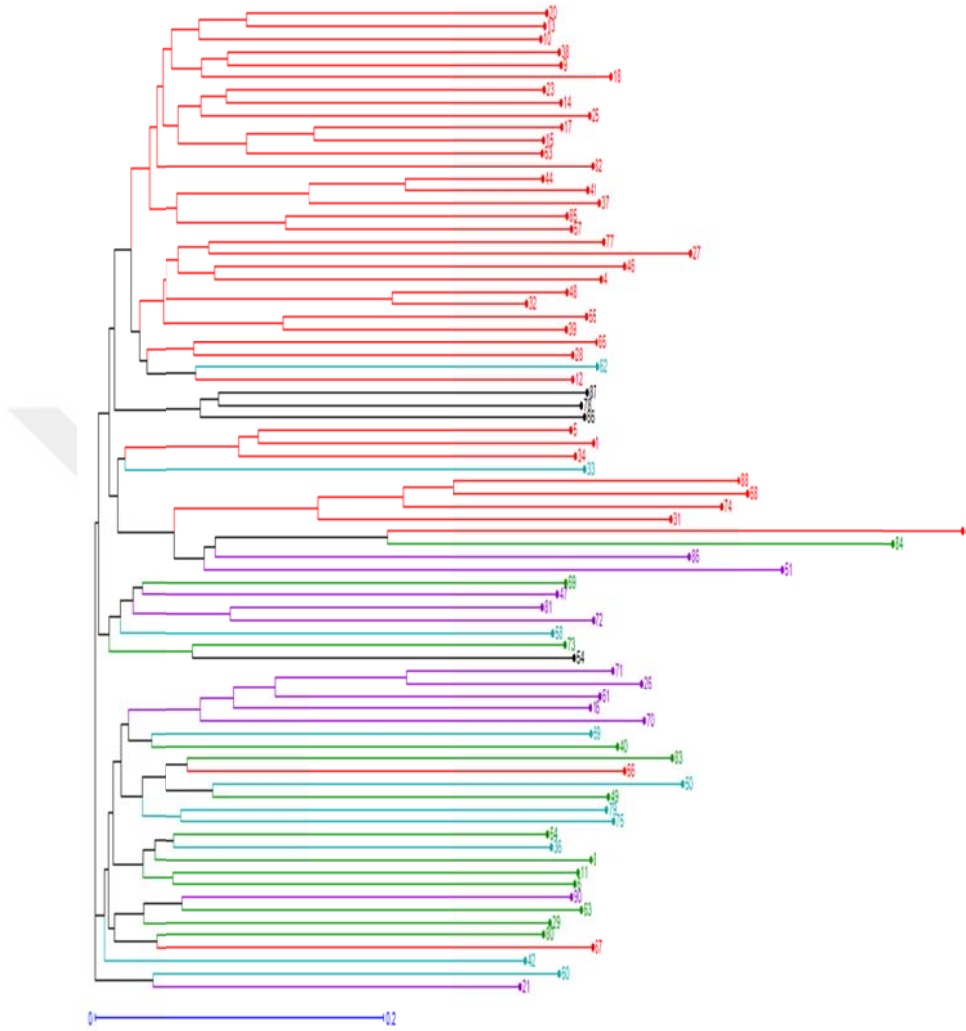
Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 birlikte incelendiğinde, makarnalık buğday genotipleri bir arada kümelenmişken Zavitan genotipinin *MspI* reaksiyonu için İsrail genotipleriyle bir arada kümelendiği görülmektedir. *MspI* reaksiyonunda (E)ACT/(M)-TCAG primer kombinasyonu için TR68 genotipinin metilasyon

seviyesi %80.09 iken metilasyon seviyesi düşük olan makarnalık buğdaylarla beraber kümelenmiştir. *HpaII* reaksiyonunda ise TR68 genotipi keni mikroçevresinde bulunan genotipler ile bir arada kümelenmiştir. (E)ACT/(M)-TCAG primer kombinasyonu için *HpaII* (CHG metilasyon durumu) ve *MspI* (CG metilasyon durumu) dendogramlarına göre hem popülasyon içi hem de popülasyonlar arası epigenetik varyasyonun yüksek olduğu, metilasyon modellerinin popülasyona özgü olduğu ifade edilebilir.

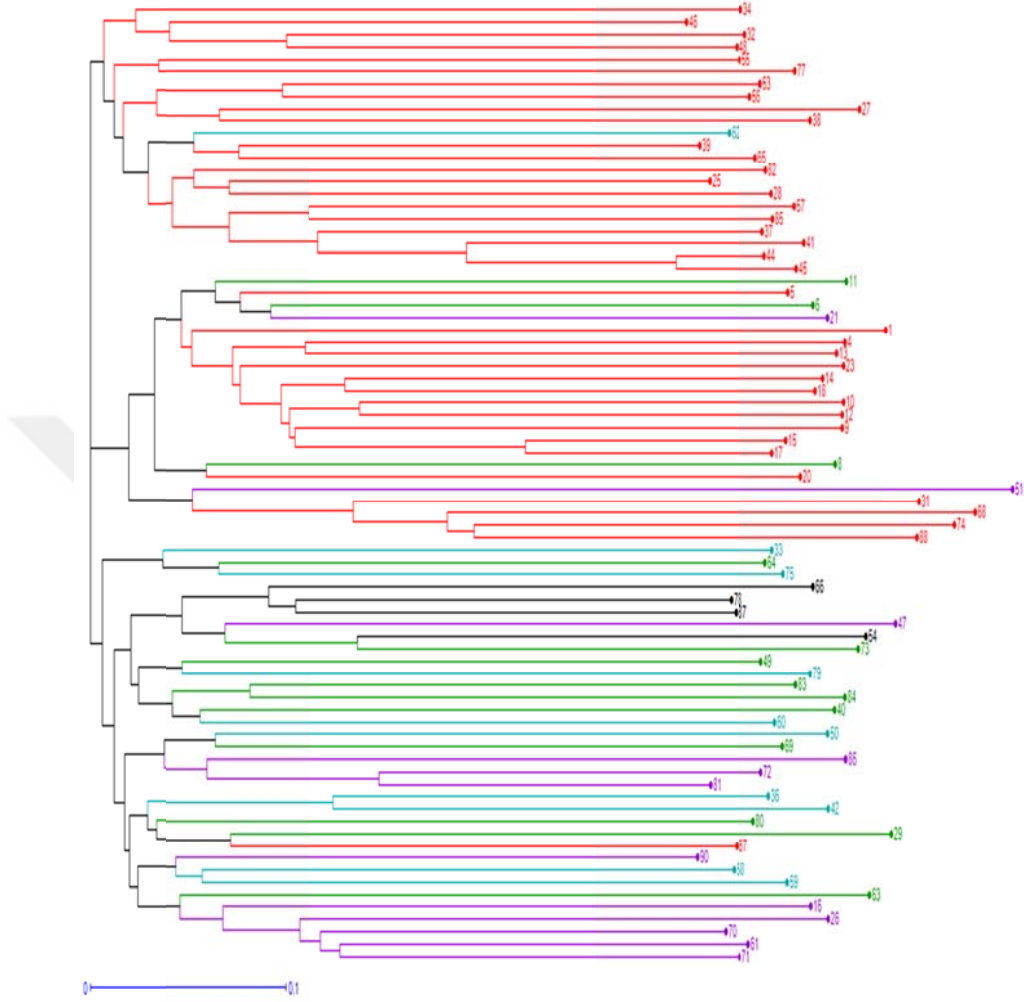
4.3.2. (E)AGC/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar

(E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* kesim enzimlerine göre oluşturulan dendogramlar sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14'de verilmiştir.

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi incelenen geneotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye orijinli genotipler bir ana grup içerisinde yer almış, bu grupta Lübnan ve İsrail genotiplerinin bazıları da kümelenmiştir. Makarnalık buğday genotipleri Türkiye orijinli genotiplerin yoğun olarak kümelendiği ana grup içerisinde başka bir kola ayrılarak bir arada bulunmaktadır.



Şekil 4.13. (E)AGC/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendrogram (Kırmızı :Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)



Şekil 4.14. (E)AGC/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendrogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

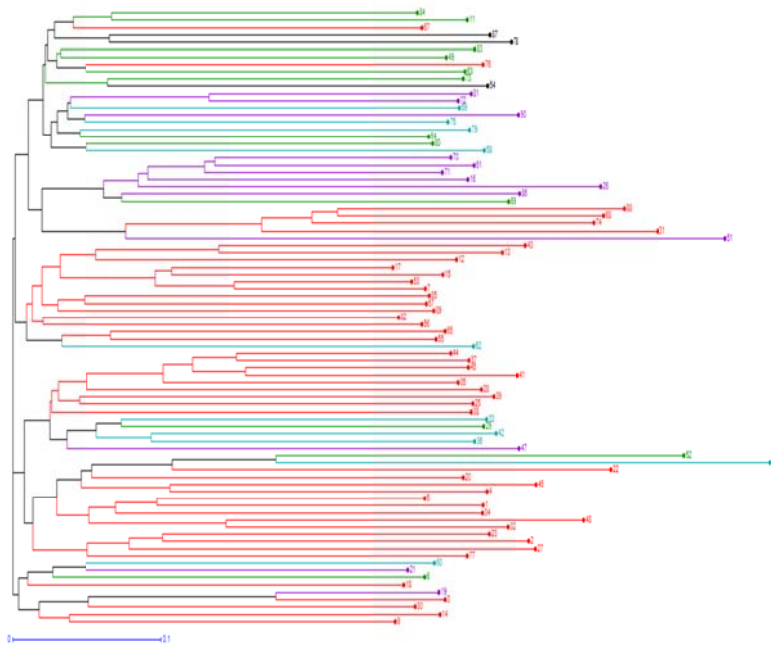
Şekil 4.14’de görüldüğü gibi incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. 2 grubu ağırlıklı olarak Türkiye orijinli genotipler oluşturmuştur. SY62 genotipi her 2 kesim enziminde de Türkiye grubunun içerisinde yer almıştır.

Şekil 4.13. ve Şekil 4.14. birlikte incelendiğinde, makarnalık buğdayların iki dendrogramda da bir arada kümelendiği görülmektedir. Bununla birlikte makarnalık buğdaylar *HpaII* kesim durumuna göre(CHG) Türkiye

popülasyonlarının içerisinde yer alırken, *MspI* kesim durumuna göre(C'G) Lübnan, İsrail ve Suriye popülasyonu ile aynı grup içerisinde yer almıştır. Bu durum (E)AGC/(M)-TCAG primer kombinasyonunda makarnalık buğdaylar arasında epigenetik varyasyon yüksek olmasa da tüm popülasyonlarla karşılaştırıldığında epigenetik varyasyonun yüksek olabileceği şeklinde açıklanabilir.

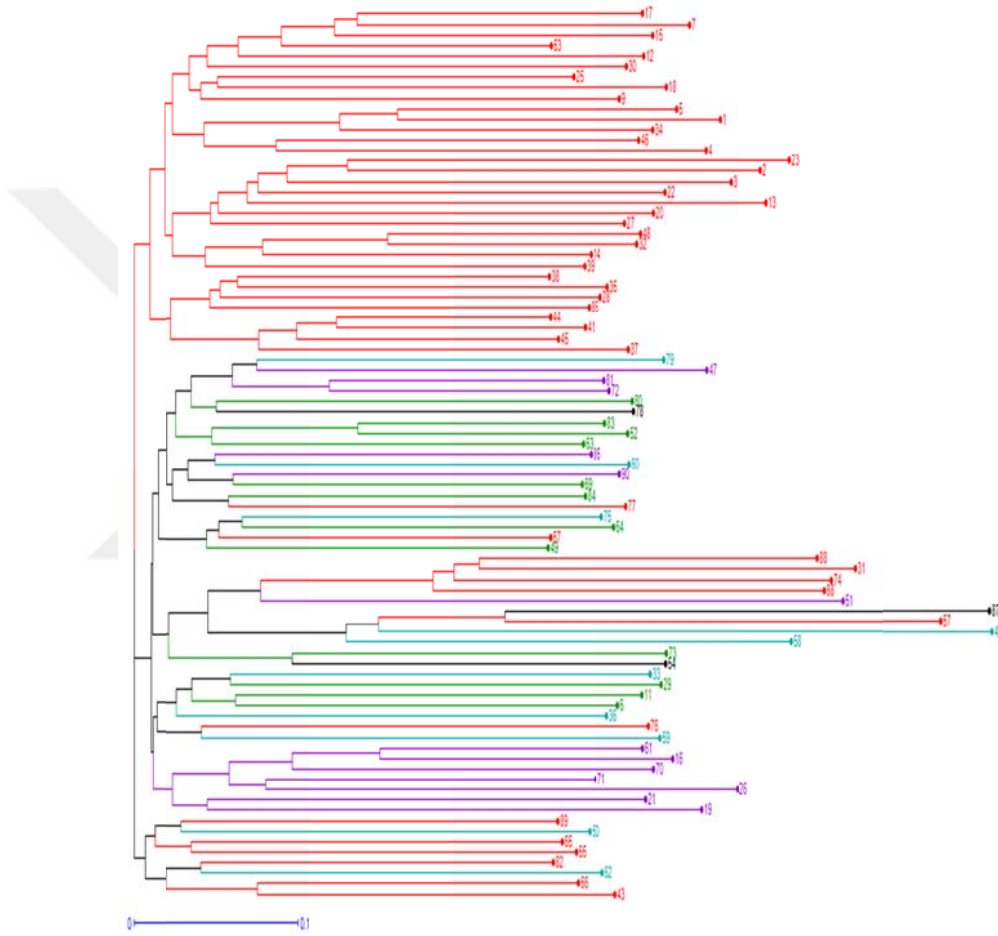
4.3.3. (E)ACG/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar

(E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* kesim enzimlerine göre oluşturulan dendogramlar sırasıyla Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.15. (E)ACG/(H)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.15’de görüldüğü gibi, incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotipleri 3 ana grup içerisinde dağılım göstermiş, alt gruplar içerisinde bir arada kümelenmiştir. Svevo(62) Türkiye genotipleri ile kümelenirken, Karakılçık88(78) ve Çeşit 4(87) farklı bir grupta yer almıştır.



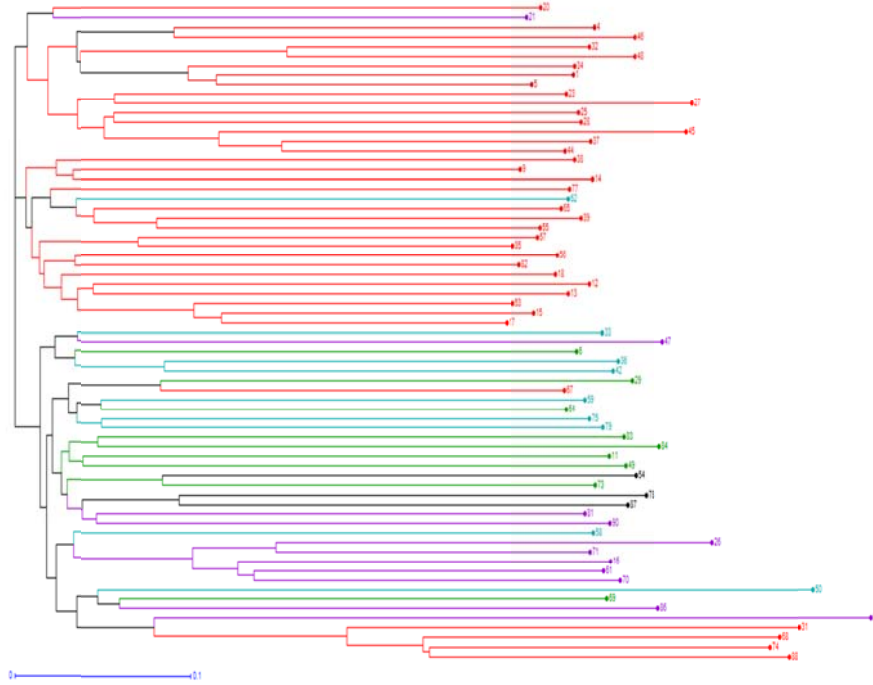
Şekil 4.16. (E)ACG/(M)-TCAG Primer Kombinasyonuna ait dendrogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.16. incelendiğinde, incelenen genotiplerin dendrogramda 3 ana gruba ayrıldığı, bir grubu Türkiye genotiplerinin oluşturduğu görülmektedir. Diğer iki grup

içerisinde genotipler orijinlerine göre alt gruplar halinde kümelenmiştir. Makarnalık buğdaylar aynı ana grup içerisinde birbirinden farklı alt gruplarda kümelenmiştir.

4.3.4. Tüm Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar

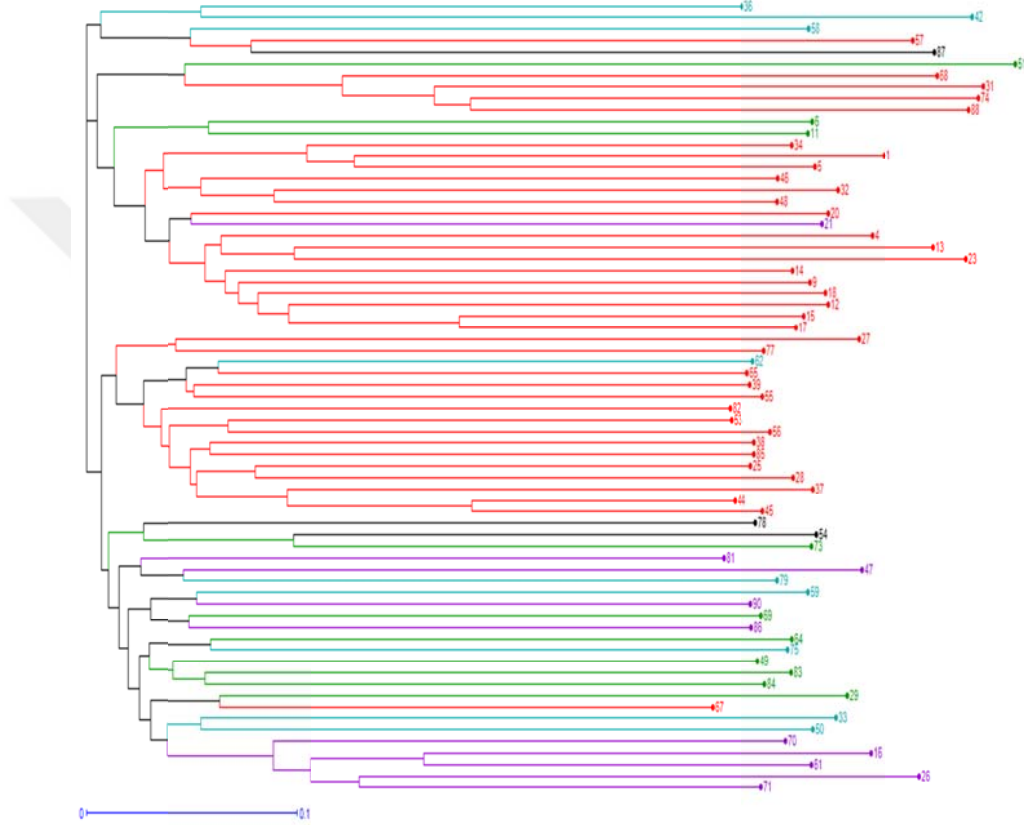
“(E)ACT/(HM)-TCAG”, “(E)AGC/(HM)-TCAG”ve “(E)ACG/(HM)-TCAG” primer kombinasyonlarının *HpaII* ve *MspI* kesim enzimlerine göre oluşturulan dendogramlar sırasıyla Şekil 4.17 ve 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.17. Tüm Primer Kombinasyonun *HpaII* verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi, incelenen genotipler dendogramda 3 ana gruba ayrılmış, 2 grubu Türkiye genotipleri oluşturmuştur. Farklı bir şekilde LB21 ve SY62 genotipleri Türkiye orijinli genotipler ile birlikte kümelenmiştir. TR31,

TR68, TR74, TR88 genotipleri Türkiye genotiplerinden ayrı bir şekilde kümelenmiştir. TR67 genotipi İsrail, Lübnan, Suriye grubu içerisinde kümelenmiştir.



Şekil 4.18. Tüm Primer Kombinasyonun *Msp* verilerine ait dendogram (Kırmızı: Türkiye; Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

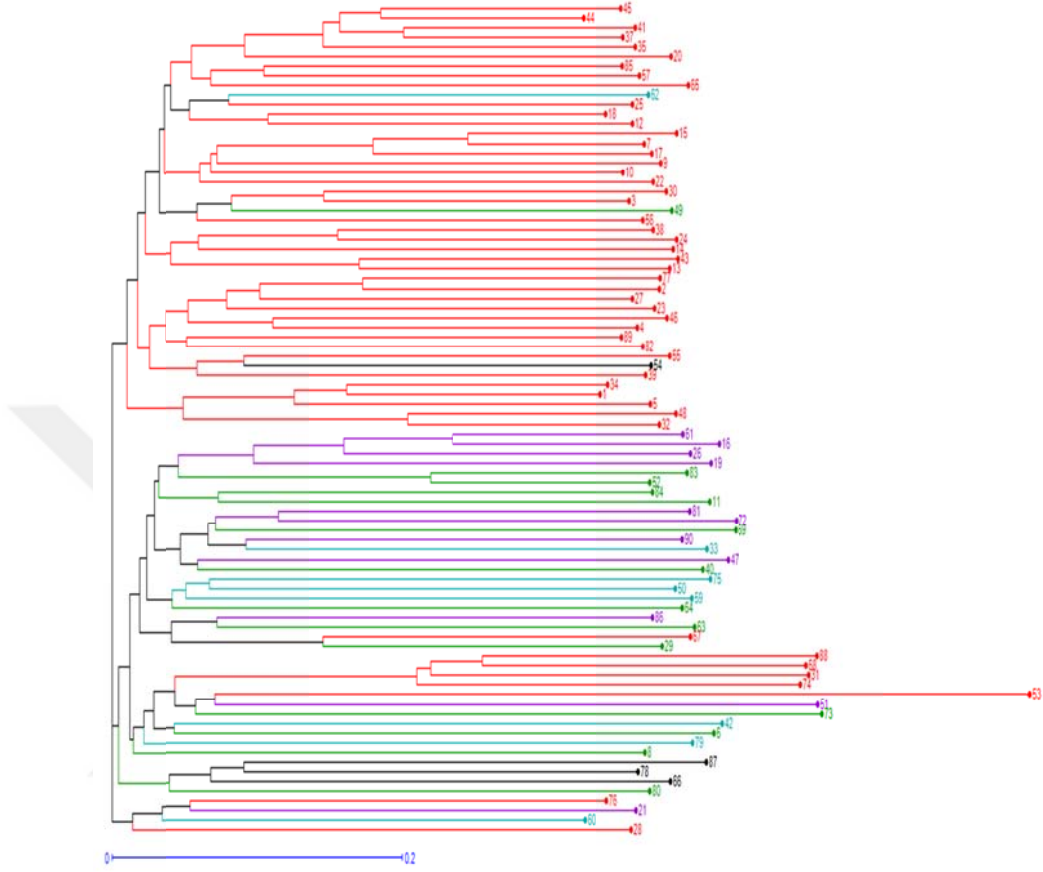
Şekil 4.18. incelendiğinde, incelenen genotiplerin dendogramda 3 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Türkiye genotiplerinin bir kısmı Lübnan, Suriye, İsrail genotipleriyle aynı ana grupta alt bir grup oluşturmuştur. SY62 genotipi Türkiye alt gurubu içerisinde yer almıştır.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde popülasyonların metilasyon seviyelerinin birbirine yakın olsa da metilasyon modellerinin oldukça farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. İzosimer olan *HpaII* ve *MspI* enzimlerinin metilasyona karşı duyarlılıklarının farklı olmasından dolayı aynı primer kombinasyonuna ait dendogramlar farklılıklar gösterebilmektedir. Tüm dendogramlar göz önüne alındığında genellikle Türkiye genotipleri bir arada gruplanırken, Suriye, İsrail ve Lübnan genotiplerinin ayrı olarak gruplandığı ortaya çıkmaktadır. Coğrafi olarak Lübnan, İsrail ve Suriye genotiplerinin bir kısmı yakın bölgelerde dağılım göstermiştir. Çevre koşulları da göz önüne alındığında bu popülasyonların dendogramlarda bir arada dağılım göstermesinin olağan olduğu öngörülmektedir. Türkiye genotipleri içerisinde Siirt ve çevresinde coğrafi dağılım gösteren TR68, TR74 ve TR88 genotiplerinin dendogramlarda bulundukları konum sebebiyle epigenetik yanıtı belirleyen faktörlerin anlaşılmasında ileriki çalışmalarda kullanılmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Kahramanmaraş çevresinde coğrafi dağılım gösteren TR31 genotipinin Siirt ve çevresinde dağılım gösteren genotipler ile bir arada kümelenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte LB21 ve SY62 genotipleri coğrafi bölgelerinden bağımsız bir dağılım göstermesinden dolayı bu genotiplerin metilasyon modellerinin yapısının ve kapsamının değerlendirilebilmesi için farklı çevre koşullarına karşı metilasyon tepkilerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Venetsky ve ark, (2015) İsrail orjinli yabancı gernik popülasyonlarında Neighbor-Joining analizi ile metilasyon yapısını belirlemişler, DNA metilasyon modellerinin genellikle popülasyona özgü olduğunu ve kalıtsal olarak aktarıldığını ifade etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada Venetsky ve ark, (2015) aynı arazi şartlarında iki yıl ekim yapmışlar ve bu yıllar arasında metilasyon modellerinde önemli bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. Venetsky ve ark, (2015) Amiad popülasyonuna ait genotiplerin bir kısmının Tabgha popülasyonu ile birlikte kümelenmesinin nedeninin epigenetik varyasyonun yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada araştırılan popülasyonların Venetsky ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada araştırdıkları popülasyonlara göre çok daha geniş bir coğrafi

alanda dağılım göstermesinden dolayı epigenetik varyasyonun yüksek olabileceği ve bazı genotiplerin orijinlerinden bağımsız şekilde metilasyon modeli oluşturabileceği düşünülmektedir. Venetsky ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada bazı genotiplerin doğal çevre koşullarından farklı şartlarda yetiştirilmesinin farklı epigenetik yanıtlar oluşturabileceğini, bu durumun da yüksek epigenetik varyasyona neden olabileceğini ifade etmiştir.

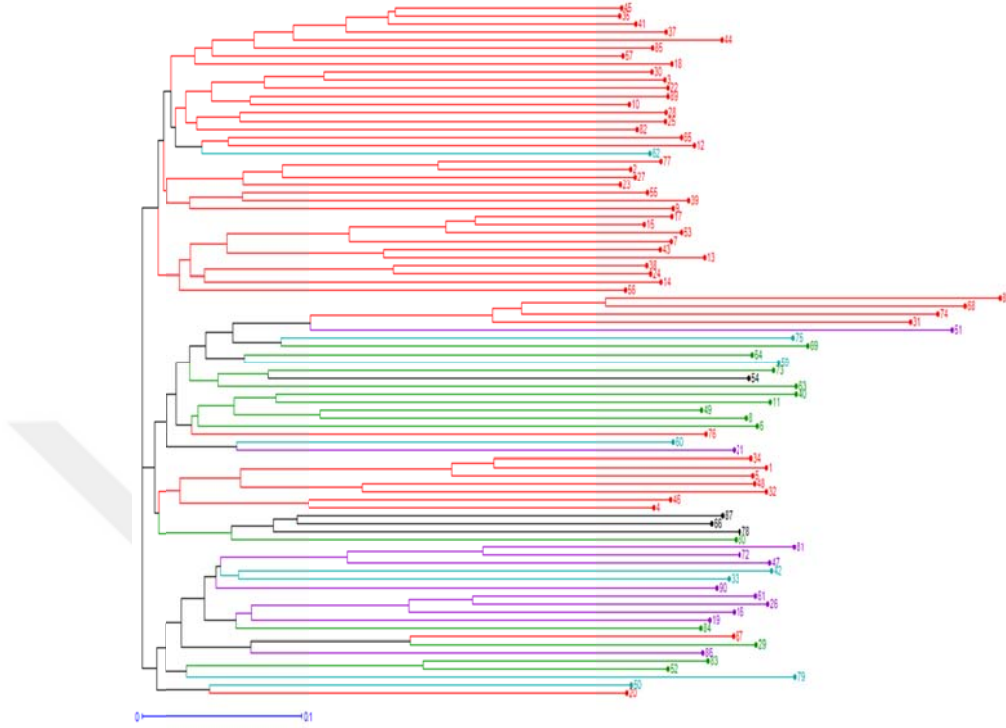
4.3.5. Thalos/(HM)-TCAG Primer Kombinasyonuna Ait Dendogramlar

“(Thalos/(HM)-TCAG)” primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* kesim enzimlerine göre oluşturulan dendogramlar sırasıyla Şekil 4.19 ve 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.19. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna HpaII verilerine ait dendrogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.19’de görüldüğü gibi, incelenen genotipler dendrogramda 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye orijinli genotipler genellikle bir ana grup altında kümelenmiştir. TR88, TR68, TR74, TR31, TR53 genotipleri Suriye, Lübnan, İsrail orijinli genotipler ile aynı ana grupta yer almıştır. IS49 ve SY62 genotipleri Türkiye grubu içerisinde yer almıştır.



Şekil 4.20. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna MspI verilerine ait dendrogram (Kırmızı: Türkiye, Yeşil: İsrail, Mor: Lübnan, Turkuaz: Suriye, Siyah: Makarnalık çeşitler ve Zavitan genotipini ifade etmektedir)

Şekil 4.20. incelendiğinde, incelenen genotiplerin dendogramda 3 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Türkiye genotipleri bir ana grubu oluştururken, Türkiye genotiplerinin bazıları diğer ana gruplara dağılmıştır. SY62 genotipi Türkiye grubu içinde yer almıştır.

Şekil 4.19. ve Şekil 4.20. dendogramları birlikte incelendiğinde, Türkiye orijinli genotiplerin bir ana grubu oluşturduğu ortaya çıkmaktadır. MSAP sonuçlarında olduğu gibi TR31, TR68, TR74, TR88 genotipleri Türkiye genotiplerinden ayrı bir şekilde kümelenmiştir. Siirt ve çevresinde coğrafi dağılım gösteren TR68, TR74, TR88 genotipleri ile Kahramanmaraş çevresinde coğrafi dağılım gösteren TR31 genotipinin bütün dendogramlarda beraber yer alması ve orijinlerinden farklı

metilasyon modeli sergilemesi bu genotiplerin DNA metilasyon modelinin ve Thalos transpozunu metilasyon modelinin çevresel faktörlerle olan ilişkisinin anlaşılabilmesinde ileriki çalışmalar için önem arz etmektedir. Bununla birlikte MSAP sonuçlarında olduğu gibi Thalos elementi için de SY62 genotipi Türkiye grubu içerisinde yer almıştır. SY62 genotipinin yüksek seviyede epigenetik varyasyon oluşturduğu düşünülmektedir. Thalos elementinin çevreleyen ‘CCGG’ bölgelerinin metilasyon modellerinin orijinlerine özgü olduğu söylenebilmektedir.

Genomik DNA’nın metilasyon seviyesinin Thalos transpozunu çevreleyen ‘CCGG’ bölgelerinin metilasyon seviyesi ile yakın seviyelerde olması metilasyonun sadece transpozonlar üzerinde değil genomik DNA’nın tamamında rol aldığını ve epigenetik yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur. Venetsky ve ark, (2015) MSAP ve TMD analizlerini kullanarak yabancı genotip popülasyonlarının metilasyon durumlarını inceledikleri çalışmada, genomik DNA’nın metilasyon seviyesinin Thalos elementinin metilasyon seviyesinden de yüksek olabildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular transpozonların metilasyon modelinin genellikle popülasyona özgü olsada bitkinin yetiştirildiği arazi koşulları gibi farklı çevresel koşullarla da varyasyon gösterebildiğini ortaya koyabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER**5.1. MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) Analizi**

3 adet primer çifti kombinasyonu kullanılarak 87 adet yabancı gernik ve 3 adet makarnalık buğday genotipi MSAP yöntemine göre analiz edilmiş olup elde edilen araştırma bulguları maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

1. Yabancı gernik genotipleri içerisinde (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %45.54 ile %93.1 arasında, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %50 ile %92.31 arasında, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %48.5 ile %84.87 arasında, tüm primer kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesi %49.74 ile %90.48 arasında değişmiştir.
2. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR43 olduğu, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin TR45 olduğu, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin LB61, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin SY42 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin TR74, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise TR24 olduğu belirlenmiştir.
3. Makarnalık buğday genotiplerinin (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %62.65 ile %48.15 arasında, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %63.41 ile %52.50 arasında, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesinin %78.63 ile %56.89 arasında, tüm primer

kombinasyonlarının ortalaması için metilasyon seviyesinin ise %53.21 ile %63.40 arasında değiştiği belirlenmiştir.

4. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo olduğu, (E)-AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Çeşit4 olduğu, (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin ise Çeşit4 olduğu saptanmıştır. Tüm primerlerin ortalaması dikkate alındığında en düşük metilasyon seviyesine sahip genotipin Karakılçık88, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotipin Çeşit4 olduğu belirlenmiştir.
5. (E)-ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyon durumuna göre yabani gernik genotiplerinde lokusların %40.808'i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %35.268'i metillenmiştir. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde ise bu durum %23.063 ve %17.388 olarak bulunmuştur. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde yabani gernik genotiplerinde lokusların %63.871 'i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %52,806'sı metillenmiştir. Metilasyona uğramayan lokuslar yabani gernik genotipleri için %36.129 seviyesinde iken, makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %47,344'lük kısmını kapsamaktadır. Bu verilere göre "(E)-ACT/(HM)-TCAG" primeri çifti için yabani gernik popülasyonlarının makarnalık buğday popülasyonlarına göre metilasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.
6. "(E)-AGC/(HM)-TCAG" primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyonu açısından yabani gernik genotiplerinde lokusların %37.673'ü, makarnalık buğday genotiplerinde ise lokusların %32.256'sı metillenmiştir. Tip 3

metilasyonu açısından, yabani gernik genotiplerinde lokusların %29.702 ‘si metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %24.901’i metillenmiştir. Bu durum toplam metilasyon durumu için değerlendirildiğinde yabani gernik genotiplerinde lokusların %67.375’inin, makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %57.157’sinin metillenmiş olduğu anlaşılmıştır. Metilasyona uğramayan lokuslar ise yabani gernik genotipleri için %32.625’lik bir kısmı kapsarken makarnalık buğday genotipleri için lokusların %42.,843’ünü oluşturmuştur. Bu verilere göre “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primeri çifti için yabani gernik popülasyonlarının makarnalık buğday popülasyonlarına göre metilasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

7. (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik genotiplerinde lokusların %34.945’i metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %52.480’inin metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik genotiplerinde lokusların %25.396’sı metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %15.276’sının metillenmiş olduğu anlaşılmıştır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, yabani gernik genotiplerinin lokuslarının %60.342’si metillenmişken makarnalık buğday genotiplerinin lokuslarının %67.756’sının metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Yabani gernik genotiplerinde lokusların %39.658’unda metilasyon durumu bulunmazken, makarnalık buğday genotiplerinde lokusların %32.244’u metilasyon durumu içermemektedir.
8. Tüm primer kombinasyonlarının ortalamasına göre Tip 2 metilasyon açısından, yabani gernik genotiplerinde lokusların %37.809’ü makarnalık buğday genotipinde ise %40.001’i metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından, yabani gernik genotiplerinin lokuslarının %26.054’ü makarnalık buğday genotiplerinde ise %19.188’i metillenmiştir. Toplam metilasyon

durumu incelendiğinde, yabancı gernik genotiplerinde lokusların %63.863'ü makarnalık buğday genotiplerinde ise lokusların %59.240'ının metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Yabancı gernik genotiplerinde lokusların %36.137'sinde metilasyon durumu oluşmazken, makarnalık buğday genotiplerinde bu durum %40.810'luk seviyede olduğu sonucuna varılmıştır.

9. “(E)-ACT/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunda Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %40.821'i, İsrail orijinli genotiplerde %40.180'i, Suriye orijinli genotiplerde %40.273'u, Lübnan orijinli genotiplerde %40.336'ünün metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Tip 3 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %23.096'i, İsrail orijinli genotiplerde %23.854'ü, Suriye orijinli genotiplerde %21.738'u, Lübnan orijinli genotiplerde ise %22.834'ü metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %63.917'si, İsrail orijinli genotiplerde %64.034'ü, Suriye orijinli genotiplerde %62.011'u, Lübnan orijinli genotiplerde ise %63.170'inin metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %36.083'ü, İsrail orijinli genotiplerde %35.966'sı, Suriye orijinli genotiplerde %37.989'u, Lübnan orijinli genotiplerde %36.833'ünde metilasyon durumları bulunmamaktadır.
10. “(E)-AGC/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunda ise Tip 2 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %37.588'i, İsrail orijinli genotiplerde %37.551'i, Suriye orijinli genotiplerde %37.193'ü, Lübnan orijinli genotiplerde %37.317'si metillenmiştir. Tip 3 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %29.826'sı, İsrail orijinli genotiplerde %29.826'sı, Suriye orijinli genotiplerde %30.401'i ve Lübnan orijinli genotiplerde ise %30.138'i metillenmiştir. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, Türkiye orijinli

genotiplerde lokusların %67.250'si, İsrail orijinli genotiplerde lokusların %67.377'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %67.594'ü, Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %67.455'i metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır. Metilasyon durumu içermeyen lokuslar ise Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %32.750, İsrail orijinli genotiplerde %32.623, Suriye orijinli genotiplerde %32.406, Lübnan orijinli genotiplerde %32.545'lik bir kısmı oluşturmaktadır.

11. (E)-ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonunda Türkiye orijinli genotiplerde lokusların %39.675'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %39.344'ü, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %39.303'ü ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %39.619'u metillenmemiştir. Tip 2 metilasyonu açısından Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %34.952'sini kapsarken, İsrail orijinli genotiplerde %35.054'ünü, Suriye orijinli genotiplerde %33.916'sını ve Lübnan orijinli genotiplerde %33.809'unu kapsamaktadır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %25.374'ü, İsrail orijinli genotiplerde %25.602'si, Suriye orijinli genotiplerde %26.781'i ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %26.572'si metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %60.325'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %60.656'ü, Suriye orijinli genotiplerde %60.697'si ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %60.381'inin metillenmiş olduğu ortaya çıkmaktadır.
12. Tüm primer kombinasyonlarının ortalaması değerlendirildiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %36.169'u, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %35.978'i, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %36.566'sı ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %36.331'inde metilasyon olduğu ortaya çıkmıştır. Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %37.787'si, İsrail

orijinli genotiplerde lokuslarının %37.595'i, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %37.127'u ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %37.154'ünün metillendiği ortaya çıkmıştır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %26.044'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %26.427'si, Suriye orijinli genotiplerde lokuslarının %26.307'si ve Lübnan orijinli genotiplerde lokuslarının %26.515'sinin metillenmiş olduğu saptanmıştır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde Türkiye orijinli genotiplerde lokuslarının %63.831'i, İsrail orijinli genotiplerde lokuslarının %64.022'si, Suriye orijinli genotiplerde lokusların %63.434'ü ve Lübnan orijinli genotiplerde lokusların %63.669'u metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır.

13. Tüm kombinasyonlar için Tip 2 metilasyon seviyesinin Tip 3 metilasyon seviyesinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Farklı ülke orijinli yabancı genetik popülasyonlarının ortalama metilasyon seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.
14. (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 82 genotip analiz edilmiş, 270 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 175'i metilasyona duyarlı 95'inin ise metillenmemiş lokus olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 160'ı polimorfik iken metillenmemiş lokusların 94'ü polimorfik olarak bulunmuştur.
15. (E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 78 genotip analiz edilmiş, 244 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 180'i metilasyona duyarlı 64'ünün ise metillenmemiş olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 154'ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların 63'ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir.
16. (E)ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 85 genotip analiz edilmiş, 360 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 279'u metilasyona duyarlı 81'inin ise metillenmemiş olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı

lokusların 263'ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların tamamının polimorfik olduğu bulunmuştur.

17. Tüm kombinasyonlardan elde edilen lokusların verileri birleştirilerek analiz edildiğinde 69 genotip için toplam 874 lokus elde edilmiş, bu lokusların 645'i metilasyona duyarlı 229'unun ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 584'ü polimorfik iken metillenmemiş lokusların 225'i polimorfik olduğu saptanmıştır.
18. (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 78 genotip analiz edilmiş, 270 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 171'i metilasyona duyarlı 99'unun ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 155'i polimorfik iken metillenmemiş lokusların 97'si polimorfik olduğu saptanmıştır.
19. (E)AGC/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 74 genotip analiz edilmiş, 244 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 188'i metilasyona duyarlı 56'sinin ise metillenmemiş lokus olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 161'i polimorfik iken metillenmemiş lokusların 55'i polimorfik olduğu sonucuna saptanmıştır.
20. (E)ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 82 genotip analiz edilmiş, 360 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 280'i metilasyona duyarlı 80'nini ise metillenmemiş olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 262'si polimorfik iken metillenmemiş lokusların tamamının polimorfik olduğu saptanmıştır.
21. Tüm kombinasyonlardan elde edilen lokusların verileri birleştirilerek analiz edildiğinde 66 genotip için toplam 874 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 635'i metilasyona duyarlı 239'unun ise metillenmemiş olduğu belirlenmiştir. Metilasyona duyarlı lokusların 569'u polimorfik iken metillenmemiş lokusların 234'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır.
22. (E)ACT/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)AGC/(HM)-TCAG primer

kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. (E)ACG/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Tüm Primer Kombinasyonlarının AMOVA sonuçları değerlendirildiğinde popülasyonlar arası çeşitliliğin $P < 0.01$ içinde önemli, popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çeşitliliğin istatistiki olarak yüksek ve önemli olduğu saptanmıştır.

5.2. TMD (Transposon Methylation Display) Analizi

Thalos/(HM)-TCAG primer çifti kullanılarak 87 adet yabancı gernik ve 3 adet makarnalık buğdayın TMD analizi ile elde edilen araştırma bulguları aşağıda maddeler halinde verilmiştir

1. Yabancı gernik popülasyonu içerisinde Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için metilasyon seviyesi %43.04 ile %75.93 arasında değişmiştir. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonuna göre Thalos transpozon elementinin incelenen genotiplerde metilasyon seviyesi bakımından geniş varyasyon gösterdiği saptanmıştır.
2. Yabancı gernik popülasyonu içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip SY60, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip ise Zavitan olmuştur.
3. Makarnalık buğday genotipleri incelendiğinde Thalos transpozon elementinin metilasyon seviyesinin %56.04 ile %61.29 arasında değiştiği saptanmıştır.
4. Makarnalık buğday popülasyonu içerisinde en düşük metilasyon seviyesine sahip genotip Svevo, en yüksek metilasyon seviyesine sahip genotip Karakılçık88 olduğu saptanmıştır.

5. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonununa göre yabani gernik genotip lokuslarının %41.336'sı metillenmemişken, makarnalık buğday genotip lokuslarının %41.509'u metillenmemiştir. Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde, yabani gernik genotiplerinin lokuslarının %27.425'i metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %25.137'sinin metillendiği saptanmıştır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde yabani gernik genotip lokuslarının %31.239'u metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %33.354'ünün metillendiği saptanmıştır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde, yabani gernik genotip lokuslarının %58.664'ü metillenmişken makarnalık buğday genotip lokuslarının %58.491'in metillendiği ortaya çıkmıştır.
6. Thalos/(HM)-TCAG primeri çifti için yabani gernik ve makarnalık buğday popülasyonları karşılaştırıldığında Tip2 ve Tip3 metilasyon seviyeleri birbirinden farklılık göstermesine rağmen toplam metilasyon seviyeleri çok yakın değerlerde olduğu saptanmıştır.
7. “Thalos/(HM)-TCAG” primer kombinasyonunda Türkiye orijinli genotiplerin lokuslarının %41.408'i, İsrail popülasyonu lokuslarının %41.626'sı, Suriye orijinli genotiplerin lokuslarının %40.515'i ve Lübnan orijinli genotiplerin lokuslarının %41.018'i metillenmemiştir. Tip 2 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotiplerin lokuslarının %27.308'i, İsrail orijinli genotiplerin lokuslarının %26.910'u, Suriye orijinli genotiplerin lokuslarının %27.245'i ve Lübnan orijinli genotiplerin lokuslarının %27.566'sının metillenmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Tip 3 metilasyon durumları incelendiğinde Türkiye orijinli genotiplerin lokuslarının %31.284'ü, İsrail orijinli genotiplerin lokuslarının %31.464'ü, Suriye orijinli genotiplerin lokuslarının %32.240'ı ve Lübnan orijinli genotiplerin lokuslarının %31.416'sının metillendiği saptanmıştır. Toplam metilasyon durumu değerlendirildiğinde Türkiye orijinli genotiplerin lokuslarının %58.592'si, İsrail orijinli genotiplerin

lokuslarının %58.374'ü, Suriye orijinli genotiplerin lokuslarının %59.485'i ve Lübnan orijinli genotiplerin lokuslarının %58.982'sinin metillendiği ortaya çıkmıştır.

8. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 86 yabancı gernik ve makarnalık buğday genotipi analiz edilmiş, 280 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 164'ü metilasyona duyarlı 116'sı ise metillenmemiş olarak bulunmuştur. Metilasyona duyarlı lokusların 147'si polimorfik iken metillenmemiş lokusların 114'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır.
9. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için 82 yabancı gernik genotipi analiz edilmiş, 280 farklı lokus elde edilmiş, bu lokusların 165'i metilasyona duyarlı 115'inin ise metillenmemiş olduğu saptanmıştır. Metilasyona duyarlı lokusların 147'si polimorfik iken metillenmemiş lokusların 112'sinin polimorfik olduğu saptanmıştır. Thalos/(HM)-TCAG primer kombinasyonu için popülasyon içi çeşitliliğin $P < 0.001$ içinde önemli olduğu saptanmıştır.
10. TMD analizinden elde edilen bulgular incelendiğinde Thalos transpozonunu çevreleyen CCGG bölgelerinde DNA metilasyon varyasyonunun yüksek ve önemli olduğu saptanmıştır.

5.3. Neighbor-Joining(NJ) Analizi

Her bir primer kombinasyonunun *HpaII* ve *MspI* verileri ile ayrı olacak şekilde dendogram oluşturulmuştur. Elde edilen araştırma bulguları maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

1. (E)ACT/(H)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogram incelendiğinde incelenen genotiplerin 3 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Türkiye orijinli genotipler bir gruba ayrılırken Lübnan, Suriye, İsrail orijinli genotipler

diğer grubu oluşturmuştur. Bazı Türkiye orijinli genotipler diğer ülkelerle kümelenmiştir. SY62 ve SY79 bağımsız bir grup oluşturmuştur. 3 makarnalık buğday çeşidi ve 'Zavitan' aynı alt grup içerisinde yer almıştır.

2. (E)ACT/(M)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogram incelendiğinde, incelenen genotiplerin 3 ana gruba ayrıldığı, 2 grubu ağırlıklı olarak Türkiye genotipleri oluştururken 3. grupta çoğunlukla İsrail, Lübnan, Suriye genotiplerin yer aldığı görülmüştür. Farklı bir şekilde 6 Lübnan genotipi Türkiye genotipleri ile birlikte kümelenmiştir. Makarnalık buğdaylar Türkiye genotipleri ile kümelenmiştir.
3. (E)AGC/(H)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogram incelendiğinde, incelenen genotiplerin 3 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Türkiye bir ana grup içerisinde yer almış, bu grupta Lübnan ve İsrail genotiplerinin bazıları da kümelenmiştir. Makarnalık buğday genotipleri Türkiye orijinli genotiplerin yoğun olarak kümelendiği ana grup içerisinde başka bir kola ayrılarak bir arada yer almıştır.
4. (E)AGC/(M)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogramda incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. 2 grubu ağırlıklı olarak Türkiye orijinli genotipler oluşturmuştur. SY62 genotipi her 2 kesim enziminde de Türkiye grubunun içerisinde yer almıştır.
5. Makarnalık buğdaylar iki dendogramda da bir arada kümelenmiştir. Bununla birlikte makarnalık buğdaylar *HpaII* kesim durumuna göre(CHG) Türkiye popülasyonlarının içerisinde yer alırken, *MspI* kesim durumuna göre(CG) Lübnan, İsrail ve Suriye orijinli genotipleri ile aynı grup içerisinde yer aldığı saptanmıştır.
6. (E)ACG/(H)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogramda incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotipleri 3 ana grup içerisinde dağılım göstermiş, alt gruplar içerisinde bir arada kümelenmiştir. Svevo(62) Türkiye genotipleri ile kümelenirken Karakılçık88(78) ve Çeşit 4(87) farklı bir grupta yer almıştır.

7. (E)ACG/(M)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogramda incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmış, bir grubu Türkiye genotipleri oluşturmuştur. Diğer iki grup içerisinde orijinlerine göre genotipler alt gruplar halinde kümelenmiştir. Makarnalık buğdaylar aynı ana grup içerisinde birbirinden farklı alt gruplarda kümelenmiştir
8. *HpaII* reaksiyonu için tüm primer kombinasyonlarına ait dendogramda, incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmış, 2 grubu Türkiye genotipleri oluşturmuştur. Farklı bir şekilde LB21 ve SY62 genotipleri Türkiye orijinli genotipler ile birlikte kümelenmiştir. TR31, TR68, TR74, TR88 genotipleri Türkiye genotiplerinden ayrı bir şekilde kümelenmiştir. TR67 genotipi İsrail, Lübnan, Suriye grubu içerisinde kümelenmiştir.
9. *MspI* reaksiyonu için tüm primer kombinasyonlarına ait dendogramda incelenen genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotiplerinin bir kısmı Lübnan, Suriye, İsrail genotipleriyle aynı ana grupta alt bir grup oluşturmuştur. SY62 genotipi Türkiye alt grubu içerisinde yer almıştır. Tüm dendogramlar göz önüne alındığında genellikle Türkiye genotipleri bir arada gruplanırken, Suriye, İsrail ve Lübnan genotipleri ayrı olarak gruplanmıştır.
10. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogramda, genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye popülasyonu bir ana grup altında kümelenmiştir. TR88, TR68, TR74, TR31, TR53 genotipleri Suriye, Lübnan, İsrail popülasyonlarıyla aynı ana grupta yer almıştır. IS49 VE SY62 genotipleri Türkiye popülasyonu içerisinde yer almıştır. Thalos/(H)-TCAG primer kombinasyonuna ait dendogramda genotipler 3 ana gruba ayrılmıştır. Türkiye genotipleri bir ana grubu oluştururken, Türkiye genotiplerinin bazıları diğer ana gruplara dağılmıştır. SY62 genotipi Türkiye popülasyonu ile beraber yer almıştır.
11. MSAP sonuçlarında olduğu gibi TR31, TR68, TR74, TR88 genotipleri Türkiye genotiplerinden ayrı bir şekilde kümelenmiştir. Siirt ve çevresinde

coğrafi dağılım gösteren TR68, TR74, TR88 genotipleri ile Kahramanmaraş çevresinde coğrafi dağılım gösteren TR31 genotipinin bütün dendogramlarda beraber yer almıştır.

Bu araştırma kapsamında saptanan yukarıdaki bulgulara dayanarak, genomik DNA ve transpozon metilasyonunun genellikle genotiplerin orijinlerine özgü olduğu, yabani buğdayların kültür buğdaylarına göre daha yüksek metilasyon seviyesi ortaya koyduğu saptanmıştır. Bazı genotiplerin toplandıkları bölgelerden bağımsız metilasyon modelleri sergileyebildiği, özellikle farklı metilasyon seviyesi ve modeline sahip genotiplerin farklı çevre şartları altında epigenetik yanıtın gen fonksiyonlarını nasıl düzenlendiğinin anlaşılması ile ilgili yapılacak araştırmalarda önem arz ettiği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Herrera, C.M., 2015. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: Phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. *Front Genet.* 2015; 6: 4.
- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Herrera, C.M., 2015. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: Phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. *Front. Genet.* *American* 244, no. 1 (1981): 102-13.
- An, Y.C., Goettel, W., Han, Q., Bartels, A., Liu, Z., Xiao, W., 2017. Dynamic Changes of Genome-Wide DNA Methylation during Soybean Seed Development. *Sci. Rep.* 7, 12263.
- Ashikawa, I., 2001. Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *The Plant Journal*, 26: 617-625. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01062.x
- Avery, D., 1985. United-States farm dilemma - the global bad news is wrong. *Science.* 1985;230(4724):408–12.
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., Huang, Q.Q., Pearson, J.K., Hsieh, T., An., Y.C., Xiao, W., 2018. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(7), 2144; <https://doi.org/10.3390/ijms19072144>
- Becker, C., Hagmann, J., Muller, J., Koenig, D., Stegle, O., Borgwardt, K., Weigel, D., 2011. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480, 245–249.
- Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447, 407–412.
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396–398.

- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A.; Giannino, D.; Castiglione, M.R., Dewitte, W., Mariotti, D., Van Onckelen, H., Innocenti, A.M., 2002. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J. Exp. Bot.* 2002, 53, 1047–1054.
- Calarco, J.P., Borges, F., Donoghue, M.T., Van Ex, F., Jullien, P.E., Lopes, T., Gardner, R., Berger, F., Feijo, J.A., Becker, J.D., 2012. Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. 151, 194–205.
- Cervera, M.T., Ruiz-Garcia, L., Martinez-Zapater, J.M., 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Gen Genomics* 268:543–53.
- Chen, Z.X., Riggs, A.D., 2005. Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals. *Biochem Cell Biol* 2005;83:438–448
- Childe G., 1953. Science In Preliterate Societies And The Ancient Oriental Civilisations. *Centaurus*, 3: 12-23
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*. 2008;452(7184):215-219.
- Cubas, P., Vincent, C., Coen, E., 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401:157–61.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Ergle, D. R., Katterman, F. R. H., 1961. DNA of cotton. *Plant Physiol.* 36: 811–815.
- Feldman M., Levy A., 2005. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet Genome Res* 2005;109:250-258. doi: 10.1159/000082407

- Feldman M., Millet E., 2001. The contribution of the discovery of wild emmer to an understanding of wheat evolution and domestication and to wheat improvement. *Israel J Plant Sci.* 49:S25–35.
- Feldman, M., Sears, E.R., 2020. "The Wild Gene Resources of Wheat." *Scientific*
- Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8689–8694.
- Flávia, T., Silva, H.A., Gomes, F.P.C., 2019. A Role for Epigenetic Regulation in the Adaptation and Stress Responses of Non-model Plants. *Frontiers in Plant Science*; 1664-462X
- Frankel, O.H., Soule, M.E., 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press
- Ganguly, D.R., Crisp, P.A., Eichten, S.R., Pogson, B.J., 2017. The Arabidopsis DNA Methylome Is Stable under Transgenerational Drought Stress. *Plant Physiol.* 175, 1893–1912.
- Gehring, M., Henikoff, S., 2008. DNA Methylation and Demethylation in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 2008(6),
- Gonzalzo, M.L., Jones, P.A., 1997. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res.* 386(2):107–18.
- Gopher, A., Abbo, S., Lev-yadun, S., 2002. The “when”, the “where” and the “why” of the Neolithic revolution in the Levant. *Doc. Praehist.* 28:1–14.
- Grant-Downton, R.T., Dickinson, H.G., 2005. Epigenetics and its implications for plant biology: 1. The epigenetic network in plants. *Ann. Bot.*, 96, 1143–1164.
- Gruenbaum, Y., Cedar, H., Razin, A., 1982. Substrate and Sequence Specificity of a Eukaryotic DNA Methylase.

- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., Razin, A., 1981. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* volume 292, pages 860–862 (1981)
- Herrera, C.M., Bazaga, P., 2010. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New Phytol.* 187(3):867–76.
- Holliday R., Pugh J.E., 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, Vol. 187, Issue 4173, pp. 226-232 DOI: 10.1126/science.187.4173.226
- Hsieh, T.F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., Zilberman, D., Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science*. 324, 1451–1454.
- Ibarra, C.A., Feng, X., Schoft, V.K., Hsieh, T.F., Uzawa, R., Rodrigues, J.A., Zemach, A., Chumak, N., Machlicova, A., Nishimura, T., 2012. Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science*. 337, 1360–1364.
- Johnson, B., Coghill, R.D., 1925. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1, *J. Am. Chem. Soc.* 1925, 47, 11, 2838–2844
- Joshi, C.P., Nguyen, H.T., 1993. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. *Plant Sci.*, 93: 95-103.
- Kaur, A., Grewal, A., Sharma, P., 2018. Comparative analysis of DNA methylation changes in two contrasting wheat genotypes under water deficit. *Biol Plant* 62, 471–478.
- Kawakatsu, T., Stuart, T., Valdes, M., Breakfield, N., Schmitz, R.J., Nery, J.R., Urich, M.A., Han, X., Lister, R., Benfey, P.N., 2016. Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem. *Nat. Plants* 2016, 2, 16058.

- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319:1827–30.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L., 1999. Plant Retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33, 479-532.
- Li, X., Lin, Z., Nie, Y., Guo X., Zhang, X., 2009. Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism of Epigenetic Changes in Cotton Under Salt Stress. *Acta Agronomica Sinica*, Volume 35, Issue 4, Pages 588-596, ISSN 1875-2780,
- Li, Y.C., Fahima, T., Beiles, A., Korol, A.B., Nevo, E., 1999. Microclimatic stress and adaptive DNA differentiation in wild emmer wheat. *Triticum dicoccoides*. *Theor Appl Genet.* 98(6-7):873–83.
- Li, Y.C., Fahima, T., Korol, A.B., Peng, J.H., Roder, M.S., Kirzhner, V., 2000. Microsatellite diversity correlated with ecological-edaphic and genetic factors in three microsites of wild emmer wheat in North Israel. *Mol Biol Evol.* 17(6):851–62
- Li, Y.C., Fahima, T., Roder, M.S., Kirzhner, V.M., Beiles, A., Korol, A.B., 2003. Genetic effects on microsatellite diversity in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) at the Yehudiyya microsite, Israel. *Heredity.* 90(2):150–6.
- Li, Y.C., Roder, M.S., Fahima, T., Kirzhner, V.M., Beiles, A., Korol, A.B., 2002. Climatic effects on microsatellite diversity in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) at the Yehudiyya microsite, Israel. *Heredity.* 89:127–32.
- Li, Y.D., Shan, X.H., Liu, X.M., Hu, L.J., Guo, W.L., Liu, B., 2008. Utility of the methylationsensitive amplified polymorphism (MSAP) marker for detection of DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*). *Ecol Res.* 23(5):927–30.

- Lin, J.Y., Le, B.H., Chen, M., Henry, K.F., Hur, J., Hsieh, T.F., Chen, P.Y., Pelletier, J.M., Pellegrini, M., Fischer, R.L., 2017. Similarity between soybean and Arabidopsis seed methylomes and loss of non-CG methylation does not affect seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E9730–E9739.
- Madlung, A., Comai, L., 2004. The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure. *Annals of Botany*. Volume 94, Issue 4, Pages 481–495
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J., Seymour, G.B., 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* 38:948–52.
- Martin, L.B., Liebl, A.L., Trotter, J.H., Richards, C.L., McCoy, K., McCoy, M.W., 2011. Integrators: physiological determinants of phenotypic plasticity. *Integr Comp Biol* 51:514–27.
- Mengi, F., Li, Y., Yin, J., 2012. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat seeds. *Biol Plant* 56, 269–275
- Messeguer, R., Ganai, M.W., Steffens, J.C., Tanksley, S.D., 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol. Biol.* 16, 753–770.
- Monk, M., 1988. Genomic imprinting. *Genes Dev.* 2(8):921–5
- Moore, A.M.T., Hillman G.C., Legge, A.J., 2000. *Village on the Euphrates*. Oxford University Press. Oxford, N.Y.
- Morgan, H.D., Sutherland, H.E., Martin, D.I.K., Whitelaw, E., 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23:314–8.
- Nevo, E., Beiles, A., 1989. Genetic diversity of wild emmer wheat in israel and turkey - structure, evolution, and application in breeding. *Theor Appl Genet.* 77(3):421–55.

- Niederhuth, C.E., Bewick, A.J., Ji, L., Alabady, M.S., Kim, K.D., Li, Q., Rohr, N.A., Rambani, A., Burke, J.M., Udall, J.A., 2016. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biol.* 17, 194.
- Ozkan, H., Willcox, G., Graner, A., Salamini, F., Kilian, B., 2011. Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Genetic Resources and Crop Evolution* volume 58, pages 11–53 (2011).
- Peng, J.H.H., Sun, D.F., Nevo, E., 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol Breed.* 28(3):281–301.
- Pigliucci, M., 2010. Genotype–phenotype mapping and the end of the ‘genes as blueprint’ metaphor. *Philos Trans R Soc B* 365:557–66.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., Young, R.A., 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122:517–527.
- Portis, E., Acquadro, A., Comino, C., Lanteri, S., 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, Volume 166, Issue 1, Pages 169–178, ISSN 0168-9452.
- Rabinowicz, P.D., Palmer, L.E., May, B.P., Hemann, M.T., Lowe, S.W., McCombie, W.R., Martienssen, R.A., 2003. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Research*. 13 (12). pp. 2658–64. ISSN 1088-9051
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KVK, Whitelaw E. 2003. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2538–43.

- Reyna-Lopez, G., Simpson, J., Ruiz-Herrera, J., 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet.* 253(6):703–10.
- Richards, C.L., Hanzawa, Y., Ehrenreich, I.M., Katari, M., Engelmann, K.E., Purugganan, M.D., 2009. Perspectives on ecological and evolutionary systems biology. *Plant systems biology. Annual Plant Reviews*, Vol. 35. Oxford, UK: Blackwell Publishing. p. 331–51.
- Richards, E.J., 2006. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.*, 7, 395–401.
- Ruiz-Garcia, L., Cervera, M., Martinez-Zapater, J., 2005. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. *Planta* 222, 301–306.
- Sáez-Laguna, E., Guevara, M.Á., Díaz L.M., 2014. Epigenetic variability in the genetically uniform forest tree species *Pinus pinea* L. *PLoS One.* 9(8):e103145. doi:10.1371/journal.pone.0103145.
- Salamini F., Özkan H., Brandolini A., Schäfer-Pregl R., Martin ., 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nat Rev Genet.* 3(6):429–41.
- Salmon A., Clotault J., Jenczewski E., Chable V., Manzanares-Dauleux M., 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Sci* 174:61–70.
- Schrey, A.W., Alvarez, M., Foust, C.M., Kilvitis, H.J, Lee, J.D., Liebl, A.L., Martin, L.B., Richards, C.L., Robertson, M., 2013. Ecological Epigenetics: Beyond MS-AFLP. *Integr Comp Biol.* 53(2):340-50
- Song, Y., Tang, H., Ke, X., Guo, J., Zhang, S., Wang, J., Niu, N., Ma, S., Zhao, H., Zhang, G., 2018. Chloroplast structure and DNA methylation polymorphisms in an albino mutant of wheat (*Triticum aestivum*) cv. Xinong 1376. *Crop and Pasture Science*, 69(4), 362-373.

- Takuno, S., Ran, J.H., Gaut, B.S., 2016. Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants. *Nat. Plants* 2, 15222
- Tan, M.P., 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiol Biochem.* 48(1):21-26.
- Thiebaut, F., Hemerly, A.S., Ferreira, P.C.G., 2019. A Role for Epigenetic Regulation in the Adaptation and Stress Responses of Non-model Plants. *Front Plant Sci.* 2019;10:246.
- Thomas A.J, Sherrat H., 1956 The Isolation of Nucleic Acid Fractions From Plant Leaves and Their Purine and Pyrimidine Composition. *Biochem J.* Jan;62(1):1-4.
- Tok, D., Sentürk-akfırat F., Sevinç D., Aydın Y., Altınkut-uncuoğlu A., 2011. Identification of Genetic Polymorphism and DNA Methylation Pattern in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Turkish Journal Of Field Crops.* 16(2): 157-165.
- Turner, B.M., 1998. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci* 54:21–31.
- Venetsky, A., Levy-Zamir, A., Khasdan, V., Domb K., Kashkush K., 2015 . Structure and extent of DNA methylation-based epigenetic variation in wild emmer wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) populations. *BMC Plant Biol* 15, 200 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0544-z>
- Vischer, E., Zamenhof, S., Chargaff, E., 1949. Microbial Nucleic Acids; The Desoxypentose Nucleic Acids of Avian Tubercle Bacilli and Yeast. *J Biol Chem* 177(1):429-38.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandele, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP-a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–14.
- Waddington, C.H., 1940 *Organisers and Genes*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.

- Wang, B., Zhang, M., Fu, R., 2016. Epigenetic mechanisms of salt tolerance and heterosis in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) revealed by methylation-sensitive amplified polymorphism analysis. *Euphytica* 208, 477–491
- Wang, J., Tian, L., Madlung, A., Lee, H., Chen, M.i Lee, J.J., Watson, B., Kagochi, T., Comai L., ChenZ.J., 2004. Stochastic and Epigenetic Changes of Gene Expression in Arabidopsis Polyploids. *GENETICS* vol. 167 no. 4 1961-1973
- Willard H., Brown, C., Carrel, L., Hendrich, B., Miller, A., 1993. Epigenetic and chromosomal control of gene expression: molecular and genetic analysis of X chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1993;58:315–22.
- Wyatt G.R., 1951. Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids *Biochem J.* 48(5): 581–584. doi: 10.1042/bj0480581
- Yaakov B., Kashkush K., 2011. Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *Int J Plant Genomics.* 569826. doi:10.1155/2011/569826
- Zemach, A., Kim, M.Y., Silva, P., Rodrigues, J.A., Dotson, B., Brooks, M.D., Zilberman, D., 2010. Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18729–18734
- Zemach, A., McDaniel I.E., Silva, P., Zilberman, D., 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science.* 328(5980):916-919. doi:10.1126/science.1186366
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J., 2018. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 489–506
- Zhong, L., Xu Y., Wang J., 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *Afr J Biotechnol* 8:6201–7.

- Zlúvová, J., Janoušek, B., Vyskot, B., 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J. Exp. Bot.* 52, 2265–2273.
- Zohary, D., Hopf, M., 2000. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. Oxford University Press, New York.





ÖZGEÇMİŞ

1995 yılında İskenderun'da doğdu. İlkokul ve Ortaokul eğitimini Sarıseki Organize Sanayi İlköğretim Okulu ve Lise Eğitimini Sefa Atakaş Anadolu Denizcilik Meslek Lisesinde tamamladı. 2013 yılında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünde lisans eğitimine başlayıp 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılında İsrail'de bulunan Ben-Gurion University of the Negev'de 'Academic Research Internship' programı kapsamında eğitim almıştır. 2020 yılında Tekfen Tarımsal Araştırma, Üretim ve Pazarlama A.Ş.'de Moleküler Araştırma Mühendisi olarak göreve başlamıştır. Halen bu görevine devam etmektedir.