



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) DOKU
KÜLTÜRÜNDE *SUKKULA* RETROTRANSPOZON
HAREKETLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gönül KARTAL ALAÇAM

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Eylül, 2013

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) DOKU
KÜLTÜRÜNDE *SUKKULARETROTRANSPOZON*
HAREKETLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gönül KARTAL ALAÇAM

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Eylül, 2013

İSTANBUL

Bu çalışma 16/09/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

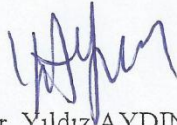


Tez Jürisi

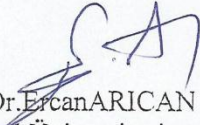
Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi



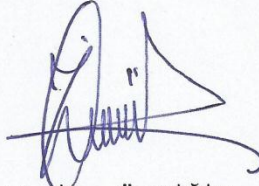
Doç.Dr. Tijen OĞRAŞ
TÜBİTAK MAM



Doç.Dr. Yıldız AYDIN
Marmara Üniversitesi



Doç.Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi



Doç.Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięinin 8530 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

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

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Sibel Yılmaz'a, Sevgi Maraklı'ya, beni her zaman bilim yolunda ilerlemeye teşvik eden ve destekleyen anneme, tezimin yazım aşamasındaki desteği için Gülümser Kartal'a ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Eylül, 2013

Gönül KARTAL ALAÇAM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ARPA	4
2.2.ARPANIN TAKSONOMİSİ	7
2.3. ARPA GENOMU.....	7
2.4.ARPA DOKU KÜLTÜRÜ	9
2.5. SOMAKLONAL VARYASYONLAR.....	10
2.6. TRANSPOZONLAR	11
2.7. TRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI	12
2.8. RETROTRANSPOZONLAR	12
2.8.1.LTR Taşımayan Retrotranspozonlar	13
2.8.1.2. <i>LINE (Short Interspersed Elements)</i>	13
2.8.2.LTR Taşıyan Retrotranspozonlar	14
2.8.2.1. <i>Otonom LTR Retrotranspozonlar</i>	15

2.8.2.2. Otonom Olmayan LTR Retrotranspozonlar	16
2.9.LTR RETROTRANSPOZONUN YAPISI	18
2.9.1.Uzun Uç Tekrar (Long Terminal Repeat -LTR) Dizileri.....	18
2.9.2.Primer Bağlanma Bölgesi (Primer Binding Site -PBS)	20
2.9.3.Grup-spesifik Antijen (Group-specific antigen -GAG)	20
2.9.4.Poliprotein (Polyprotein -POL).....	21
2.9.5.Polipürin Bölgesi (Polypurine Tract-PPT).....	21
2.9.6.Nadir Bulunan Genler	22
2.10. SUKKULA.....	23
2.10.1. <i>Sukkula</i> Elementinin Keşfi.....	23
2.10.2. LARD LTR’ler Uzun Korunmuş Uçlara Sahiptir.....	24
2.10.4. LARD Elementlerinin Transkripsiyonu Yapılır	25
2.10.5. LARD İnternal Domenleri İyi Korunmuş RNA Sekonder Yapıları Oluştururlar	26
2.11. ARPADA LARD ELEMENTLERİNİN BULUNMA SIKLIĞI VE ORGANİZASYONU.....	26
2.12. SUKKULA ELEMENTİNİN ÖZELLİKLERİ	27
2.13. LTR RETROTRANSPOZONLARIN YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	27
2.13.1.Transkripsiyon	28
2.13.2. Translasyon.....	29
2.13.3. Nukleokapsit Oluşumu, Dimerizasyon ve Paketlenme.....	29
2.13.4. Revers Transkripsiyon ve cDNA Sentezi	31
2.13.5. İntegrasyon.....	32
2.14. RETROTRANSPOZONLARIN MARKIR OLARAK KULLANILMASI	33
2.14.1. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism).....	34

2.14.2. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)	35
2.14.3. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism)	35
2.14.4. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms)	36
2.14.5. iPBS (Inter Primer Binding Site)	36
2.15. TRANSPOZABL ELEMENTLERİN GEN ANLATIMİNİN DÜZENLEMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ	37
3. MALZEME VE YÖNTEM	39
3.1. ARPA EMBRİYO KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI VE KALLUS ELDESİ	39
3.2. KALLUSLARDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU	41
3.3. GENOMİK DNA'NIN IRAP POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ÇOĞALTILMASI	43
3.4. GENOMİK DNA'NIN İPBS MARKIR YÖNTEMİYLE ÇOĞALTILMASI ...	44
3.5. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ	46
3.6. POLİMORFİZMİN HESAPLANMASI	47
4. BULGULAR	48
4.1. DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI	48
4.2. GENOMİK DNA İZOLASYONU VE PCR SONUÇLARI	49
4.3. IRAP-PCR İÇİN JACCARD BENZERLİK ORANLARININ HESAPLANMASI	52
4.4. İPBS-PCR İÇİN JACCARD BENZERLİK ORANLARININ HESAPLANMASI	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR	60

ÖZGEÇMİŞ.....	72
----------------------	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Arpa başaklarının sıralanması	5
Şekil 2.2: Tek bir arpa çiçeğinin ve braktelerinin yapısı (başakçık).....	5
Şekil 2.3: Arpa tohumunun ventral (a) ve dorsal (b) görünümleri.	6
Şekil 2.4: Arpa tohumu anatomisi	6
Şekil 2.5: Arpa genomundaki transpozon yüzdeleri	8
Şekil 2.6: LTR retrotranspozonun organizasyonu	14
Şekil 2.7: Bitkilerdeki LTR Retrotranspozonlar.	17
Şekil 2.8: RBIP markır yönteminin çalışma prensibi	36
Şekil 2.9: iPBS yönteminin çalışma mekanizması	37
Şekil 3.1: Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan markır	46
Şekil 4.1: Çalışmada kullanılan arpa tohumları	49
Şekil 4.2: Kallus kültürleri	49
Şekil 4.3: Genomik DNA'lara ait jel fotoğrafı	50
Şekil 4.4: IRAP-PCR sonuçları	51
Şekil 4.5: iPBS-PCR sonuçları.	52

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Retrotranspozonlar	13
Tablo 3.1: Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri	40
Tablo 3.2: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve içerikleri	42
Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve içerikleri	42
Tablo 3.4: IRAP-PCR’da kullanılan <i>Sukkula</i> primeri	43
Tablo 3.5: IRAP-PCR’da kullanılan bileşenler	43
Tablo 3.6: IRAP-PCR Reaksiyonu için gerekli koşullar	43
Tablo 3.7: iPBS-PCR’da kullanılan <i>Sukkula</i> primeri	44
Tablo 3.8: iPBS-PCR’da kullanılan bileşenler	44
Tablo 3.9: iPBS-PCR Reaksiyonu için gerekli koşullar	44
Tablo 3.10: %6’lık PAGE bileşenleri ve miktarları	45
Tablo 3.11: 5X TBE tamponunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	45
Tablo 3.12: PAGE bileşenleri	46
Tablo 4.1: Genomik DNA konsantrasyonları	50
Tablo 4.2: IRAP sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri	53
Tablo 4.3: iPBS sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri	54

SEMBOL LİSTESİ

µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
AP	: Aspartik proteinaz
BAGY2	: <i>Barley Gypsy Element 2</i>
BARE1	: <i>Barley Retroelement 1</i>
bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BAC	: Bakteriyal yapay kromozomu “Bacterial Artificial Chromosome”
C	: Sitozin
°C	: Santigrad derece
C değeri	: Belli bir türün haploid genomundaki DNA miktarı
CaCl₂	: Kalsiyum korür
cDNA	: Tamamlayıcı DNA - “complementary DNA”
CHR	: Chromodomain
cm	: Santimetre
cM	: Santi Morgan
cv	: Kültür varyetesi – “cultivar”
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromür -“Cetyltrimethylammonium bromide”
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Dezoksiribonükleotit trifosfat - “deoxyribonucleotide triphosphate”
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EST	: Expressed Sequence Tags
EN	: Endonükleaz
ENV	: Kılıf proteini -“envelope protein”
G	: Guanin
g	: Gravity (yerçekimi ivmesi)
gr	: Gram
GAG	: Gruba özgü antijen
gRNA	: Genomik RNA
HCl	: Hidroklorik asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
DIS	:Dimerizasyon başlatıcı sinyaller
iPBS	: Primer bağlanma bölgeleri arası - “Inter Primer Binding Site”
IRAP	:Retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi – “InterRetrotransposon Amplified Polymorphism”
INT	: İntegraz
LARD	: Büyük retrotranspozon türevleri “Large Retrotransposons Derivatives”
LiCl	: Lityum klorür
LINE	: Long Interspersed Nuclear Elements
LTR	: kısa uç tekrarları - Long Terminal Repeats
kb	: Kilobaz
kg	:Kilogram
M	:Molar

MB	: Megabaz
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: Micro RNA
MITE	: minyatür evrik tekrarlar – ”Miniature Inverted Transposable Elements”
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mRNA	: Haberci RNA
N	: Normal
n	: Haploid kromozom sayısı
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
OD	: Optik dansite
ORF	: açık okuma çerçevesi – ”Open Reading Frame”
pH	: Power of hydrogen
PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforezi – ”Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
PBS	: primer bağlanma bölgesi – ”Primer Binding Site”
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu - ”Polymerase Chain Reaction”
pg	: Pikogram
pmol	: Pikomol
poliA	: mRNA molekülünde Adenin nükleotidleri bakımından zengin uç bölge
PPT	: Polypurine Tract
PR	: Proteaz
PSI	: Paketlenme sinyali - ”Packaging Signal”
PVP	: Poli Vinil Prolidon
rDNA	: Ribozomal DNA
RH	: RNaz H
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
RT	: Ters Transkriptaz - ”Reverse Transcriptase
RBIP	: retrotranspozon temelli insersiyon polimorfizmi —based insertion polymorphisms”
REMAP	:retrotranspozon-mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi- ”Retrotransposon-MicrosatelliteAmplified Polymorphism”
rpm	: Dakikadaki devir sayısı - ”revolutions per minute”
rRNA	: Ribozomal RNA
S-SAP	: diziye özgü çoğaltım polimorfizmi – ”Sequence-Specific Amplified Polymorphism”
SINE	: Short Interspersed Elements
sn	: Saniye
SSR	: kısa dizi tekrarları – ”Simple Sequence Repeat”
SU	: Surface
T	: Timin
Ty1	: Bir maya transpozonu
Ty3	: Bir maya transpozonu
TAE	: Tris-asetat-edta

TBE	: Tris-borik asit-edta
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TE	: Transpozabl element
TIR	: ters uç tekrarları – ”Terminal Inverted Repeats”
T_m	: Erime sıcaklığı -“Temperature of melting”
TRIM	: Terminal Repeat Retrotransposon in Miniature
tRNA	: Transfer RNA
TSD	: hedef bölge duplikasyonu – “Target Site Duplication”
U3	: RNA’nın 3’ ucuna özgü bölge – “Unique for 3’ end of RNA”
U5	: RNA’nın 3’ ucuna özgü bölge – “Unique for 5’ end of RNA”
UTR	: translasyonu yapılmayan bölge – “Untranslated Region”
UV	: Ultra-violet
V	: Volt
VLP	: virus benzeri partikül - “Virus-Like Particle”

ÖZET

ARPA (HORDEUM VULGARE L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE SUKKULA RETROTRANSPOZON HAREKETLERİNİN BELİRLENMESİ

Retrotranspozonlar genomda dinamik elementlerdir ve bir çok organizmanın genomunda yüksek oranda bulunur. Retrotranspozonlar otonom olmalarına karşın hareket için diğer elementlerin gen ürünlerini kullanan otonom olmayan retrotranspozonlar da vardır. Bazı stres koşulları retrotranspozonların etkinliğini uyarır. Doku kültürü, stres koşullarından biri olarak kabul edilir. Bu çalışmada, *Sukkula* (otonom olmayan bir retrotranspozon) polimorfizmi, 3 mg/l dikamba içeren MS besi yerinde aynı embriyodan kökenlenen farklı kültür zamanlarındaki (40 ve 80 günlük) kalluslarda incelenmiştir. Olgun arpa embriyoları (*Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37) kallus oluşumu için kültüre alınmış ve her 20 günde bir altkültürlenmiştir. Aynı kültür zamanında farklı embriyodan oluşan bireysel kalluslar arasında polimorfizmi analiz etmek için üç deney seti kurulmuştur. Polimorfizm, retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi (IRAP) ve primer bağlanma bölgeleri arası çoğaltım yöntemi (iPBS) teknikleri ile *Sukkula*'ya özel iki farklı primer kullanılarak yapılmıştır. Kültüre alınmamış beş olgun embriyo kontrol olarak kullanılmıştır.

Kültüre alınmamış embriyolarda % 14 polimorfizm oranı gözlenirken 40 günlük ve 80 günlük kalluslarda IRAP analizi sonrasında sırasıyla %61 ve %0 polimorfizm oranları bulunmuştur. iPBS analizleri ile kültüre alınmamış materyallerde polimorfizm oranı % 29, 40 günlük ve 80 günlük kalluslarda sırası ile %58 ve %70 oranında polimorfizm görülmüştür. Sonuçlar, doku kültürü koşullarının ve kallus yaşlarının *Sukkula* retrotranspozon hareketlerini etkilediğini ve tüm bireyler üzerinde aynı etkiyi göstermediğini ortaya koymaktadır. Bilindiği kadarıyla bu çalışma, kallus gelişimi açısından arpada *Sukkula*'nın aktivitesinin belirlenmesi için IRAP ve iPBS tekniklerinin kullanıldığı ilk çalışmadır.

SUMMARY

DETERMINATION OF *SUKKULA* RETROTRANSPOSON MOVEMENTS IN BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) TISSUE CULTURE

Retrotransposons are dynamic elements of the genome and exist with high percentage in genome of many organisms. Although majority of retrotransposons are autonomous, there are also non-autonomous retrotransposons, which use other elements gene products for movements. Some stress conditions might have a stimulating effect for activation of retrotransposons. Tissue culture could be accepted as one of these stress factors. In this study, *Sukkula* (a non-autonomous retrotransposon) polymorphism was investigated in calli with different culturing time (40 and 80 day-old) which formed from the same embryo in MS medium supplemented with 3 mg/l dicamba. Mature barley embryos (*Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37) were cultured for callus formation and sub-cultured in every 20 days. Three experiment sets were constructed to determine the polymorphism between individual calli formed from different embryo in same culture time. Polymorphism was detected using Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) and Inter Primer Banding Side Amplification (iPBS) techniques with two different *Sukkula* specific primers.

Non-cultured 5 mature embryos were used as control. While up to 14% polymorphic PCR bands were obtained from non-cultured embryos, 61% and 0% polymorphic bands were observed with IRAP analyses in 40 and 80 day-old calli, respectively. iPBS analyses revealed more polymorphism ratio up to 29% in non-cultured materials, and up to 58% and 70% in 40 and 80 day old calli materials, respectively. Results showed that tissue culture conditions and age of calli affected *Sukkula* retrotransposon movements and all individuals did not show the same effect. As it is known, this is the first report on employment of *Sukkula* based IRAP and iPBS applications in barley in terms of callus development.

1. GİRİŞ

Bitki genomlarının büyük bir kısmı uzun tekrarlı diziler (LTR “long terminal repeat”) taşıyan retrotranspozonlardan oluşur. Bu retrotranspozonlar, sayılarını genelde kopyala ve yapıştır mekanizması ile arttırarak genom büyümesine neden olurlar. Retrotranspozonların hayat döngülerindeki transkripsiyon, translasyon, paketlenme, reverse transkripsiyon ve integrasyonları genelde kendi kodladıkları genler aracılığıyla olur. Bir diğer anlamda bu elemanlar otonomdur. Bununla birlikte otonom olmayan, genleri mutasyona uğramış veya delesyonlu genelde diğer transpozonlardan türevlenmiş veya diğer transpozonlardan türevlenmemiş hareket yeteneğinde olan retrotranspozonlar da bilinmektedir.

Transpozonlar genom içinde yer değiştirerek gen anlatımında değişikliklere, epigenetik olaylara hatta büyük kromozom mutasyonlarına neden olurlar. Transpozonlar ilk kez 1940’lı yılların sonlarında Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde tanımlanmıştır (McClintock, 1950). Transpozonlar her canlı türünde bulunmaktadır. Örneğin, insan genomunun %45’ini oluşturmaktadırlar fakat çok azı hareketlidir (Huang ve diğ., 2012). Bununla beraber bitkilerde genomda çok daha geniş alanlar kapsamaktadırlar. Arpa genomunun yaklaşık olarak %80 oranında transpozonlardan oluştuğu ve bunların %38 kadarının henüz tanımlanamadığı bilinmektedir (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

Transpozonların aktivasyon durumları çeşitli iç ya da dış etmenlerle uyarılabilmektedir. Doku kültürü koşulları da bir stres faktörü olarak bilinmektedir. Özellikle stres koşullarında transpozon aktivitelerinde büyük ölçüde değişiklikler olabileceği daha önceki çalışmalar ile gösterilmiştir (Pouteau ve diğ., 1991; Hirochika ve diğ., 1996; Grandbastien ve diğ., 2005; Todeschini ve diğ., 2005; Nellaker ve diğ., 2006, Hamat-Mecbur, 2012).

Günümüzde, transgen teknolojisinin kullanımında doku kültürü yöntemleri önemli yer tutmaktadır. Somaklonal varyasyonlar doku kültüründe kendiliğinden meydana gelen genetik ya da epigenetik değişimler sonucunda oluşmaktadır. Bu nedenle kültürdeki

hücreler birbirlerinden morfolojik, fizyolojik veya genetik olarak farklı hale gelebilir (Larkin ve Scowcroft, 1981). Böylece somaklonal varyasyon taşıyan hücrelerden rejenere olan bitkiler, eksplant kaynağı olan bitki ile farklı özellikler taşıyabilir. Bu nedenlerden dolayı klonal bitkilerin elde edilemesi mümkün olmamaktadır.

Günümüzde, somaklonal varyasyonların ana nedenlerinden biri olarak transpozonlar gösterilmektedir (Hirochika, 1993; Grandbastien, 1998; Campbell ve diğ., 2011; Evrensel ve diğ., 2011; Bayram ve diğ., 2012, Yılmaz ve Gözükırmızı, 2013). Bununla beraber somaklonal varyasyonların oluşumunda özellikle otonom olmayan retrotranspozonlar ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Bu tez çalışması kapsamında, arpa kalluslarında, kültür süresine bağlı olarak otonom olmayan *Sukkula* retrotranspozonunun hareketi sonucunda meydana gelen genetik polimorfizm araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) *Poaceae* ailesinden *Triticeae* sınıfının bir üyesi olan önemli bir tahıl bitkisidir. Diploid kromozom sayısı $2n=14$ olan arpa, ılıman iklim bölgelerinde yetişen, taneleri hayvan yemi, ekmek ve bira yapımında kullanılan bir bitkidir. Arpanın haploid genomu yaklaşık olarak 5.36×10^9 bp'dir (Bennett ve diğ., 2000). Arpa 40yıllı aşkın bir süredir İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki genetik temelli çalışmalarda model sistem olarak kullanılmaktadır.

Yapay besi ortamlarında bitkilerden alınan canlı hücrelerin çoğaltılması mümkündür. Bu doku veya hücrelerin steril şartlarda üretilmesine doku kültürü ya da hücre kültürü denmektedir. Bu çalışmada arpa (cv. Tokak 157/37) embriyoları kullanılarak doku kültürleri oluşturuldu ve kültürlerden elde edilen bitki örnekleri kullanılarak transpozonların evrimsel açıdan bitkilerde önemli değişiklikler oluşturup oluşturmadığı araştırıldı.

Transpozonlar genom içinde yer değiştirebilme yeteneğine sahip DNA dizileridir. Bu yer değiştirebilen tekrarlı diziler, transpozisyon aracılığı ile bir kromozomal bölgeden diğerine hareket ederler. Tüm transpozonlar iki temel özellik taşırlar. Birincisi, genom içinde bir yerden diğerine hareket edebilme özelliği (transpozisyon), ikincisi de genomdaki kopya sayılarını arttırabilme (replikasyon) özelliğidir. Kopya sayılarını arttırabilme özelliklerinden dolayı genom büyümesine neden olurlar. Transpozonlar, bitki genomlarının ortalama %50–90 kadarını oluşturmaktadır (Flavell ve diğ., 1974; Bennetzen, 1996; Heslop-Harrison, 2000; Meyers ve diğ., 2001; Wicker ve diğ., 2001).

Transpozonlar hareketlilikleri açısından aktif transpozonlar ve inaktif transpozonlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Bu elementlerin büyük kısmı, inaktif transpozonlardan oluşur. Türlerin evriminin erken aşamalarında bu inaktif transpozonlar, transpozisyon yapmış ve bugünkü bulunduğu kromozomal bölgelere yerleşmişlerdir. Bu yüzden inaktif transpozonlar, moleküler fosil olarak da adlandırılmaktadırlar. Ancak transpozonların aktif veya inaktif olması tamamen kalıcı bir durum değildir ve tersine döndürülebilir.

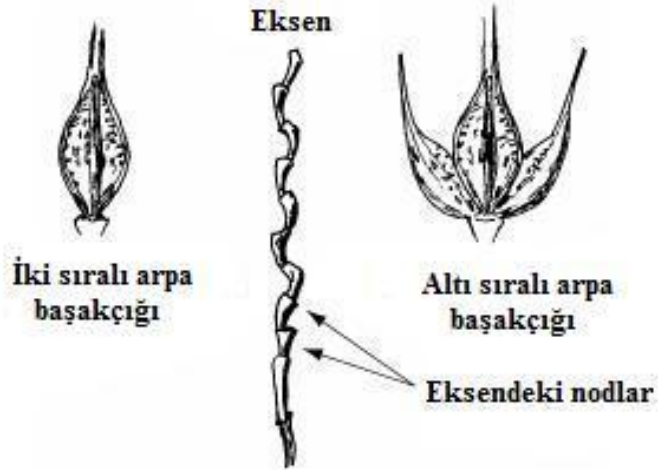
Çevresel koşulların değişmesi ve başka faktörler, bu elementleri aktive veya inaktive eden epigenetik yapılanmayı değiştirebilmektedir (Bennetzen, 2000; Shirasu ve diğ., 2000; Kalendar ve diğ., 2004).

Arpa ekonomik öneminin yanısıra önemli bir model bitkidir. Arpa bitkisinde tanımlanmış 40'tan fazla retrotranspozon bilinmektedir (Leigh ve diğ., 2003). Retrotranspozonlar, RNA aracılığı ile kendilerini çoğaltıp genomun içinde hareket ederler. Bu hareket sonucu mutasyonlara ve genom büyümesine neden olurlar. Son yıllarda bu retrotranspozonların bazılarının aktif transkriptleri ve protein ürünleri de tanımlanmıştır (Yılmaz, S.,2013).

Sukkula otonom özelliğe sahip olmayan bir transpozon çeşididir. Dolayısıyla çoğalıp genomda farklı bölgelere yerleşmek için otonom özellikte olan *Gypsy* sınıfı retrotranspozonlarının enzimlerini kullanır. Bu çalışmada arpa doku kültürlerinde *Sukkula*retrotranspozonunun hareketleri interretrotranspozon amplifikasyon (IRAP) yöntemi ile araştırılarak retrotranspozon hareketleri ve kültürdeki farklılaşma ilişkisi saptanmıştır. Bu çalışmaların bitki gelişimi ve farklılaşması aşamalarında bilimsel katkılar yaparak uygulamada da varyasyonların engellenmesi konusunda katkılar sağlaması beklenmektedir. Bu çalışma otonom özellikte olmayan *Sukkula*retrotranspozonun doku kültüründe oluşturduğu polimorfizmin araştırıldığı ilk çalışmadır.

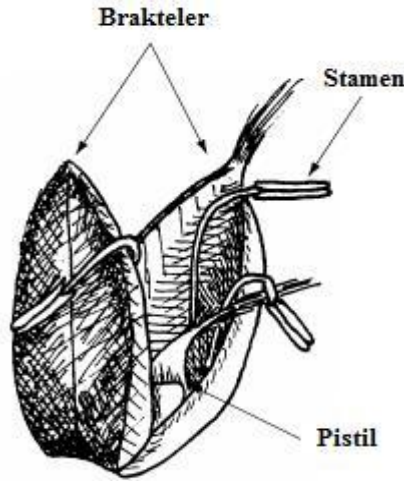
2.1.ARPA

Arpa tek yıllık bir uzun gün bitkisidir. Fakat değişik gün uzunluklarına da uyabilir. Tahıllar içerisinde en çok kardeşlenenlerden olup, olağan durumda 5 - 8 kardeş verir. Bitki boyu ortalama 35-100 santimetre (cm) kadardır. Başakları ortalama 8 - 15 cm boyunda olup 2, 4 ve 6 sıralıdırlar. Çiçeği kavuz ve kapçık sarar, kavuzlu arpalarda bunlar taneye yapışık ve harmanda ayrılmazlar. Tanenin ortalama % 10 - 13 kadarı kavuzdur. Tane yapısında % 9 – 13 protein, % 67 kadar da karbonhidrat bulunur.



Şekil 2.1: Arpa başaklarının sıralanması (The Brewers The Market Guide, 2008).

Başığın merkezi eksen olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Bu eksen nodyumlar ve internodyumlarla birlikte eksen nodyumlarında birleşen daha sonra içinde tohum gelişecek olan başakçıktan oluşur.



Şekil 2.2: Tek bir arpa çiçeğinin ve braktelerinin yapısı (başakçık) (The Brewers The Market Guide, 2008).

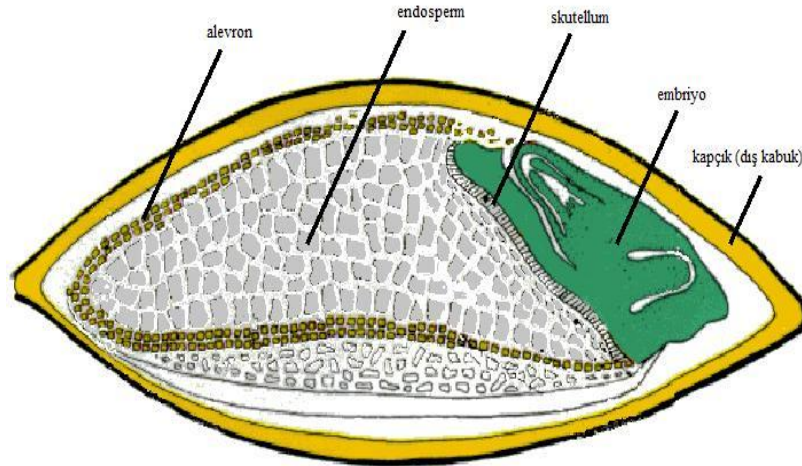
Bir arpa başakçığı brakte (tek bir çiçeğe veya çiçek durumlarına ait koruyucu bazen renkli, indirgenmiş yapraksı yapılar) ile çevrelenen tek bir çiçekten oluşur (Şekil 2.2). Bir arpa çiçeği hem dişi (pistil) hem de erkek (stamen) organlarını taşır; arpa kendine tozlaşır. Tozlaşmadan sonra döllenmiş ovaryum gelişirken olgun bir tohumun kapçığı olacak olan brakteler oluşur (The Brewers TheMarket Guide, 2008).

Döllenmeden sonra olgunlaşıp gelişmiş tohum taslağı ve içerisinde oluşan embriyodan meydana gelen yapı tohum olarak adlandırılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3:Arpa tohumunun ventral (a) ve dorsal (b) görünümü (The Maltsters Association of Great Britain, 2007).

En dışta yer alan testa iki integumentten oluşmuştur ve mekaniksel olarak çok kuvvetlidir. Endosperm denilen besli dokuda karbonhidrat depo edilir. Embriyo ise ince çeperli, çok sıkı düzenlenmiş, canlılığını koruyan parenkima hücrelerinden meydana gelmiştir (Şekil 2.4)(Uysal ve Yıldırım, 2003).



Şekil 2.4:Arpa tohumu anatomisi(Carlsberg Research Center, 2013).

Tokak 157/37 varyetesi Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 1930'lu yıllarda yerel popülasyonların ve köy çeşitlerinin toplanması ve bunlardan yapılan seleksiyonlar ile ıslah edilmiştir. Geniş adaptasyon kabiliyetine, üstün verim kapasitesine sahiptir (Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, 2013).

2.2.ARPANIN TAKSONOMİSİ

Arpa, *Poaceae* ailesinden *Liliopsida* sınıfının bir üyesidir. *Poaceae* ailesine ait olan tüm bitkiler tek bir atadan gelişmiştir. Bununla birlikte, *Liliopsida* sınıfından *Triticeae* takımının bir üyesi olan arpa, buğday (*Triticum* sp.) ve çavdar (*Secale* sp.) gibi birçok önemli tahıl türü ile akrabadır (Vicient ve diğ., 2005; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007; Schulte ve diğ., 2009).

Alem:*Plantae*– Bitkiler

Altalem:*Tracheobionta* – Damarlı bitkiler

Üstşube:*Spermatophyta* – Tohumlu bitkiler

Şube:*Magnoliophyta* – *Angiospermae* – Kapalı tohumlu bitkiler

Sınıf:*Triticeae* – *Monocotyledoneae* – Tek çenekliler

Altsınıf:*Commelinidae*

Takım:*Cyperales*

Aile:*Poaceae*

Cins:*Hordeum*– Arpa

Tür: *Hordeum vulgare* (Gramene, 2012).

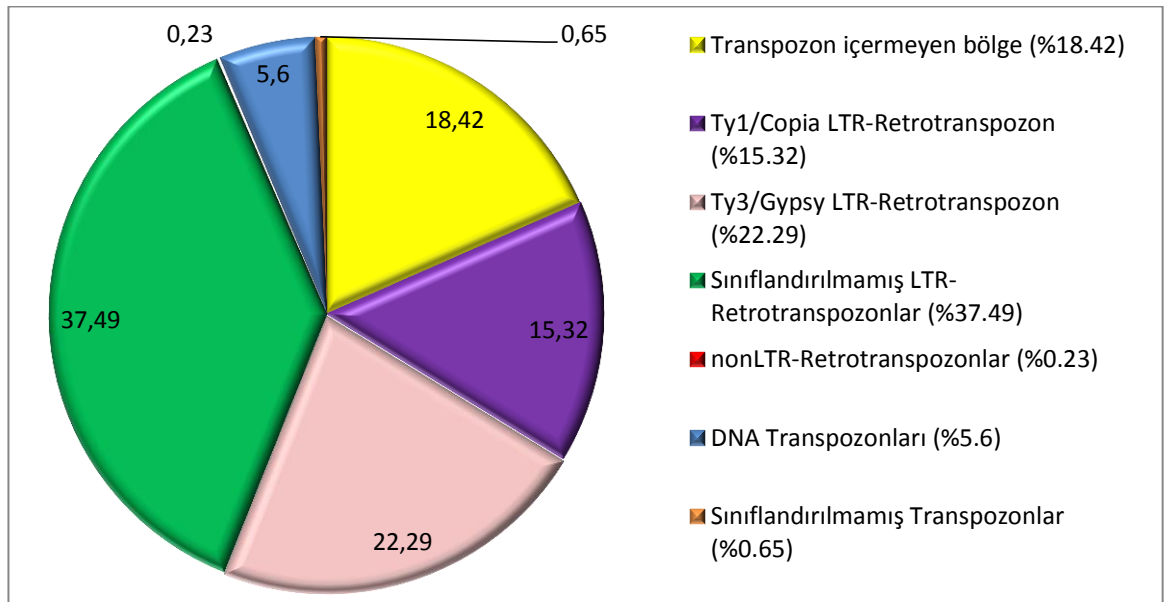
Hordeum cinsi 32 türden ve 45 taksondan oluşur. Bu taksonlar, diploid ($2n=2x=14$), tetraploid ($2n=4x=28$), heksaploid ($2n=6x=42$) sitotipleri içermektedirler. Her ne kadar, yabani arpa (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) sistematik olarak bir alt tür kabul edilse de, *Hordeum spontaneum* K. Koch. yazımına da sık rastlanılır (von Bothmer ve diğ., 1995; Badr ve diğ., 2000; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007). *Hordeum* cinsinin en önemli türleri *bogdanii*, *brachyantherum*, *bulbosum*, *depressum*, *jubatum*, *marinum*, *murinum*, *pusillum*, *secalinum* ve *vulgare* olarak sayılabilir (Vicient ve diğ., 1999; Vicient ve diğ., 2005; Gramene, 2009).

2.3.ARPA GENOMU

Haploid genom büyüklüğü yaklaşık olarak 5300 Mb'den oluşur. Genomunun büyük bir kısmı (%90) transpozonlar ve tekrarlı dizilerden oluştuğu için günümüz teknikleri ile

genom dizileme çalışmaları oldukça zordur. Bu nedenle 1997 yılında başlanan genom projesi henüz tamamlanamamıştır (Bennett ve Leitch, 2005; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007; Schulte ve diğ., 2009). Arpa genom projesindeki son durum The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) tarafından yayınlanmıştır.

Arpada transpozon miktarı fazla olmasına karşın DNA transpozonları çok düşük oranda (%5.6) bulunur. Retrotranspozonlar ise genomun %75.33'lük bir kısmını kapsar. Özellikle LTR-Retrotranspozonları genomun %75.1'lik bir kısmını oluşturur. LTR-Retrotranspozonların iki büyük alt grubu (Ty1/copia ve Ty3/gypsy) arpa genomunun yaklaşık %38'ini oluşturmaktadır. Buna karşın arpada nonLTR-Retrotranspozon miktarı oldukça düşüktür (%0.23). Şekil 2.5'te arpa genomundaki transpozonların yüzde miktarları verilmiştir (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).



Şekil 2.5: Arpa genomundaki transpozon yüzdeleri.
(The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012 kaynağından yararlanılarak oluşturulmuştur).

Bugüne kadar arpada 250'den fazla transpozon ailesi tanımlanmıştır. En iyi bilinen 14 transpozon ailesi arpa genomunun yaklaşık %50'sini oluşturur ve bunlardan 12 tanesi LTR-Retrotranspozonlardır. Arpada en yaygın olarak bulunan LTR-Retrotranspozonu Ty1/copia grubunda yer alan *Barley Retroelement-1 (BARE1)*'dir (Manninen ve Schulman, 1993).

2.4.ARPA DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay besi ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bitkilerin çok hızlı çoğaltılması totipotensi özelliklerine bağlıdır. Bitkilerin totipotensi özelliği sayesinde uygun besi koşulları altında tek bir hücreden tüm bir bitkiyi üretmek mümkündür. Embriyo kültürü, kallus kültürü ve protoplast kültürü gibi farklı yollarla bitkilerin doku kültürü koşullarında üretimi sağlanmaktadır. Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Kallus kültürlerini başlatmak için embriyo kültürleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Kültüre alınan hücrelerden bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ya da somatik embriyogenez ile meydana gelir.

Doku kültürü tekniklerinden yararlanarak, bitkiden alınan herhangi bir parça (eksplant) ile kısa sürede bitkinin istenen kısımlarının veya tüm bir bitkinin çoğaltımı mümkündür. Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyogenik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine ihtiyaç duyulmaktadır. Oksin içeren besin ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortamlara aktarılmaktadır. Bu aşamada ortamda oksin bulunması embriyo gelişimini engellemektedir. Bitki türü, kullanılan eksplant ve besin ortamının içeriğine bağlı olarak embriyogenesis doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir.

Doğrudan embriyogenesiste somatik embriyolar ara bir kallus safhası olmadan eksplant doku üzerinde bulunan tek bir hücre veya hücre gruplarından gelişirler. Doğrudan embriyogenesis için en fazla kullanılan eksplant olgunlaşmamış somatik embriyolardır (Finer, 1995).

Dolaylı embriyogenesiste eksplant yüksek oksin içeren besin ortamında kültüre alındığı zaman önce embriyogenik kallus oluşumu daha sonra da bu kallus içinde pro-embriyoların oluştuğu gözlenir. Bu kallus, oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığı zaman da pro-embriyolardan bipolar (kök ve sürgün ucu meristemleri aynı anda oluşan

sürgün eksenini) embriyolar oluşur ve şartlar uygun ise bu embriyolardan bitkicikler elde edilir (Tisserat, 1991).

2.5.SOMAKLONAL VARYASYONLAR

Somaklonal varyasyonların doku kültürü sırasında sıklıkla meydana geldiği daha önce belirtilmiştir (Gözükırmızı ve diğ.,1990; Peredo ve diğ., 2006).Somaklonal varyasyonlar genetik temelli olabileceği gibi epigenetik temelli varyasyonlarda doku kültüründe yüksek oranda meydana gelen değişikliklerdir.

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

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

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

2.6.TRANSPOZONLAR

Transpozonlar hareketli DNA parçalarıdır.Bu hareketleri sonucunda genomda insersiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyarabilir ve yeni gen alellerinin oluşmasına yol açabilirler.Bu nedenle transpozonların, evrimsel süreçte yeni türlerin oluşmasında etkili bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Lönnig ve Seadler, 1997; Fedoroff, 2000; Kidwell ve Lisch, 2000; Kazazian, 2004; Feschotte ve Pritham, 2007).

Transpozonlar kullandıkları hareket mekanizmaları temel alınarak iki grup altında sınıflandırılırlar. İlk grup olan retrotranspozonlar bir RNA ara ürünü kullanarak cDNA kopyalarını oluşturur ve genoma entegre olurlar. Bu nedenle retrotranspozonun her hareketi sonrasında genomdaki kopya sayısı artar. Buna karşın ikinci grup olan DNA transpozonları, genellikle kes-yapıştır şeklinde hareket ettikleri için kopya sayıları genomda sabittir (Finnegan, 1989; Wicker ve diğ., 2007; Kapitonov ve Jurka, 2008).

Retrotranspozonlar canlılarda en yaygın olarak bulunan transpozon çeşididir. Bugüne kadar bazı özellikleri bakımından farklılıklar gösteren pek çok retrotranspozon tanımlanmıştır. Bu nedenle retrotranspozonların sınıflandırılması henüz tamamlanamamıştır (Wicker ve diğ.,2007).

Büyük genomlu organizmaların çoğu tekrarlı DNA dizilerini içermektedir. Örneğin; mısır genomunun %60-80'i (Flavel ve diğ., 1974; Bennetzen, 1996; Heslop-Harrison, 2000; Meyers ve diğ., 2001) tekrarlı dizilerden oluşmaktayken buğday genomunun %83'ü (Wicker ve diğ., 2001) tekrarlıdır. Anlatımı yapılan genler arpa genomunun %5'ini oluşturmaktadır. Arpa genomunun geri kalan kısmı transpozonlardan oluşur. Retrotranspozonlar, retroviruslardakine benzer mekanizmalar aracılığı ile hücre içinde hareket etme yeteneğine sahip olan tekrarlı DNA dizleridir. Son zamanlarda dizilenen tahıl genomlarının uzun dizileri (kontig) tek bir kopyası olan ya da küçük gen aileleri halinde bulunan genlerdeki tekrarlı DNA'ların dağınık olarak bulunduklarını doğrulamaktadır (Schulman ve Kalendar, 2005).

2.7.TRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI

Transpozonlar için ilk sınıflandırma Finnegan tarafından 1989 yılında yapılmıştır. Finnegan, transpozonları transpozisyonları sırasında kullandıkları aracı moleküle göre sınıflandırmıştır. RNA molekülünü kullananlara sınıf I elementleri, DNA molekülünü kullananlara sınıf II elementleri adını vermiştir. Bu sınıflandırma biçiminde kullanılan tekrarlı DNA'lar da iki ana gruba ayrılır. Bunlardan ilki sınıf II DNA transpozonları olarak adlandırılan ve kes-yapıştır mekanizması ile hareket eden transpozabl elementleridir (TE). Diğeri ise retrotranspozonlar veya sınıf I elementleri olarak adlandırılan ve yeni bir lokusa yerleşen cDNA kopyalarının oluşumuna neden olan bir RNA aracılığı ile çoğalan transpozabl elementleri kapsamaktadır (Schulman ve Kalendar, 2005). Ancak MITE “Miniature Inverted Repeat Transposable Elements” adı verilen, kopyala-yapıştır mekanizması ile çoğalan RNA aracılı transpozonların bulunması bu sistemin yetersiz hale gelmesine neden olmuştur. Günümüzde Wicker ve diğ. (2007)'nin önerdiği sınıflandırma biçimi kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma biçiminde TE'ler hiyerarşik biçimde sınıflandırılmıştır. Bu sistemde transpozonlar hareket mekanizmaları temelinde Retrotranspozonlar (Sınıf I transpozonlar) ve DNA transpozonları (Sınıf II transpozonlar) olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

2.8.RETROTRANSPOZONLAR

Retrotranspozonlar ya da sınıf I elementleri uç kısımlarında LTR (long terminal repeat) adı verilen diziler taşıyıp taşıyamalarına göre iki gruba ayrılırlar. Uç kısımlarında LTR taşımayan SINE (Short Interspersed Elements) ve LINE (Long Interspersed Elements) adı verilen ve daha çok insan genomunda bulunan iki ayrı sınıf bulunmaktadır (Tablo 2.1). 5' ve 3' uçlarında LTR taşıyan retrotranspozonlar otonom özelliklerinin olup olmamasına göre ayrılırlar. Otonom özellikte olmayan retrotranspozonların iç bölgeleri anlatım yapmamaktadır. Dolayısıyla yaşam döngülerini tamamlamak için otonom özellikteki akrabalarını kullanmaktadırlar.

2.8.1. LTR Taşımayan Retrotranspozonlar

Tablo 2.1:Retrotranspozonlar.

RETROTRANSPOZONLAR				
LTR taşımayan Retrotranspozonlar	SINE LINE			
LTR Retrotranspozonlar	LTR	Otonom	Copia	<i>Tn1, BARE (BARE-2, BARE-1), Horpia</i>
			Gypsy	<i>RIRE-8, BAGY (BAGY-2, Laura, Latidu) Athila (Wham, Sabrina)</i>
		Otonom olmayan	TRIM	<i>Cassandra, Veju</i>
			LARD	<i>Sukkula, Dasheng</i>
			Morgane	<i>Morgane</i>

2.8.1.1.SINE (Short Interspersed Elements)

SINE'ler tRNA, 7SL RNA, 5S RNA gibi farklı boylardaki (80-100 bp) polimeraz III transkriptlerinin rasgele transpozisyonundan köken alan özgün bir gruptur. Transkripsiyon yapmak için kendi iç promotörleri bulunur ve replikasyon yapabilmeleri için LINE elementi tarafından kodlanan bir RT enzimi taşımaktadırlar. En iyi bilinen çeşidi Alu elementleridir. İnsan genomunda çeyrek milyon Alu kopyası bulunur (Wicker ve diğ., 2007)

2.8.1.2.LINE (Short Interspersed Elements)

Memelilerde özellikle de insanda bulunur. Nadiren bitkilerde de bulunur. LINE'ler Gag-benzeri ORF'lerde gözlemlenen bir RT enzimini ve nukleaz enzimini kodlar. 5' uç genellikle revers transkripsiyonun tamamlanmadan bırakılması nedeniyle kırpılmıştır. 3' uç poliA kuyruğu, "tandem" tekrarlar ya da daha basit bir ifadeyle Adenin nukleotitleri bakımından zengin bir bölgedir (Wicker ve diğ., 2007).

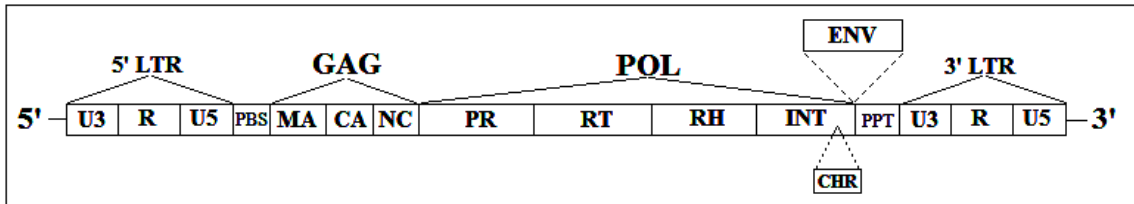
LINE ve *SINE*'lerde transpozonun yapısı ve replikasyonun yapılaş şekli LTR retrotranspozonlarından farklıdır. Bu elementler insan genomundaki esas transpozabl element sınıfıdır ve insan genomunun dinamiğinde önemli rol oynamaktadırlar (Kazazian ve Goodier, 2002). Bitkilerde bunun aksine genellikle LTR retrotranspozonları bu rolü üstlenir. *LINE* elementleri internal bir promotör taşır ve

sırası ile RNA'yı bağlayan ve kapsitlendiren proteini, endonukleazı ve revers transkriptazı kodlar. Replikasyon endonukleazın *LINE*'nin ters transkripsiyonu için gerekli olan ve primer olarak rol alacak serbest 3' hidroksil oluşturmak için kestiği integrasyon bölgesinde meydana gelir. *SINE*'ler replikasyonları için protein kodlamazlar. *SINE*'ler genellikle tRNA türevleridir ve bu nedenle RNA polimeraz III tarafından transkripsiyonları yapılır; transkripsiyonal olarak aktif hale getiren internal promotörleri taşırlar Replikasyonları ve yayılmaları için *LINE*'leri kullandıkları düşünülmektedir (Boeke, 1997; Lenoir ve diğ., 2001; Szafranski ve diğ., 2004).

Son zamanlarda LARD, TRIM ve Morgane adı verilen uç bölgelerinde LTR taşıyan otonom olmayan retrotranspozonlar bulunmuştur. Bu retrotranspozonların internal bölgeleri anlatım yapmamaktadır (Şekil 2.6.).

2.8.2. LTR Taşıyan Retrotranspozonlar

LTR-retrotranspozonları, alt sınıflarına göre içerdikleri ara domenlerde ve bu domenlerin transpozon içindeki konumlarında farklılıklar göstermektedirler. Tam bir retrotranspozonun hareketi için gerekli olan özgün domenler ve DNA dizileri Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmiştir (Havecker ve diğ., 2004).



Şekil 2.6: LTR retrotranspozonunun organizasyonu.

Retrotranspozon transkripsiyonal promotör ve terminatör taşıyan "long terminal repeat (LTR)"ler tarafından kuşatılır. LTR'ler her iki uçlarında da şekilde üçgen ile gösterilen kısa ters tekrarlı diziler taşır. Revers transkripsiyon PBS ve PPT domenlerinde başlar.

PBS ucu cDNA'nın (-) zincirinin sentezi için kullanılırken cDNA'nın (+) zincirini kodlamak için PPT dizileri kullanılır.

retrotranspozonun iç bölgesi retrotranspozonun yaşam döngüsü için gerekli olan proteinleri kodlar. Bu proteinler; kapsit proteini (GAG), aspartik proteinaz (AP) (AP poliproteini keser), integraz (IN) (cDNA kopyalarını genoma integre eder), revers transkriptaz (RT), RNazH (RH). (Yılmaz, S., 2013, doktora tezi)

Retrotranspozonlar genom boyunca bulunmalarına karşın, tahıllarda sıklıkla biri diğerinin içinde olacak şekilde yerleşmişlerdir ve retrotranspozon denizleri "retrotransposon seas" olarak tanımlanan bu bölgeler, gen adalarını çevreler (SanMiguel ve diğ., 1996).

Miktarları, genel dağılımları ve aktiviteleri moleküler markır geliştirilmesinde LTR retrotranspozonların ideal kaynak haline gelmesini sağlamıştır. İç bölge, daha önce

çalışılmamış olan bitki türlerinden retrotranspozonları izole etmek için gerekli olan evrimsel olarak korunmuş domenler içerir. LTR'ler genellikle aileler içinde iyi korunmuştur ve DNA parmak izi oluşturmak için primerler tasarlamaya uygundur.

2.8.2.1. Otonom LTR Retrotranspozonlar

Otonom LTR retrotranspozonları dizi benzerliği ve organizasyonları bakımından iki büyük kategoriye ayrılabilir.

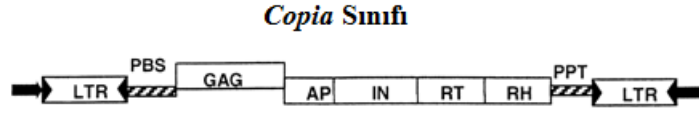
Bunlar;

- *Drosophila* tipi *Copia* elementine benzeyen ve
- *Gypsy* elementine benzeyen elementlerdir.

Otonom LTR retrotranspozonlar, retrotranspozonların non-LTR elementlerinden türevlenmişlerdir (Malik ve Eickbush, 2001). LTR retrotranspozonlarının yapıları ve yaşam döngüleri memeli retrovirüslerinin yaşam döngülerine benzemektedir (Kumar ve Bennetzen, 1999). 5'LTR promotör olarak işlev yapar, 3'LTR, terminatör bölgesini ve poliadenilasyon sinyallerini sağlar. Tahıl retrotranspozonlarının LTR'leri birkaç 100 bp'den 5kb'ye kadar değişkenlik gösterebilir ve LTR'nin son kısmında 5'TG..... CA3' yapısında evrensel bir küçük ters tekrarlar sahtiptir. Sırası ile eksi zinciri ve artı zinciri oluşturan 5' ve 3'LTR, revers transkripsiyon için doğrudan bağlanma bölgesidir. Bağlanma bölgeleri arasında bir ya da daha fazla anlamlı okuma çerçevesi "open reading frame" (ORF)'ne özelleşen bir iç bölge yer alır. "Copia" benzeri ("copia-like") elementlerde bu bölge anlamlı yönde bir kapsit proteini (GAG), işlevsel komponentlerde anlatımı yapılan poliproteini kesen aspartik proteinazı (AP), genomda cDNA'nın insersiyonunu yapan integrazı (IN), cDNA kopyalarını yapan terstranskriptazı (RT), replikasyonda gerekli olan RNaz H'ı (RH) kodlar (Turner ve Summers, 1999). "Gypsy" ve benzeri elementlerde integras ORF'nin sonunda bulunur.

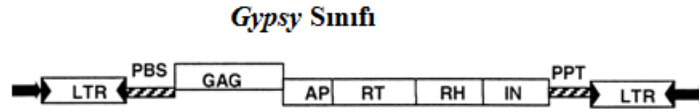
Copia, tek hücreli alglerden yüksek organizasyonlu bitki ve hayvanlara kadar pek çok canlı türünde yaygın olarak bulunan retroelementlerdir. Otonom LTR-Retroelementlerin tüm özelliklerini taşırlar; buna karşın POL bölgesinde yer alan ara domenlerin konumları bakımından diğer retroelementlerden ayrılırlar (Şekil 2.7). Ty1/copia alt grubu Pseudovirus, Hemivirus ve Sirevirus olmak üzere üç genusta sınıflandırılır (Eickbush ve Jamburuthugoda, 2008). 1990'lı yılların sonlarına kadar bu grubun üyelerinin ENV domeni taşımadıkları düşünülmekteydi. Buna karşın, yapılan

çalışmalarla bitkilerde çok yaygın olarak bulunan Sireviruslar'ın de ENV domenine sahip oldukları saptanmıştır (Laten ve diğ., 1998).



Şekil 2.7: Copia sınıfı Retrotranspozonlar.

Gypsy; bitki, hayvan ve mantarların genomlarında çok yaygın olarak bulunan retroelementlerdir. Yapısal özellikleri bakımından Ty1/copia grubu ile benzerlik göstermesine karşın INT domeninin konumu bakımında bu iki grup birbirinden ayrılır (Şekil 2.8).



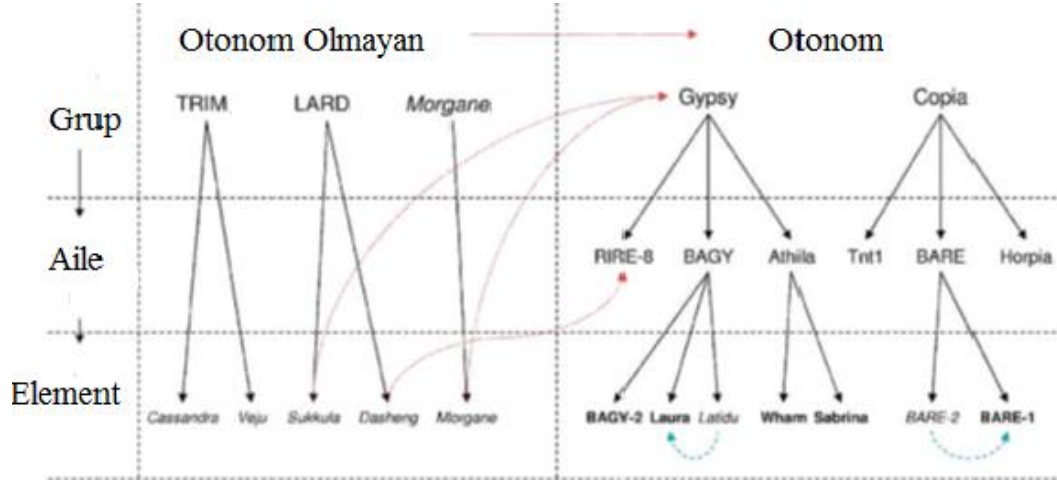
Şekil 2.8: Gypsy sınıfı Retrotranspozonlar.

Bu gruba giren retrotranspozonlar omurgalıların endojen retrovirüsleri ile büyük benzerlikler gösterirler. Bu nedenle evrimsel süreçte genoma sonradan dahil olan retrovirüsler oldukları düşünülmektedir. Bu gruba giren pek çok retroelement ENVdomenine sahiptir. Bu grubun sınıflandırılması henüz tamamlanmamıştır. Önceleri Metavirüs ve Errantivirüs olmak üzere iki genusta sınıflandırılmalarına karşın kromodomen taşıyan Ty3/gypsy retroelementlerinin tanımlanması ile sınıflandırma değiştirilip Chromovirus ve Non-chromovirus olarak ikiye ayrılmıştır (Llorens ve diğ., 2009).

2.8.2.2. Otonom Olmayan LTR Retrotranspozonlar

Bugüne kadar üç grup otonom olmayan LTR retrotranspozon tanımlanmıştır: Morgane, TRIM ve LARD'dır (Schulman ve Kalendar, 2005). Otonom olmayan ve otonom LTR retrotranspozon sistemlerinin sınıf II DNA transpozonlarına karakteristik olarak benzer olduğu tespit edilmiştir (McClintock, 1956; Burr ve Burr, 1982; Fedoroff ve diğ., 1983). Otonom olmayan DNA transpozonları hareket edebilmek için otonom transpozonların transpozazlarına ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.9). Son olarak MITE adı verilen bir element

otonom olmayan Sınıf II transpozabl elementlerin oldukça indirgenmiş bir formu olarak gösterilmiştir (Jiang ve diğ., 2003).



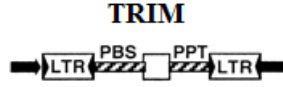
Şekil 2.7: Bitkilerdeki LTR Retrotranspozonlar.

Doku kültüründe seleksiyonla bitkilerde fonksiyonel retrotranspozonlar izole edilebilmesine rağmen büyük retrotranspozon ailelerindeki elementlerin çoğu stop kodonlarını (Grandbastien ve diğ., 1989) ya da tam boydaki poliproteinleri kodlayan “reading frame”leri etkisiz hale getiren küçük insersiyon-delesyonları içeriyor görülmektedir (Suoniemi ve diğ., 1998). Bu retro elementler bu yönüyle otonom olmayan sınıf II transpozona benzemektedir; fakat, oldukça indirgenmiş olmaları nedeniyle farklıdır.

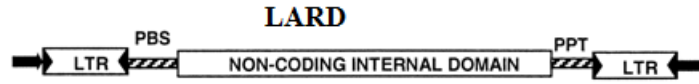
MITE elementlerine eş olan retrotranspozonlar bulunmuştur. Witte ve diğ. (2001) oldukça indirgenmiş otonom olmayan retrotranspozonların kısaca TRIM olarak adlandırılan bir sınıfını tanımlamıştır.

TRIM (Terminal Repeat retrotransposons In Miniature) elementleri 100-250 bp’lik terminal doğrudan tekrarlarından (LTR), tipik bir retrotranspozonun (-) zinciri PBS ve (+) zinciri PPT zincirlerine komşu primerlerden ve 100-300 bp’lik bir iç bölgeden oluşur. İç bölge kodlama yapmamaktadır. Schulman ve Kalendar (2005) arpadan insersiyonal olarak polimorfik, yüksek derecede tekrarlı aynı zamanda transkripsiyonu etkin olarak yapılan bir aile izole etmişlerdir. Bu aile aynı zamanda TRIM elementlerinden daha uzun, otonom olmayan bir retrotranspozon sınıfını oluşturular (Şekil 2.10). Bu

elementler 4.4 kb'lik LTR'leri taşıyan LARD (Large Retrotransposon Derivative) olarak adlandırılmıştır (Kalendar ve diğ., 2004).



Şekil 2.10: TRIM Grubu Retrotranspozonlar.



Şekil 2.11: LARD Grubu Retrotranspozonlar.

Shirasu ve diğ. (2000) tarafından tanımlanan *Sukkula* elementi, LARD'dan türevlenen solo bir LTR'dir (Şekil 2.11). *Sukkula* LTR dizileri TRIM'lerde ve otonom elementlerde olduğu gibi primer bağlanma bölgesinin yanında bulunur. Bununla birlikte 3.5 kb'lik internal domen tipik retrotranspozon proteinlerini kodlayan ORF taşımaz. Bu nedenle otonom değildir. İnternal domenler kodlama yapan retrotranspozonlardan oldukça farklıdır. Ayrıca LARD'lar iyi korunmuş sekonder RNA yapısını ortaya koyarlar. LARD'lar otonom olmamalarına karşın dizileri iyi korunmuştur, polimorfiktirler ve oldukça fazla kopya sayısına sahiptirler (yaklaşık 10^4 kopya). *Sukkula* elementi arpa dışında 13 türde tanımlanmıştır (Kalendar ve diğ., 2004).

2.9.LTR RETROTRANSPOZONUN YAPISI

2.9.1. Uzun Uç Tekrar (Long Terminal Repeat -LTR) Dizileri

LTR-Retrotranspozonların tanımlanmasında kullanılan en karakteristik dizilerdir. Retrotranspozonun her iki ucunda (5'-LTR ve 3'-LTR) da bulunurlar (Kumar ve Bennetzen, 1999; Ma ve diğ., 2004). LTR dizileri, retrotranspozon çeşitleri arasında uzunluk (~100-5000 arası) ve dizi farklılıkları gösterirler. Buna karşın, aynı retrotranspozonda bulunan 5'- ve 3'-LTR dizileri direkt yönde tekrar eden diziler olduğu için, herhangi bir mutasyon taşııyorsa iki LTR dizisi büyük oranda (%90-100) benzerdir.

LTR dizileri bir protein ürününe sahip değildir. Buna karşın, transkripsiyon faktörleri tanıma bölgelerini içerdiklerinden dolayı retrotranspozon hareketi için gerekli olan en önemli dizilerdir. Bir retrotranspozon, protein kodlayan genlerinin hepsini ya da bir kısmını kaybetse bile diğer retrotranspozonların enzimlerini kullanarak hareket edebilir. Buna karşın herhangi bir LTR dizisinde (5' ya da 3') mutasyon taşıyan retrotranspozonlar tamamen inaktif kalır. Bu nedenle, retrotranspozonların bir organizmanın evrimsel sürecinde aktivitesini kaybetmesi büyük ölçüde LTR dizilerinde meydana gelen mutasyonlara bağlıdır (Noma ve diğ., 1997).

Gen veri tabanlarında bulunan kontig dizilerinde, retrotranspozonlara ait LTR dizileri genellikle diğer retrotranspozonlar ya da işlevi bilinmeyen diziler tarafından bölünmüş olarak bulunur. LTR dizilerinde meydana gelen bu gibi parçalanmalar o LTR'ye sahip retrotranspozonun hareketini geri dönüşümsüz olarak engeller. Bununla birlikte pek çok retrotranspozon, LTR dizilerinde metilasyon potansiyeli olan CpG adacıkları taşır. Bu durum retrotranspozonun geçici olarak sessizleştirilmesini sağlar (Suzuki ve diğ., 2007). İnaktif durumdaki bu retrotranspozonlar içsel ya da dışsal faktörler sonucunda metil gruplarının uzaklaştırılması ile tekrar aktif hale gelebilir (Kashkush ve Khasdan, 2007). Bu gibi durumlarda komşu genlerin de anlatımlarını değiştirmeleri oldukça sık rastlanan bir durumdur. Organizmanın genomunda meydana gelen bu tür değişiklikler organizmanın gelişimini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. Özellikle bazı retrotranspozonların kanserleşme ile ilgili olabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Bratthauer ve Fanning, 1992; Estecio ve diğ., 2010; Wilkins, 2010).

Mutasyona uğramamış tam bir LTR dizisi üç bölgeden (U3, R ve U5) oluşmaktadır (Şekil 2.6). Bu bölgeler retrotranspozon mRNA'sında bulunup bulunmama durumlarına göre isimlendirilmiştir. U3 bölgesi ("Unique for 3'end of RNA") 200-1200 nükleotit uzunluğundadır. Retrotranspozon mRNA'sının sadece 3'-LTR'sinde bulunurken; genomdaki kopyasında her iki LTR'de de bulunmaktadır. Promotör bu U3 bölgesinde yer alır. Bununla birlikte bir kaç "cis-acting" dizinin (kısa palindromik ve tekrar dizileri) de U3 bölgesinde yer aldığı bildirilmiştir (Pouteau ve diğ., 1994; Takeda ve diğ., 1998). R bölgesi ("Repeated region") retrotranspozon mRNA'sının her iki LTR'sinde de bulunan ve direkt yönde tekrar eden dizidir. U5 ("Unique for 5'end of

RNA”) bölgesi ise 75-250 nükleotit uzunluğundadır ve retrotranspozon mRNA’sının 5’-LTR’sinde bulunmasına karşın, genomdaki kopyada her iki LTR’de de bulunmaktadır (SanMiguel ve diğ., 1998; Jiang ve diğ., 2002).

2.9.2. Primer Bağlanma Bölgesi (Primer Binding Site -PBS)

PBS dizisi 5’-LTR ve retrotranspozondomenlerinin arasında bulunan yaklaşık 18 nükleotit uzunluğunda bir dizidir. Retrotranspozon mRNA’sının revers transkripsiyonu (negatif DNA ipliğinin sentezi) sırasında ihtiyaç duyulan primerin bağlanma bölgesidir. Revers transkripsiyon sırasında kullanılan primer hücresel kökenli bir tRNA’nın 3’ bölgesidir. Bu nedenle retrotranspozonlar primer bakımından konak hücreye bağımlıdır. Kullanılan tRNA çeşidi retrotranspozon çeşitleri arasında farklılık göstermektedir (Mak ve Kleiman, 1997; Gabus ve diğ., 1998).

2.9.3. Grup-spesifik Antijen (Group-specific antigen -GAG)

Retrotranspozonlarda protein kodlayan domenlerden biridir. PBS bölgesinden sonra bulunmaktadır. Genellikle diğer domenler ile ortak bir açık okuma çerçevesine (“Open Reading Frame” - ORF) sahiptir. Buna karşın bazı retrotranspozonlarda ayrı bir ORF’ye sahip olan GAG domenlerinin varlığı da bildirilmiştir (Ohtsubo ve diğ., 1999; Wright ve Voytas, 2002).

GAGdomeni, retrotranspozon mRNA’sının sitoplazmada paketlenmesini sağlayan proteinleri kodlar. Paketlenme sonucunda oluşan yapı, virüs benzeri parçacık (“Virus Like Particle” - VLP) olarak adlandırılır. Retrotranspozon mRNA’sının revers transkripsiyonu bu yapı içinde gerçekleşir (Jaaskelainen ve diğ., 1999).

GAGdomeninin kodladığı polipeptid sitoplazmada matriks (Matrix - MA), kapsid (Capsid - CA) ve nükleokapsid (Nucleocapsid - NC) proteinleri olarak işlenir (Wills ve Craven, 1991). MA, sitoplazmada serbest olarak bulunan VLP’nin nükleus membranına yönelmesi için gerekli olan sinyalleri taşıyan proteindir. CA ise viral kılıfın başlıca yapısal bileşenidir. Otonom olan her retrotranspozon kendi kodladığı GAG proteinleri tarafından paketlenir. NC, retrotranspozona bu özelliği kazandıran proteindir ve retrotranspozon mRNA’sı ile etkileşime girerek özgün olarak paketlenmeyi sağlar (Khan ve Giedroc, 1992).

2.9.4. Poliprotein (Polyprotein -POL)

POL bölgesi retrotranspozonun hareketi için gerekli olan dört enzim (proteaz, PR; revers transkriptaz, RT; RNazH, RH; ve integraz, INT) kodlar. POL içinde yer alan bu enzimler tek bir proteinin alt domenleri olarak ya da ayrı ayrı işlev görürler.

Proteaz (PR), POL bölgesi tarafından kodlanan ve retrotranspozonun replikasyonu sırasında görev alan proteinlerin işlenmesinden sorumlu olan 90-150 amino asit uzunluğunda proteolitik bir enzimdir. Aspartik peptidaz (AP) olarak da adlandırılmaktadır. Tek olarak bulunabileceği gibi, GAG ya da POL proteinlerinin bir alt domeni olarak da bulunabilir (Pearl, 1987).

Revers transkriptaz (RT), RNA bağımlı bir DNA polimerazdır. Transkripsiyon sonrasında retrotranspozon mRNA'sının tekrar DNA'ya çevrimini sağlar. POL proteininin yaklaşık 350 amino asitlik bir bölümünü kapsar(Flavell, 1995; Xiong ve Eickbush, 1988) .

RNazH (RH), revers transkripsiyon sırasında ilk DNA zinciri (negatif DNA ipliği) sentezlendikten sonra meydana gelen RNA-DNA hibritindeki RNA'nın yıkımından sorumludur. Genellikle revers transkriptazın C-terminalinde işlev görür(Malik ve Eickbush, 2001).

İntegriz (INT), reverstranskripsiyonu gerçekleştirmiş olan retrotranspozon DNA'sının genoma insersiyonundan sorumludur. N-terminal, sentral ve C-terminal olmak üzere üç alt bölge içerir. N-terminal bölgesi çinko parmağı (zinc finger) motifi taşır ve insersiyonun gerçekleşeceği DNA bölgesine bağlanır. Sentral bölge katalitik bölgedir ve konak hücre DNA'sının kesilmesinden sorumludur. C-terminal bölgesinin retrotranspozon DNA'sı ile etkileşimde olduğu düşünülmektedir(Malik ve Eickbush, 1999).

2.9.5. Polipürin Bölgesi (Polypurine Tract-PPT)

PPT bölgesi yaklaşık 10 adet pürin bazının (A-G) tekrarlanması ile oluşur. 3'-LTR ile INT domeninin kesiştiği sınırdaki bulunur. Retrotranspozonlarda bir ya da birkaç adet PPT bölgesi bulunabilir. PPT, reverstranskripsiyon sırasında DNA-RNA hibritindeki

RNA'nın yıkımı sonucunda tek zincirli halde kalan DNA ipliğinin (negatif DNA zinciri) koplementlerinin (pozitif DNA zinciri) sentezinin başlatılmasında görev alır(Wilhelm ve Wilhelm, 2001).

2.9.6. Nadir Bulunan Genler

Otonom olan bir retrotranspozon kendi replikasyonunu gerçekleştirebilmek için GAG, PR, RT, RH ve INTdomenlerinin hepsine ihtiyaç duymaktadır. Buna karşın bu domenlerden birkaçını ya da hepsini kaybetmiş olan retrotranspozonlar da başka retrotranspozonların enzimlerini kullanarak aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Bu domenlere ek olarak, bazı retrotranspozonlar replikasyon için gerekli olmayan, buna karşın; retrotranspozona farklı özellikler kazandıran bazı ekstra domenlere de sahip olabilirler.

Zarf (Envelope - ENV) proteini, retrovirüslerde tanımlanmış olan ve virüse hücreden hücreye enfeksiyon yapabilme özelliği kazandıran proteindir. GAG proteinleri ile sarılı durumda bulunan VLP'nin, paketlenip hücre zarına yönlendirilmesinden sorumludur. Bazı LTR-Retrotranspozonlar da ENVproteini kodlayan domenlere sahiptirler (Wright ve Voytas, 1998). Buna karşın, evrimsel süreçte bu retrotranspozonların çoğu ENV domenlerini kaybetmişlerdir. Bu retrotranspozonlar ENVdomeniniyeniden kazanarak retrovirüslere dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle endojen retrovirüsler (ERV) olarak da adlandırılırlar. ENVdomeni, retrovirüslerde olduğu gibi retrotranspozonlarda da GAG proteinleri ile çevrilmiş retrotranspozon DNA'sının hücreler, hatta organizmalar arasında enfeksiyonunu sağlar. ENVdomeni,GAG ve POLbölgelerinden ayrı bir ORF'ye sahiptir (Vicent ve diğ., 2001; Neumann ve diğ., 2005). Sinyal peptid, füzyon peptid, “anchor” peptid, peptid kesim bölgesi, glikozilasyon bölgesi ve C-terminal bölgelerinden oluşur. İki alt ünite içerir: İlk alt ünitesi olan yüzey (surface - SU) proteini, özgün hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmayı sağlayan antijenik bölgeyi içerir; ikinci alt ünitesi ise bir transmembran (TM) motifi içerir ve membran füzyonu yaparak konak hücreye girişi sağlar(Benit ve diğ., 2001).

Kromodomen (Chromodomain - CHR),LTR-Retrotranspozonların bir alt grubuna (Chromoviruses) özgün bir domendir (Kordis, 2005). Ayrı bir protein olarak

kodlanmaz. INT proteininin C-terminalinde bulunur ve yaklaşık 50 amino asit uzunluğundadır. Kromodomen, ökaryotlarda kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi ve gen anlatımının kontrolünde görev alır. Retrotranspozonlardaki en önemli fonksiyonu ise yeni oluşan retrotranspozon kopyasının genomda özgün bölgelere hedeflenmiş insersiyonunu sağlamaktır. CHR domeni, heterokromatin bölgeleri için özgün olan histon 3 proteininde 9. pozisyondaki lizin bakiyesinin (H3K9) metilasyonunu tanır ve buraya bağlanır. Retrotranspozonun genoma entegrasyonu bu bölgede gerçekleşir. Böylece retrotranspozon kopyasının gen bölgelerine girerek mutasyonlara sebep olması engellenir (Malik ve Eickbush, 1999)(Yılmaz, S., 2013).

2.10. SUKKULA

2.10.1. *Sukkula* Elementinin Keşfi

Shirasu ve diğ. (2000) büyük genomlu organizmalarda retrotranspozonlar ve genom büyümesi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere arpa Rar1 lokusunda kontig özellikte olan 66 kb'lik kısmını analiz etmişlerdir. Lokusun 6245. ve 11.204. nukleotidleri arasındaki kısım, arpa Mlo lokusundaki intergenik dizilere ve bir *BARE-1* elementinin 3'LTR'sinde yer alan bir insersiyon dizisine benzerlik göstermektedir. Bu 5 kb uzunluğundaki dizi değişken derecelerde dizi benzerliği ortaya koymaktadır. 1788 bç'lik bir segment *BARE-1* LTR'de bulunan kopyadan internal olarak ayrılmış görünmektedir. *BARE-1* LTR'deki insersiyon CCTAG şeklinde olan 5 bç'lik doğrudan tekrarlarla kuşatılmıştır. Aynı şekilde Rar1 lokusundaki 5 kb'lik dizi de CACCA şeklindeki 5 bç'lik doğrudan tekrarlarla sınırlandırılmıştır. 5 kb'lik dizi retrotranspozon türevleriye ilişkilendirilmiştir. Bu insersiyon bölgesi Fince'de mekik anlamına gelen *Sukkula* olarak adlandırılmıştır. *Sukkula*'nın terminal dizileri *gypsy* benzeri retrotranspozonların LTR terminal bölgelerine benzerdir. Kontigdeki *Sukkula* kopyalarının hiç biri LTR dizileriyle bağlı *gypsy* benzeri poliproteinlere ilişkin kodlama yapan dizi taşımamaktadır. Shirasu ve diğ. (2000), *Sukkula* internal domenini arpada başka yerlerde de tanımlamışlardır. Bu nedenle kontigdeki *Sukkula* dizileri orijinal elementin iki kopyası arasında rekombinasyonla oluşturulan yeni bir arpa retrotranspozonunun solo LTR'lerini temsil etmektedir.

Schulman ve Kalendar (2005) *Sukkula* elementlerini LARD sınıfına dahil etmişlerdir. Bu sınıfın üyeleri protein kodlama domeni olmayan TRIM'lere benzemektedir. Fakat primer yapısı ve kodlama kapasitesi oldukça indirgenmiş olmasına karşın sekonder yapısı oldukça korunmuş büyük bir internal domene sahiptir. Schulman ve Kalendar (2005) arpada LARD LTR dizilerini, internal LARD dizilerini, DNA ve RNA bilgi içeriklerini ve RNA katlanmalarını belirlemişlerdir. Buna göre;

2.10.2. LARD LTR'ler Uzun Korunmuş Uçlara Sahiptir

LARD elementinin yaklaşık 4.5 kb'lık LTR'sinin yaklaşık 2250 bç'si (yaklaşık %50'si) korunmuştur.

2.10.3. LARD İnternal Domenleri Oldukça Korunmuştur Ancak Kodlama Yapmamaktadır

LTR'ler arasında yer alan internal bölgeyi çoğaltmak için LTR'nin 5' ve 3' uçlarına uyan primerler tasarlamışlardır, çoğaltım genomik DNA'dan yapılmıştır ve dizilenmiştir. Buna göre 5' LTR'den hemen önce başlatıcı metionil tRNA'ya uyan oldukça korunmuş bir domen bulunmuştur. Bu pozisyonda revers transkripsiyon sırasında cDNA sentezinin başlamasında eksi zincirin bağlama bölgesi (priming site) olarak görev yapan tRNA'ya homolog bir domen, retrotranspozonlarda ve retrovirüslerde benzerdir. cDNA sentezinin başlaması için yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesi başlatıcı tRNA metiyonindir. LARD'lar için 5'-TGGTACAGAGCC-3' ortak dizidir. İlk onbir nükleotid ve onüçüncü nükleotid tamamen korunmuştur, onikinci nükleotid bir sitozindir fakat arpada değişkendir. Suoniemi ve diğ. (1997) onbir retrotranspozon ailesinin PBS dizilerinde, onikinci nükleotidin değişken olduğunu belirtmişlerdir.

İşlevsel retroelementler, Guanin ve Adenin bakımında zengin "polypurine tract" (PPT) olarak bilinen korunmuş bir segment içerirler. PPT, sentezlenen cDNA'nın ikinci zincirinde artı zincirin revers transkripsiyonu için bağlanma bölgesi olarak görev yapar. LARD'ın internal domenlerinin bu kısmındaki dizileme analizleri PPT'in oldukça korunmuş olduğunu, oniki nükleotitten onbirinin (5'-AGTGGAGGAGAG-3') pürin nükleotidi olduğunu göstermektedir. Bu segmentin ucundaki 5'-GGGAG-3' dizisi ortaktır. Retrotranspozonlar ve retrovirüslerde bu dizi değişkendir. Bu dizi TRIM

elementlerinde rapor edilen 5'-GAGGGGGCG-3' dizisinden oldukça farklıdır (Witte ve diğ., 2001).

İyi korunmuş PPT ve PBS domenleri LARD elementlerinin revers transkripsiyonu yapma kapasitelerini kaybetmediklerini ortaya koymaktadır. PBS dizilerinin aşağı yönündeki internal domen DNA düzeyinde oldukça korunmuştur ve 710. nükleotide kadar ulaşan bir bloğun içerisinde yer almaktadır. Arpada, 740. nükleotitten 920. nükleotide uzanan blok kayıptır. 1160. nükleotitten 2320. nükleotide kadar tümü korunmuştur. 2340. nükleotitten 2660. nükleotide kadar az korunmuştur, halbuki 2660-2880 nükleotidler arası oldukça korunmuştur. Bu bölgeden 3200. nükleotide kadar zayıf olarak korunmuş bölge bulunmaktadır. 3500'den 3920'ye kadar ve 4300'den 4418'e kadarki terminal bölge oldukça korunmuştur.

Schulman ve Kalendar (2005) farklı cinslere ait elementler arasında yüksek korunmuşluk bulunması nedeniyle LARD elementlerinin internal domenlerinin LTR retrotranspozonlarda evrensel olarak bulunan ürünleri (intergraz ve revers transkriptaz) kodlayan ORF'leri taşıyıp taşımadığını belirlemek için analizler yapmıştır. Ancak temel retrotranspozon proteinini kodlayan yeterli uzunlukta ORF bulunamamıştır. Bu proteinleri kodlayan domenler, ORF'ler arasına indeller (insersiyon-delesyon) ve stop kodonları girmesi ile bölünmüş olabilirler. Internal domenler ve ORF'ler için DNA, protein ve EST (Expressed Sequence Tag) düzeyinde yapılan BLAST araştırmalarında retrotranspozonlara ya da retroviral ürünlere uyan bir ürün elde edilememiştir. Bu nedenle internal domenler DNA düzeyinde iyi korunmuşlardır fakat kodlama yapmamaktadırlar.

2.10.4. LARD Elementlerinin Transkripsiyonu Yapılır

En son yapılan BLAST çalışmaları LARD LTR'lerinin etkin promotörler olduğunu ortaya koymuştur. LARD elementleri kendi insersiyon bölgelerinde polimorfiktir ve rekombinasyon harita yapımında bu özellikleri kullanılmaktadır (Manninen ve diğ., 2000; Boyko ve diğ., 2002). *Sukkula* LARD LTR, incelenmiş herhangi bir retrotranspozona ait EST'ler ile eşleşmiştir (Schulman ve Kalendar, 2005). *H. vulgare*, *H. murinum*, *H. patagonicum* ve *H. marinum*'dan alınan LARD dizilerini kullanan

BLAST çalışması, elementlerin hem LTR'sinin hem de internal domenlerinin EST'lere uyduğunu göstermektedir (Schulman ve Kalendar, 2005).

2.10.5. LARD İnternal Domenleri İyi Korunmuş RNA Sekonder Yapıları Oluştururlar

LARD elementlerinin çarpıcı bir özelliği kodlama yapmayan internal domenlerinin korunmuş olmasıdır. Schulman ve Kalendar (2005), 13 tahıl türünden 12'sinde internal domenlerin oldukça korunmuş ortak RNA katlanmaları oluşturduğunu belirlemişlerdir. Dizilenen elementlerin RNA transkripsiyon ürünleri, 5'LTR'nin 3' ucunun sonundan 200 bç aşağıda başlayan ~200 bç'lik bir saç tokası yapısı göstermektedir. LARD internal bölgelerindeki sekonder yapılarında gözlemlenen korunmuşluk, yüksek dizi korunmuşluğunun bir getirisi olarak açıklanamaz. Homolog dizilerdeki küçük değişiklikler sekonder yapıda etkili değişikliklere neden olur. LARD internal domenlerindeki bu 5' saç tokası yapısının yüksek korunmuşluğunun hangi biyolojik fonksiyonla ilişkili olduğu bilinmemektedir.

Akraba türler arasında saç tokası yapısının pozisyonel olarak korunmuşluğu, dizi homolojisinden çok RNA yapısının biyolojik işlevi sonucudur. LARD internal domenlerindeki bu 5' saç tokasının korunmuşluğu biyolojik bir fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Transkriptlerdeki saç tokası yapısı, HIV gibi retrovirüslerde farklı işlevlere sahiptir: küçük saç tokası paketlenme sinyali olarak (Kerwood ve diğ., 2001), reverse transkripsiyonda (Driscoll ve diğ., 2001), transkripsiyonda (Roebuck ve Saifuddin, 1999) ve RNA'nın nükleer transportunda (Yang ve diğ., 2000).

2.11. ARPADA LARD ELEMENTLERİNİN BULUNMA SIKLIĞI VE ORGANİZASYONU

Schulman ve Kalendar (2005), yaptıkları DNA jel blot analizleri, BAC klonlama analizleri, PCR çoğaltım analizleri ve floresan in situ hibridizasyon çalışmaları sonucunda LARD elementlerinin arpa genomunda çok sayıda bulunduğunu belirlemişlerdir. Haploid arpa genomunda 1.3×10^3 tam boyda LARD ve 1.2×10^4 Sukkula gibi solo LARD LTR tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra tam boy BARE-1

retrotranspozonun $\sim 1.32 \times 10^4$ kopyası bulunur (Vicient ve diğ., 1999). Rekombinasyon solo LTR'ler oluşturmaktadır, fakat bunun sıklığı retrotranspozondan retrotranspozona değişebilir. LTR'lerin rekombinasyona uğrama eğiliminin LTR uzunluğu ile doğrudan ilişkili olduğu Shirasu ve diğ. (2000) tarafından belirtilmiştir. LARD LTR'ler çok uzundur (~ 4.5 kb), elementler arasında 5' uçta yalnızca 400 bp ve 3' uçta 1900 bp iyi korunmuştur. Korunmuş 3' uç toplamda yaklaşık BARE-1 LTR kadar uzundur. Kopya sayıları farklı olmasına karşın solo LTR'lerin tam boy elementlere oranı BARE-1 için yaklaşık 11:1 ve LARD'lar için ise 8.9:1'dir. Bu durum her elementin uzunluğu ile bağlantılı ve aynı zamanda rekombinasyonun bağımsız olma olasılığı ile tutarlıdır.

2.12. SUKKULA ELEMENTİNİN ÖZELLİKLERİ

Yaklaşık 4.4 kb boyutunda LTR'ler taşır; yaklaşık 3.5 kb'lık sentral domen revers transkriptaz bağlanma bölgesini içermektedir ve dizisi korunmuştur fakat tipik retrotranspozon proteinlerini kodlayan ORF taşımamaktadır. Bununla birlikte iyi korunmuş sekonder RNA yapılarını ortaya koymaktadırlar. Bu özellikler LARD olarak adlandırılan yeni tanımlanan bir element sınıfını tanımlamaktadır. Bu üyeler LTR retrotranspozonların *gypsy* sınıfının üyeleri olarak görünmektedir. LARD'lar otonom olmamalarına rağmen transkripsiyonları yapılmakta ve insersiyon bölgelerinin polimorfizm göstermesi nedeniyle rekombinasyonel olarak haritalamaları yapılabilmektedir. Genom boyunca tahminen 1.3×10^3 tam boy kopya ve 1.16×10^4 solo LTR yayılmaktadır (Kalender ve diğ., 2004).

2.13. LTR RETROTRANSPOZONLARIN YAŞAM DÖNGÜSÜ

1. LTR'nin yaşam döngüsü transkripsiyonla başlar. Transkripsiyon LTR'nin 5' ucundaki R bölgesinde başlar 3' LTR'nin R bölgesinde sonlanır ve sentezlenen mRNA molekülü sitoplazmaya taşınır.
2. Bu mRNA zincirinden GAG ve POL proteinlerinin translasyonu yapılır. POL proteinaz tarafından kesilir RT-RH ve INT proteinlerini oluşturur.
3. Genomik RNA paketlenmek üzere dimerize olur (iki mRNA bir çift zincir oluşturur).
4. GAG tarafından VLP oluşturulur ve genomik RNA bu yapı içerisine paketlenir.
5. cDNA sentezi bu içerisinde yapılır ve gRNA parçanır.

hücrel transkripsiyon mekanizması üzerinde parazittir. Süreçte LTR eğer etkin bir poliadenilasyon sinyali taşırsa poliadenile olmuş mRNA ürünü oluşması beklenir (Besansky, 1990; Suck ve Traut, 2000) ve mRNA sitoplazmaya taşınır.

LTR retrotranspozonlarının anlatım düzeyi stres ile uyarılsa bile genel olarak klasik genlerden çok daha düşüktür (Wessler ve diğ., 1995; Jaaskelainen ve diğ., 1999). Bunun nedeni LTR'nin zayıf bir promotör olması ya da metilasyon, heterokromatin oluşumu ve RNA interferansı kapsayanolası mekanizmalar ile transkripsiyonel ya da postranskripsiyonel baskılamadır (Hirochika ve diğ., 2000). LTR'den transkripsiyonun yapılamaması yakınlardaki genlerin aşırı anlatım yapmalarına ya da baskılanmalarına yol açabilir (Kashkush ve diğ., 2002, 2003). Bazı özgün elementler aynı zamanda bir *polIII* promotörü aracılı olan alternatif anlatım yollarına sahip olabilirler.

2.13.2. Translasyon

Şimdiye kadar çalışılmış otonom olmayan tüm gruplarda (LARD, TRIM ve Morgane) transpozisyon için gerekli olan potansiyel polipeptitleri oluşturan ORF bulunamamıştır. Bu nedenle bu grup elementler çoğalmak ve yayılmak için diğer retrotranspozonların polipeptitlerini parazit olarak kullanır.

Otonom retrotranspozon gruplarında bisistronik RNA ilgili ORF'yi kullanarak GAG ve POL proteinlerine translasyonu yapılır. İki ORF arasında translasyonel geçiş farklı yollarla gerçekleşebilir. GAG ve POL ORF'leri arasındaki dizi küçük tekrarlı bir motif (AAAAA gibi) taşır, bu durum çerçeve kayması aracılığı ile ikinci ORF'nin translasyonuna izin verir.

2.13.3. Nukleokapsit Oluşumu, Dimerizasyon ve Paketlenme

Retroviral GAG proteinleri fonksiyonel üç domene sahiptir (polipeptidler bir GAG öncüsünden itibaren ayrılır). Bunlar LTR retrotranspozonlarının GAG'ları aracılığı ile paylaşırlar. Bu üç domen;

- 1) kapsit (polimerizasyon);
- 2) nukleokapsidin kendisi, çinko-parmaklarına komşudur ve bazik rezidüleri vardır (nükleik asit etkileşimleri);

3) matriks domen (kılıf proteini ile ilişkili) (Adamson ve Jones, 2004).

Bitki LTR retrotranspozonlarının GAG'ları kapsit ve nukleokapsit domenlerini taşımaktadır ve matriks domenine çok az benzeyen bir yapıya sahiptirler.

Virus benzeri yapılar - VLP ("Virus Like Particles") RNA'nın revers transkripsiyonunun meydana geldiği yapılardır. Kapsit domeni aracılığı ile GAG polimerize olarak VLP yapısını meydana getirir. RNA'nın VLP'nin içine taşınması paketlenme olarak adlandırılır. GAG'nın polimerize olarak RNA'yı paketlemesinde, RNA molekülünün sekonder yapısı etkili olur. Sekonder yapı, GAG tarafından paketlenme için PSI ("Packaging Signal") sağlar. Bu sinyal sayesinde, paketlenme gerçekleşir. Bu sinyali, GAG proteinin çinko parmakları ya da GAG proteinin nukleokapsit domeninin bazik rezidüleri tanır (Harrison ve diğ., 1995; Evans ve diğ., 2004).

PSI dizisi genel olarak PBS (primer binding site)'den hemen sonra yer almaktadır fakat GAG'ın AUG dizisinin önündedir. LTR retrotranspozonları için PSI dizisinin bulunduğu yer henüz belirlenememiştir. Bununla birlikte yapısal RNA korunmuşluk düzeyi yüksek olan bu bölgede, özgün motiflerin bulunmasının yanı sıra sinyal dizisinin PBS'nin yakınında oluşu, retrovirüs ve retrotranspozon paketlenmesi için ortak bir mekanizma olduğunu düşündürür (Sabot ve Schulman, 2006).

RNA'nın paketlenmeye devam etmesi için PSI dizisi gerekli olduğu için paketleme mekanizması retrovirüsler için tamamen özgündür. Aynı şekilde PSI (paketlenme sinyali) kaybolursa retroviral enfeksiyon oldukça azalır. Bununla birlikte paketlenmede, bazı kaymalar ve hatalar olur. Bu dizilerin çoğu ilgili promotördeki kusurdan dolayı inaktiftir.

Otonom olmayan gruplar, otonom olan gruplara kıyasla genomda daha etkin bir biçimde yayılım gösterir (Witte ve diğ., 2001; Kalendar ve diğ., 2004; Sabot ve diğ., 2005, 2006; Antonius-Klemola ve diğ., 2006). Bu nedenle otonom olmayan gruplar aktif partnerleri ile ortak ve özgün PSI dizilerini paylaşırlar. Alternatif olarak, özgün olmayan PSI dizileri, farklı VLP'lerin paketlenmesine izni verebilir.

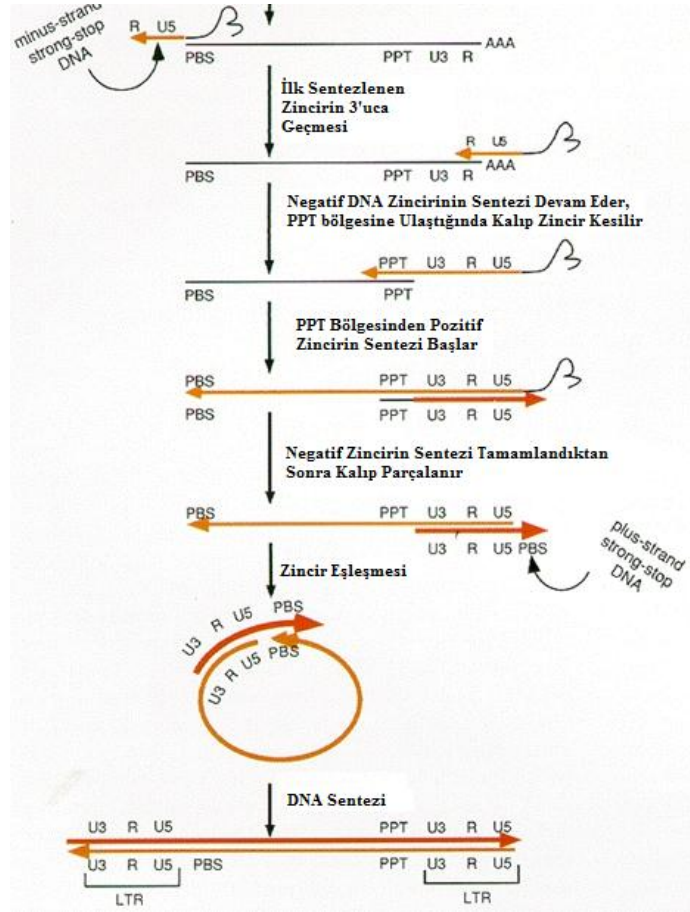
Retroviral RNA, genellikle VLP içerisinde dimeriktir. Bu dimerizasyon ya önce ya da paketlenme ile eş zamanlı olarak meydana gelir (Şekil 2.12. c ve d; Brunel ve diğ., 2002). LTR transpozonları için yalnızca ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) Ty1 elementi dimerik olarak gösterilmiştir. Dimerizasyon, dimerizasyon başlatıcı sinyaller (DIS) aracılığı ile meydana gelir. Bunlar proteinlerin yokluğunda bile iki RNA'nın bir araya gelmesine ve etkileşimine izin veren sinyallerdir. Sinyal PSI'ya yakın bir simetrik ilmek tarafından oluşturulur. Bu kovalent olmayan simetrik moleküller arası etkileşim, retrovirüslerde “kissing-loop complex” olarak adlandırılır (Paillart ve diğ., 2004).

2.13.4. Revers Transkripsiyon ve cDNA Sentezi

Retroelementlerin cDNA sentezi, büyük ölçüde retrovirüslerden ve maya retrotranspozonlarından köken almıştır (Şekil 2.12. d-f). RNA paketlenince ‘R-R’ (“repeat”) eşleşmesini kullanarak bir “toka” yapısı oluşturur. Genomik RNA'nın PBS dizisine bir tRNA bağlanır. Böylece negatif DNA zincirinin sentezi başlar. Başlangıçta transkripsiyon LTR'nin 5' ucuna doğru ilerler, R bölgesinde “güçlü stop” sinyali oluşturur ve sentez bu noktada sona erer. Daha sonra oluşan DNA-RNA hibridindeki gRNA RnazH tarafından parçalanır. Sentezlenen DNA molekülü primer olarak kullanılmak üzere genomik RNA'nın 3' bölgesinde R' bölgesi ile eşleşir ve negatif DNA zincirinin sentezi yeniden başlayarak PPT bölgesine kadar devam eder. Zincir uzaması PPT'ye ulaştığında gRNA bu noktada kesilir. Negatif zincirin sentezi PPT'yi de içine alarak devam eder. 5' R bölgesinde tamamlanır. Ters yönde de PPT'den itibaren pozitif zincirin sentezi başlar. 3' U bölgesine kadar devam eder. Sentezlenen kısmi pozitif zincir sentezi tamamlanmış olan negatif zincir ile eşleşir ve yuvarlanan halka modeline benzer bir mekanizma ile pozitif zincirin eksik kısımlarının sentezi tamamlanır.

Revers transkripsiyon özgün bir RNA kalıbına özgü değildir ve herhangi bir paketlenmiş RNA tek zincirli hale geçebildiği müddetçe revers transkripsiyonu yapılabilir. Bu nedenle otonom olmayan element grupları revers transkripsiyon yapmak için PPT ve PBS priming bölgesi dışında herhangi bir spesifik özelliğe ihtiyaç duymazlar. Bu adım yaşam döngülerini kısıtlayan kritik bir aşama değildir. PBS motifinde bazı varyasyonlar olmasına rağmen LTR retrotranspozonlarının büyük

çoğunluğu primer olarak başlatıcı metionil tRNA'yı kullanır. Revers transkripsiyon hücrel DNA polimerazdan daha yüksek hata oranı (2.5×10^{-5} hata/nukleotid/döngü) ile meydana gelir. RT yüksek bir hata oranına sahiptir çünkü bir nukleotidi yanlış eşleştirdikten sonra bile zincir uzatmasına devam eder, ribonukleotiler için küçük bir ayırım gücü vardır, 3' ve 5' eksonukleaz aktivitesi yoktur, uzun tekrarlı nukleotidlerin eklenmesinde primerlerin kalıba göre kaymasını önleyemez.



Şekil 2.13: LTR retrotranspozonlarının revers transkripsiyonu.

2.13.5. İntegrasyon

VLP son olarak nükleusa yönlendirilir ve çift zincirli cDNA nükleusa taşınır. IN genomik DNA'daki hedef bölgede genellikle 2-16 bp uzunluğunda asimetrik bir çift zincirli kırık meydana getirir. Hedef bölgenin yapısı, heterokromatik olması ya da diğer retrotranspozonların bulunması gibi özellikler integrasyon eğilimini etkiler.

2.14. RETROTRANSPOZONLARIN MARKIR OLARAK KULLANILMASI

Retrotranspozon temelli yöntemlerin ortaya çıkışı pek çok bitki türünde bulunmaları ve aktivitelerinin belirlenmesiyle başlamıştır (Grandbastien ve diğ., 1989; Suoniemi ve diğ., 1998). Yeni retrotranspozon markır yöntemleri PCR'ye dayalıdır. Transpozabl element pek çok yolla moleküler markır olarak kullanılmıştır. Örneğin memeli Alu tekrarları-benzeri SINE'leri memeli genomları boyunca dağılmıştır. Bu tekrarların herhangi birine tamamlayıcı primer dizileri tek primer amplifikasyonundan ve Alu tekrarlarını bulmak için kullanılan markırlardan daha çok spesifik olmayan bant verebilir (Nelson ve diğ., 1989).

Arpa retrotranspozonları genetik parmak izi, tür tanımlanması, genetik farklılaştırma çalışmalarında, markır-destekli seçimde ve haritalama gibi uygulamalarda moleküler markır sistemi oluşturmak amacı ile denenmiş mükemmel araçlardır. Çoklu ürünler üreten birçok PCR temelli yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin hepsinde retrotranspozona bağlanan (genel olarak LTR'ye) bir primer iş görür. Ancak ikinci primerin bağlanma bölgeleri farklılık göstermektedir. S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) yöntemi ilk olarak arpada uygulanmıştır, bu yöntemde restriksiyon bölgesi adaptörüne uyan bir primer kullanılır. IRAP'ta ikinci primer diğer retrotranspozona uyar. REMAP'ta ise bir retrotranspozon primer kullanılır, biri 3' uçta bir mikrosatellite uyan seçici çipadır.

Retroelementler arpa genomunda ortalama 50kb'lik mesafe ile dağınık olarak bulundukları için IRAP yöntemi daha başarılıdır. Mikrosatellitler genomda kümelenme eğiliminde olmasalardı REMAP daha başarılı bir yöntem olurdu (Ramsay ve diğ., 1999). Bu yöntemler solo LTR jenerasyonlarında güçlüdür. Bir elementin internal bölgesinde LTR-LTR rekombinasyonları kaybolabilceğinden geriye kalan solo LTR ayrılır, LTR'lere dayalı markır sistemleri için böyle kayıplar aşıkardır. Bu polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan primerler için rekombinasyon annealing bölgesini çıkartmadığı için meydana gelir, genellikle LTR'nin en dış kısmına yakındır. Benzer şekilde bir diğeri içindeki retrotranspozonun üst üste yığılmış insersiyonları ve böyle "nest"ler içinde sonradan meydana gelen delesyonlar primerin arkasında ya da 5'

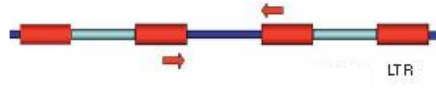
ucunda meydana geleceğinden orjinal elementin LTR'sinden etkilenmeyen ürünler oluşturacaktır. RBIP gibi retrotranspozon markır sistemleri, ki bunlar yan diziler arasında spesifik çoğaltıma dayanan insersiyonların varlığını ya da yokluğunu değerlendirir, henüz arpaya adapte edilememiştir, geliştirme aşamasındadır.

Retrotranspozon temelli sistemler binlerce nukleotid uzunluğundaki insersiyon elementlerini belirleyebilir. Tam bir retrotranspozona bağlı LTR'ler oldukça korunmuş uçlar taşımaktadır. İnsersiyon yapan transpozonlar korunmuş LTR uçları arasında bir bağlantı oluşturular. Retrotranspozon temelli çoğu markır sistemi bu bağlantı noktasında genomik DNA segmentini çoğaltmak için PCR'yi kullanır. Genellikle primer korunmuş LTR segmentine uygun olarak tasarlanır. Primer LTR'nin uç kısmına doğru yöndedir. İkinci primer genomun diğer özelliklerine uygun olarak tasarlanır.

2.14.1. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

IRAP yöntemi iki retroelement arasındaki DNA bölgesinin çoğaltılmasıyla retrotranspozon insersiyonal polimorfizimlerini belirler. Bu yöntemde LTR'nin dış kısmından itibaren ilerleyen bir ve ya iki primer kullanılır. Ve bu nedenle iki yakın retrotranspozon arasındaki DNA bölgesi çoğaltılır. IRAP LTR'nin 5' ve ya 3' uçlarına uyan tek bir primer ile ya da iki primer ile gerçekleştirilebilir, fakat reaksiyon LTR'nin dış kısmına doğru ilerler. İki primer aynı retrotranspozon element ailesinden ya da farklı ailelerden olabilir. PCR ürünleri dolayısıyla parmak izi örnekleri genomdaki hedef bölgenin binlerce kopyasından oluşur. Elde edilen örnek retrotranspozonun kopya sayısının yanısıra analiz için seçilen retrotranspozon ailesinin boyutu ve insersiyon paterninden etkilenecektir, ki bu genom boyunu yansıtır. Ayrıca binlerce ürün jel sistem üzerinde belirlenebilir düzeyde çoğaltılamayabilir. Bu sebepten elde edilen örnekler reaksiyondaki hedefler ve ürünler arasındaki rekabet sonuçlarını temsil etmektedir. Sonuç olarak iki primer ile elde edilen ürünler bağımsız olarak tek bir primer ile elde edilen ürünleri temsil etmez. Retrotranspozonlar genomun her bir yerine dağılmış olsalardı IRAP yönteminde jel üzerinde iyi çözünürlük veren çok büyük ürünler üretirdi ya da hedef çoğaltım bölgesi kullanılan termostabil polimerazlar ile ürünler üretmek için aşırı uzak olurdu. Bununla birlikte IRAP bugüne kadar tüm genomu değerlendirmek için başarılı olmuştur. Bu retrotranspozonların genel olarak genom adalarını kuşatan tekrar dizileri içerisinde kümelenme meyilinde olmaları nedeniyledir

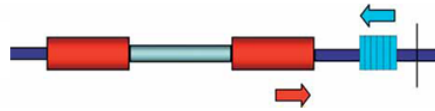
ve üstelik retrotraspozomlar birbirleri içersine geçerek “nest” oluşturmuş olabilirler (Kalendar ve diğ., 2006) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: IRAP markır yöntemi (kırmızı oklar, primerleri; koyu mavi bölge, genomik DNA, kırmızı kutular, LTR dizilerini göstermektedir).

2.14.2. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)

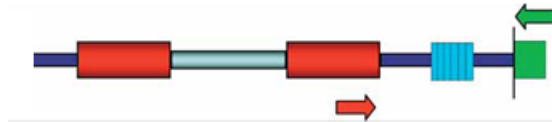
Çoğaltım bir LTR ve bir mikrosatellite bağlanan primerler arasında gerçekleşir. REMAP yöntemi IRAP’a benzer fakat iki primerden birisi primerin 3’ ucundaki bir ya da daha fazla SSR olmayan “anchor” nukleotid ile bir SSR motifine uyar. Bir mikrosatellitteki SSR birimlerinin sayısındaki değişiklikler genellikle mikrosatellitlerle kuşatılan özgün dizilere yerleşmek için tasarlanan primerler kullanılarak belirlenir (Kalendar ve diğ., 2006) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: REMAP markır yöntemi çalışma prensibi (kırmızı kutular, LTR dizilerini; mavi kutu, mikrosatellit dizisini; kırmızı ve mavi renkle gösterilen oklar ise primerleri belirtmektedir).

2.14.3. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism)

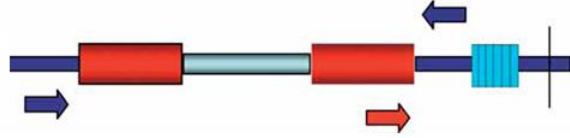
Çoğaltım bir restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA’ya ligasyonla bağlanan bir restriksiyon adaptörüne ve bir LTR’ye bağlanan primerler arasında gerçekleşir (Kalendar ve diğ., 2006) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16: S-SAP markır yönteminin çalışma prensibi (kırmızı kutular, LTR dizilerini; yeşil kutu, restriksiyon adaptörünü; kırmızı ve yeşil renkle gösterilen oklar ise primerleri belirtmektedir).

2.14.4. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms)

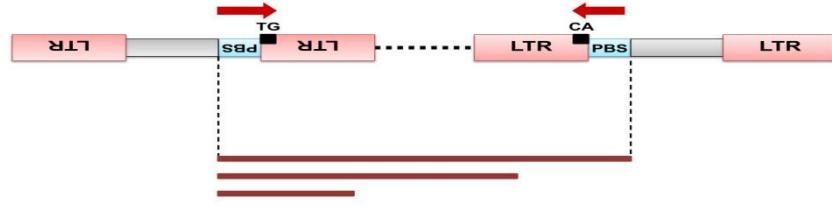
Özgün bir lokus değerlendirildiği için bu yöntem bir retrotranspozon insersiyonuna komşu özgün dizi bilgisini gerektirir. Bu nedenle RBIP markırlarının geliştirilmesi için insersiyon bölgesinde dizi bilgisine ve ya oldukça büyük genomik veri tabanına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte kodominantlığı belirleyebilmesi bu yöntemin en önemli avantajıdır. Bir retrotranspozonun insersiyon bölgesi için tam ve boş allel durumlarını tespit edebilir. Kodominant değerlendirme pedigrı yapımı için çok önemlidir. Bu yöntemde retrotranspozon taşıyan bölgeler, bir LTR primeri ve tek-kopyalı DNA'ya sınırlayan bir primer ile çoğaltılır. Tahmini integrasyon bölgesinin sağ ve sol yanları arasında çoğaltımla boş bölgeler değerlendirilir (Kalendar ve diğ., 2006) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17:RBIP markır yönteminin çalışma prensibi (kırmızı kutular, LTR dizilerini; kırmızı ve mor renkle gösterilen oklar ise primerleri belirtmektedir).

2.14.5. iPBS (Inter Primer Binding Site)

LTR retrotranspozonları ve retroviruslar tRNA^{iMet}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Leu} ve tRNA^{Gln} için primer bağlanma bölgesi taşırlar. tRNA'nın 3' ucundan itibaren uzama viral/retrotranspozon RNA genomunun konak DNA'sına integre olmadan önce çift zincirli DNA'ya dönüşümü ile sonuçlanır. Revers transkripsiyon süreci tüm retroviruslarda korunmuştur ancak spesifik tRNA yakalanması retroviruslarda ve retroelementlerde değişkendir. PBS'ler evrensel olarak tüm LTR retrotranspozon dizilerinde bulunur. Bu nedenle PBS'lere dayalı retrotranspozon LTR'lerinin izolasyonu yöntemi olası tüm LTR retrotranspozonlarının klonlanması için potansiyel oluşturur. Kalendar ve diğ. (2010) PBS'lerin korunmuş bölgelerini kullanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla LTR transpozonlardaki PBS bölgelerine uyan korunmuş primerler tasarlamışlardır. Tek PBS primerleri ile genom DNA'sı boyunca dağılmış "nested inverted retrotransposon"ları ve ilgili elementlerin dizilerini çoğaltabilmektedir. iPBS yöntemi IRAP ve REMAP yöntemleriyle aynı seviyede polimorfizm sağlar. Ayrıca cDNA'daki polimorfizm seviyesini de belirlemek için oldukça etkin bir yöntemdir.



Şekil 2.18: iPBS yönteminin çalışma mekanizması (mavi bölgeler, PBS dizilerini; gri kutu, iç bölgeyi; pembe kutular da LTR dizilerini; kahverengi çubuklar, farklı amplikonları belirtmektedir) (Poczai ve diğ., 2013).

Retrotranspozonların çoğu iç içe geçmiştir, ters dönmüştür ya da kesilmiştir (Şekil 2.18). İç kısımları ile birlikte LTR dizileri sıklıkla bir diğer retrotranspozonun yanına yerleşmiştir. Bununla birlikte, PBS dizileri sıklıkla bir diğer PBS'nin yanında yer alır. Genomda retrotranspozon yoğunluğunun fazla olduğu bölgelerde, diğer retrotranspozonlarla birlikte bulunma ihtimalinden dolayı PBS dizileri kullanılabilir. Retrotranspozon aktivitesi ya da rekombinasyonu yeni genom integrasyonlarına izin verdiğinde, bitki hatlarının izolasyonu için kullanılabilir. Bu durumda yeni insersiyonlardan ya da rekombinasyonlardan türevlenen çoğaltılmış olan bantlar polimorfik olacaktır.

Akraba bitki türleri benzer retroelementlerin LTR'lerinde korunmuş bölgelere sahiptir. Bu yüzden tek bir türe ait ya da akraba türlere ait birçok LTR dizisinin dizilenmesi korunmuş bölgelerde tanımlanacaktır. Sonuç olarak LTR'lerdeki bu korunmuş bölgeler PCR için primer tasarlamaya uygundur (Kalendar ve diğ., 2010).

2.15. TRANSPOZABL ELEMENTLERİN GEN ANLATIMININ DÜZENLEMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

TE'ler pek çok şekilde gen anlatımını etkileyebilirler. Bu temelde iki yolla olur; transkripsiyon ve translasyon.

- TE, transkripsiyon seviyesinde bir genin yukarı yönüne yerleşebilir ve alternatif transkripsiyon başlangıç bölgesi oluşturabilir.
- Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi gibi yeni bir cis elementi oluşturabilir.

- Ayrıca bir intron içerisine giren TE antisens transkripsiyona neden olabilir ve potansiyel olarak anlamlı yönde transkripsiyona engel olur.
- TE'ler heterokromatin oluşumu için önemlidirler.
- Post transkripsiyonel evrede bir genin 3' UTR ('Untranslated Region')'sine insersiyon yapan bir TE alternatif bir poliadenilasyon bölgesi, mikro RNA ya da bir RNA-bağlayan protein için bağlanma bölgesi oluşturabilir.
- İtron içerisine insersiyon yapan bir TE, pre-mRNA'nın normal kırılma sürecini etkileyebilir, farklı formlarının oluşmasına neden olabilir (örneğin intron çıkarılmaması, eksonların atlanması) (Feschotte, 2008).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak 157/37) kallus kültürlerinde *Sukkula* retrotranspozonunun hareketi IRAP “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” ve iPBS “Inter Primer Binding Site” markır teknikleri kullanılarak araştırıldı.

3.1.ARPA EMBRİYO KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI VE KALLUS ELDESİ

Çalışmamızda kullandığımız arpa tohumlarının yüzey sterilizasyonu doğrusal hava akımlı steril kabin içinde (Gelaire Flow Laboratories TC 48) yapıldı. Öncelikle arpa tohumları 1/5 oranında ticari çamaşır suyu içeren steril distile suda 25 dakika bekletildi ve üç-dört kez steril distile su ile durulandı. Daha sonra tohumlar 30 dakika boyunca steril distile su içeren kapta bekletildi. Bu sürenin sonunda arpa tohumlarının üst kabuğu (testası) soyularak steril distile su içeren steril kaba bırakıldı. Tüm tohumlar için bu işlem tamamlandıktan sonra tohumların embriyosu steril pens ve bistüri yardımı ile ayrılarak steril distile su içeren petri kabına bırakıldı. Daha sonra endospermadan ayrılan 200-250 kadar arpa embriyosu %100’ lük etanol içeren steril cam petriye aktarıldı ve 30 saniye bu kapta bekletildi. Daha sonra embriyolar steril süzgece alındı ve bu süzgeç steril distile su içeren üç ayrı steril cam petri kabından sıra ile geçirilerek etanolün uzaklaştırılması sağlandı. Üç seride durulanan embriyolar steril kurutma kağıdı üzerine yerleştirilerek embriyolar üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı. Embriyolar steril 3mg/L dikamba(3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerine her petri kabı için onbeşer adet olacak şekilde yerleştirildi. Çalışmada kullanılan MS besiyerinin bileşenleri Tablo 3.1’de verilmiştir (Murashige ve Skoog, 1962).Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petri kapları alüminyum folyo ile sarıldı ve fitotronda $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de (Sanyo MRL-352H) 40 ve 80 gün boyunca bekletildi. Kallusların besiyerleri 20 gün ara ile yenilendi.

Dikamba içeren MS besiyerinin hazırlanması için; 4.4 g MS tuzu (Sigma M 5524) ve 30 g sukroz (Sigma S5391) 800 ml dH₂O içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH’sı 1 N

NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Besiyerinin katılaşmasını sağlamak için 10 g agar (Sigma, A-1296) ilave edildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 1 atm basınçta 121°C'de 20 dak. süre ile otoklavlanarak sterilize edildi. Steril besiyerinin sıcaklığı 45-50°C'ye geldiğinde içerisine 1 ml MS vitamin (Sigma M 3900) ve 3mg/L dikamba ilave edildi. Besi yeri içerikleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri.

İçerik	Konsantrasyon (mg/l)	İçerik	Konsantrasyon (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA	37.3
CaCl ₂	332	H ₃ BO ₃	6.2
MgSO ₄	180.7	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Myo-inositol	100	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Glisin	2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Nikotinik asit	0.5	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Pridoksin HCl	0.5	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Tiamin HCl	0.1	Sukroz	30000

40 günlük kültür süresi sonunda gelişen kalluslar iki eşit parçaya bölünerek; bu parçalardan biri moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere DNA izolasyonu için -70°C'de saklandı, diğeri 80 günlük kallus kültürünü oluşturmak üzere 3mg/L dikamba içeren MS besiyerine aktarıldı ve alüminyum folyoya sarılarak bitki büyütme kabini içinde (25 ± 2 °C, 16 saat gündüz, 8 saat karanlık döngüsünde) gelişime bırakıldı.

Dikamba içeren besi ortamına aktarılan 40 günlük kalluslardan +40 günün sonunda 80 günlük kallus elde edildi. Bu kalluslar DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -70°C 'de saklandı.

Kallus kültürlerinin kurulması aşamasında 2,4-D gibi farklı bir oksin hormonu ile kallus teşviki yapıldı. Tokak varyetesinin yanı sıra Zafer 160 cv. ile de kültürler kuruldu. Ancak Zafer varyetesinde 2,4-D ile yeterli kallus verimi alınamadığı için moleküler çalışmalara dikamba ve Tokak cv. ile devam edildi.

3.2.KALLUSLARDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU

Arpa embriyolarından ve arpa doku kültürü koşullarında elde edilen 40 ve 80 günlük kalluslardan moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu Tchordbadjieva ve Pantchev (2004)'den değiştirilerek yapıldı. DNA izolasyonu için kullanılan tamponlar ve içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir. Tüm bitki örnekleri havanda sıvı azot yardımı ile ezildi. İyice parçalandıktan sonra 350 µl 2X CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromür) tamponu (65°C) eklenerek ezilmeye devam edildi. Karışım eridikten sonra 1.5 ml'lik tüplere alındı. Daha sonra 350 µl 8M LiCl eklendi ve birkaç kere karıştırıldı. 65°C 'lik su banyosunda 30 dk.bekletildi, bu süre içinde tüpler ara ara tersyüz edildi. Sürenin sonunda örneklerle 700 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 13000g'de 10 sn.santrifüj edildi. Üst faz yeni tüpe aktarıldı. Eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi ve karıştırıldı. 13000g'de 10sn.santrifüj yapıldı ve üstteki faz yeni tüpe aktarıldı, üst fazın onda biri oranında 3M sodyum asetat ve üst fazın iki katı hacimde soğuk saf etanol (-20°C) eklendi. -70°C 'de bir gece bekletildi. Bir gecelik bekleme süresinin ardından tüpler 13000g'de 5 sn.santrifüj edildi ve üst sıvı döküldü. %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, üst sıvı döküldü ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklerin üzerine 50 µl distile su eklendi ve oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı.

Tablo 3.2: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Tamponun Adı	İçeriği (100 ml için)
2XCTAB Tamponu	100mM Tris, 20 mM EDTA (pH:8.0), 1.4M NaCl, %2CTAB, %1PVP
8 M LiCl	33.912 g lityum klorür
3 M Sodyum Asetat	24.609 g sodyum asetat
Kloroform:İzoamilalkol (24:1)	96 ml kloroform; 4 ml izoamilalkol
%70 Etanol	70 ml Etil alkol, 30 ml dH ₂ O

İzole edilen DNA örneklerinin kalitesi, %1'lik agaroz jelde elektroforetik olarak ve nanodrop cihazı (Thermo Scientific) ile spektral olarak kontrol edildi. Agaroz jel yapımı için 0.4 gram (gr) agaroz (Biobasic Agarose A) 40 ml 1X TAE (Tris Asetat EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürüldü. 40-50°C'ye gelince içine 2-3 µl(10 mg/ml) etidyum bromür (EtBr) eklendi ve karıştırılarak EtBr'nin homojen biçimde dağılması sağlandı. Daha sonra hazırlanan jel kasetine döküldü, dikkatli biçimde tarak yerleştirildi ve jelin katılaşması bekledi. Katılaştıktan jelden tarak çıkarıldı ve jel içinde 1X TAE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Agaroz jel yapımında kullanılan bileşenler Tablo 3.3'de verilmiştir. Moleküler markır (1 kb) ve örnekler sıra ile jele yüklendi. Her 1µl genomik DNA örneği 4µl dH₂O ve 1µl yükleme tamponu (6X) ile karıştırılarak yüklendi. 70 voltluk sabit akımda 1-2 saat yürütüldü. Jel UV ışık altında görüntülendi ve fotoğraflandı. Nanodrop cihazı ile ölçüm, optik göze 1.5 µl ham örnek damlatılarak yapıldı. Okuma sonucuna göre DNA örnekleri belli oranda sulandırıldı.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Adı	İçeriği
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	400 mM Tris, %1.2 glasiyel asetik asit, 10 mM EDTA(pH 8.0)
Etidyum bromür	10 mg/ml etidyum bromür, distile su içinde
6X yükleme tamponu	10 mM Tris, 60 mM EDTA (pH 8.0), %0.3 bromofenol mavisi, %60 gliserol

3.3.GENOMİK DNA’NIN IRAP POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ÇOĞALTILMASI

Çalışmada *Sukkula* retrotranspozonunun farklı yaşlardaki arpa kalluslarında sebep olduğu polimorfizmi belirlemek için IRAP markır tekniği kullanıldı. Bu amaçla *Sukkula* LTR dizileri için özgün olan E0228 primeri (Leigh, 2003) kullanıldı (Tablo 3.4) Kalluslardan ve arpa embriyolarından izole edilen DNA örnekleri IRAP PCR (IRAP Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltıldı. IRAP PCR’da kullanılan bileşenler ve PCR koşulları sırasıyla Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.4: IRAP-PCR’da kullanılan *Sukkula* primeri.

Retrotranspozon adı	Primer adı ve yönü	Primer dizisi (5' → 3')	T _a (°C)
<i>Sukkula</i>	E0228 ←	GGAACGTCGGCATCGGGCTG	61

Tablo 3.5: IRAP-PCR’da kullanılan bileşenler.

PCR Reaksiyonu için kullanılan malzemeler	Kullanılan Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
SapphireAmp Fast PCR Master Mix	2X	10 µl
Genomik DNA kalıpları	10 ng/µl	2 µl
<i>Sukkula</i> -E0228Reverse Primeri	10 µM	2 µl
dH ₂ O	–	6 µl
Toplam Hacim		20 µl

Tablo 3.6: IRAP-PCR Reaksiyonu için gerekli koşullar.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dk.	1
Denatürasyon	94°C	20 sn.	
Primerlerin Bağlanması	60°C	20 sn.	30
Uzama	72°C	1.5 dk.	
Son uzama	72°C	7 dk.	1

3.4.GENOMİK DNA’NIN İPBS MARKIR YÖNTEMİYLE ÇOĞALTILMASI

iPBS markır yöntemiyle DNA’nın çoğaltılması için kontrol olarak arpa embriyoları, deney grubu için ise 40 ve 80 günlük arpa kallusları kullanıldı. iPBS markır tekniğinde kullanılan *sukkula* primeri (Kalendar ve diğ., 2010) Tablo 3.7’de, PCR bileşenleri Tablo 3.8’de ve PCR koşulları Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Tablo 3.7:iPBS-PCR’da kullanılan *Sukkula* primeri.

Retrotranspozon adı	Primer dizisi (5' → 3')	T _a (°C)
<i>Sukkula</i> iPBS	GCTCTGATACCA	40.5

Tablo 3.8:iPBS-PCR’da kullanılan bileşenler.

PCR Reaksiyonu için kullanılan malzemeler	Kullanılan Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
SapphireAmp Fast PCR Master Mix	2X	10 µl
Genomik DNA kalıpları	20 ng/µl	2 µl
<i>Sukkula</i> -iPBS primeri	10 µM	3 µl
dH ₂ O	–	5 µl
Toplam Hacim		20 µl

Tablo 3.9:iPBS-PCR Reaksiyonu için gerekli koşullar.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95°C	3 dk.	1
Denatürasyon	95°C	15 sn.	
Primerlerin Bağlanması	50°C	60 sn.	30
Uzama	68°C	60 sn.	
Son uzama	72°C	5 dk.	1

Örnekler hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Poliakrilamid jel yapımında kullanılan bileşenler Tablo 3.10 ve 3.11’de verilmiştir.

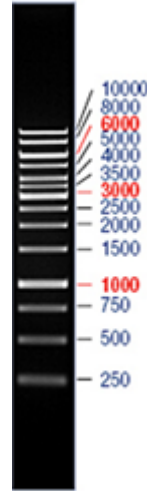
Tablo 3.10:%6'lık PAGE bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin adı	Miktarı
Akrilamit:bisakrilamit 29:1 (%30)	10 ml
5X TBE	10 ml
Amonyum persülfat (%10)	1500 µl
TEMED	50 µl
dH ₂ O	28.45 ml
Toplam	50 ml

Tablo 3.11:5X TBE tamponunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenin adı	Miktarı
TRIS	54 g
Borik asit	27.5 g
0.5 M EDTA(pH 8.0)	20 ml

Bileşenler verilen oranlarda karıştırıldı ve 10 sn sonikatörde tutuldu. Daha sonra hazırlanan kasete yavaşça döküldü, taraklar yerleştirildi ve katılaşmaya bırakıldı. Katılaştıktan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Kuyucuklar 1XTBE tamponu ile iyice yıkandı. Jel örneklerin yüklenip jelde yürütülmesi için içerisinde 1XTBE tamponu olan jel yürütme tankına yerleştirildi. Jelde markır olarak 1 kb ve 100 bp'lik "GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (Şekil 3.1 a ve Şekil 3.1 b) kullanıldı. Jel, 4 saat boyunca 200V'luk sabit akımda yürütüldü. Ardından boyama işlemi için 200ml 1X TBE tamponu içeren boyama kabına 20µl GelRed (Biotium,41003)eklendi ve jel dikkatli bir biçimde boyama kabına alındı. 30 dakika süre ile boyandı. Boyanan jel UV ışık altında görüntülendi ve fotoğrafı çekildi.



Şekil 3.1:Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan markır.

3.5.POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ

IRAP-PCR ve iPBS-PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde poliakrilamid jel elektroforezi ‘Polyacrylamide Gel Electrophoresis’ (PAGE) tekniği kullanıldı. Örnekler hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. 4 saat boyunca 200V’luk sabit akımda yürütüldü. Ardından boyama işlemi için 200 ml 1X TBE tamponu içeren boyama kabına 20µl GelRed (Biotium) içinde 30 dakika süre ile boyandı. Boyanan jel UV ışık altında görüntüledi ve fotoğrafı çekildi. PAGE’de kullanılan kimyasalların ve çözeltilerin miktarları tabloda verilmiştir (Tablo 3.12).

Tablo 3.12:PAGE bileşenleri.

Bileşenin adı	Miktarı
Akrilamid:bisakrilamid 29:1 (%40)	10 ml
5Xtiris-Borikasit-EDTA (TBE)	10 ml
Amonyum persülfat (%10)	500 µl
TEMED	30 µl
dH ₂ O	29.47 ml
Toplam	50 ml

Jel katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve kuyucuklar 1XTBE tamponu ile yıkandı. Jel kaseti dikey elektroforez tankına (Bio-Rad, 165-1802) yerleştirildi ve tank 1XTBE tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuğa 15 µl PCR ürünü yüklendi. Jelde markır olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, SM0322) kullanıldı. Jel 200 voltta 5 saat yürütüldükten sonra 3X GelRed solution (Biotium, 41003) içinde 30 dakika süre ile boyandı ve ultraviyole ışıkta görüntülenerek fotoğrafi çekildi. Elde edilen bant profili değerlendirilerek örnekler arasındaki polimorfizm hesaplandı.

3.6.POLİMORFİZMİN HESAPLANMASI

IRAP-PCR ve iPBS-PCR sonuçları, Jaccard Benzerlik Katsayısı kullanılarak değerlendirildi (Jaccard, 1908). Bu amaçla jelde belirgin olarak görülen homomorfik ve polimorfik bantlar sayıldı. Örnekler arasındaki % benzerlik oranları hesaplandı.

$$J \text{ (Jaccard Benzerlik Katsayısı)} = M_{AB} / (M_B + M_A + M_{AB})$$

M_B : A bireyinde olmayan, B bireyinde var olan niteliklerin (bant) sayısı

M_A : A bireyinde var olan, B bireyinde olmayan niteliklerin sayısı

M_{AB} : Hem A hem de B bireyinde var olan niteliklerin sayısı

4. BULGULAR

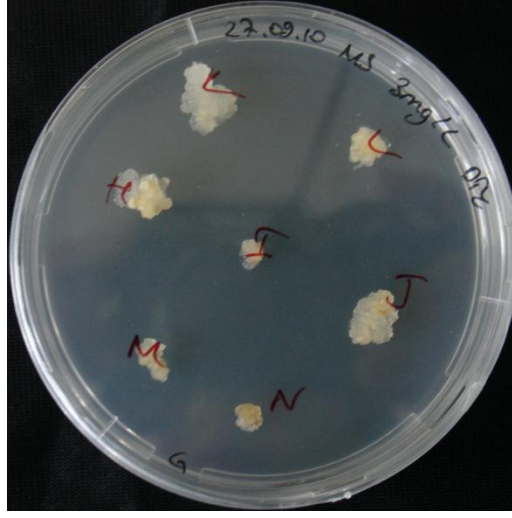
Bu tez çalışmasında tek bir arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak 157/37) embriyosundan köken alan 40 ve 80 günlük kalluslarda *Sukkula* retrotranspozonunun sebep olduğu insersiyonel polimorfizm araştırıldı. Bu amaçla IRAP “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” markır tekniği kullanıldı. Bununla birlikte, IRAP PCR sonuçlarının daha etkin biçimde değerlendirilebilmesi için *Sukkula* retrotranspozonuna özgü iPBS primerleri ile de PCR yapıldı. Hem IRAP-PCR hem de iPBS-PCR jellerinde görülen bantlar sayılarak tablolar oluşturuldu, buna göre Jaccard benzerlik oranları ve polimorfizm oranları hesaplandı.

4.1.DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

Çalışmada kallus kültürü için 3 mg/l Dicamba içeren MS besi yeri kullanıldı. 40 günün sonunda kallus gelişimi gözlenen arpa embriyoları iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan biri ile 80 günlük kallus kültürü kuruldu ve diğer parça DNA izolasyonu için kullanıldı. Tüm moleküler çalışmalar, doku kültüründen elde edilen örnekler kullanılarak yapıldı. (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2.).



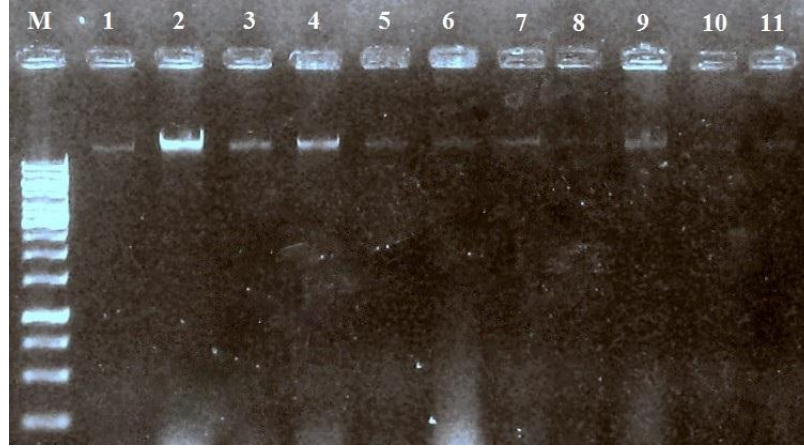
Şekil 4.1: Çalışmada kullanılan arpa tohumları



Şekil 4.2: Kallus kültürleri

4.2.GENOMİK DNA İZOLASYONU VE PCR SONUÇLARI

İzole edilen DNA örneklerinin kaliteleri %1'likj agaroz jele yüklendi ve elektroforetik olarak analiz edildi. Genomik DNA'ya ait jelin fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3)



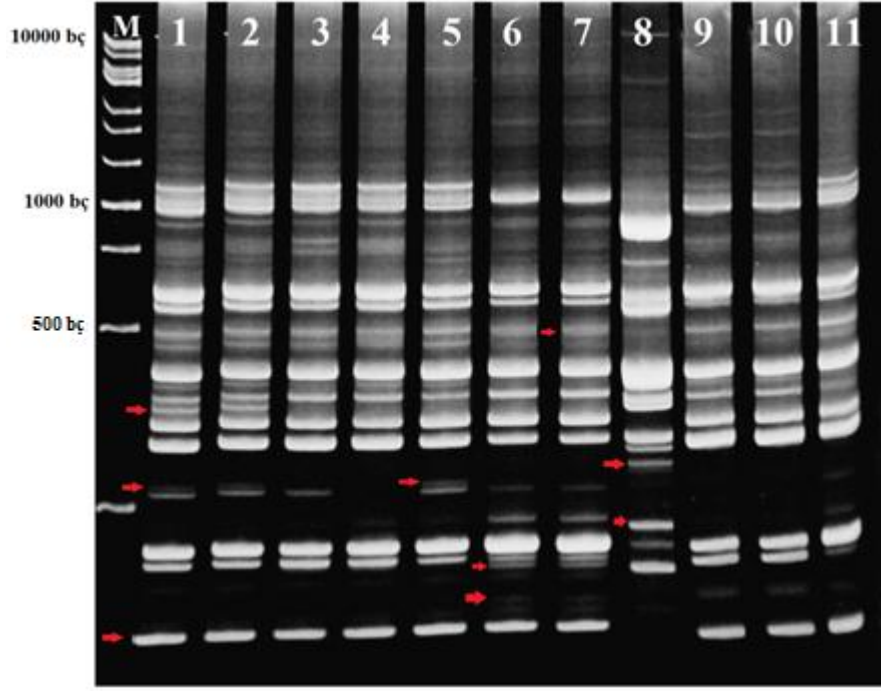
Şekil 4.3: Genomik DNA'lara ait jel fotoğrafı. M, 1 kb markır; 1-5, embriyo; 6-8, 40 günlük kallus; 9-11, 80 günlük kallus.

Ayrıca genomik DNA örneklerinin kaliteleri spektral olarak ölçüldü ve tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Genomik DNA konsantrasyonları.

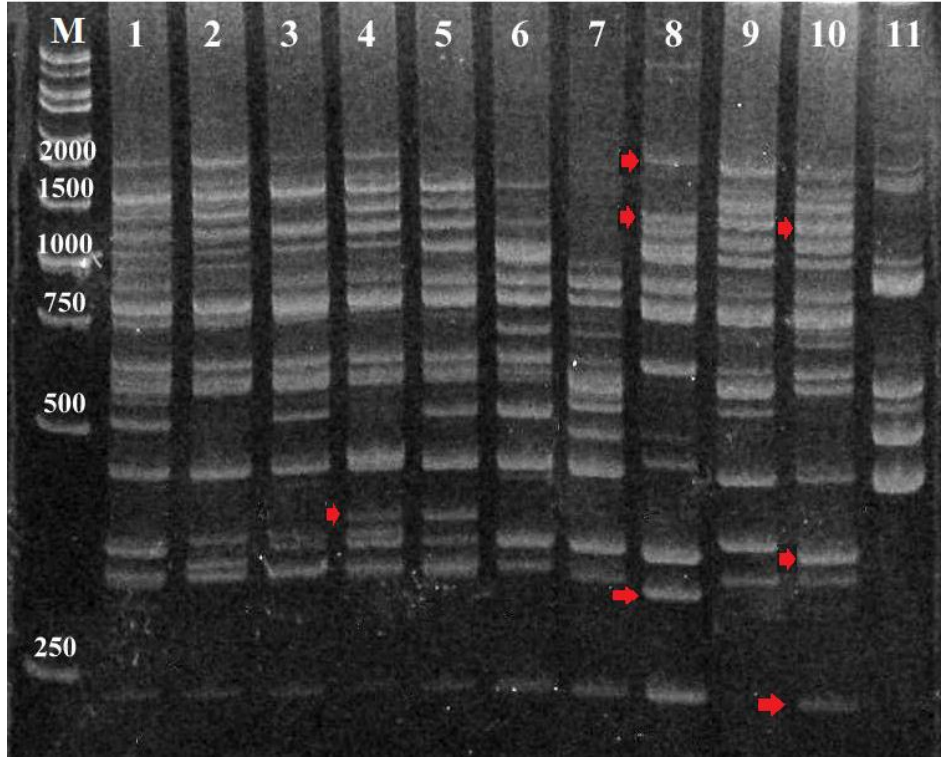
Örnekler	Konsantrasyon (ng/µl)	A _{260/280}
E1	9.5	2.30
E2	72.6	2.05
E3	28.3	1.99
E4	41.3	2.01
E5	16.9	1.78
40 A	96.5	1.91
40 B	20.1	1.72
40 H	13.0	1.73
80 A	89.5	1.75
80 B	14.2	1.72
80 H	20.4	2.08

Çalışmada, *Sukkula* retrotranspozonunun sebep olduğu polimorfizmi belirlemek için IRAP ve iPBS tekniği kullanıldı. IRAP-PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek embriyo, 40 günlük kallus ve 80 günlük kallus örneklerine ait bant profilleri Jaccard benzerlik katsayısı kullanılarak yüzde polimorfizm oranı hesaplandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: IRAP-PCR sonuçları. M, 1 kb markır; 1-5, embriyo; 6-8, 40 günlük kallus; 9-11, 80 günlük kallus (kırmızı oklar polimorfik bantları göstermektedir).

iPBS-PCR ürünleri, polikriakrilamid jel elektroforezinde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir. Gözlenen bantlar Jaccard benzerlik katsayısı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5: iPBS-PCR sonuçları. M, 1 kb markır; 1-5, embriyo; 6-8, 40 günlük kallus; 9-11, 80 günlük kallus (kırmızı oklar polimorfik bantları göstermektedir).

4.3. IRAP-PCR İÇİN JACCARD BENZERLİK ORANLARININ HESAPLANMASI

Jel görüntülerinde, embriyo, 40 günlük kallus ve 80 günlük kallus örnekleri arasındaki hem monomorfik hem de polimorfik bantlar sayıldı. Embriyo ve kallus grupları arasında polimorfik bant gözlenirken grup içinde de polimorfik bantlar görüldü. IRAP-PCR sonuçlarının Jaccard benzerlik indeksi kullanılarak elde edilen sonuçları Tablo 4.2’de iPBS sonuçları ise Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: IRAP sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri

1-5; kültüre alınmamış embriyo; 6, 7, 8; 40-günlük kallus; 9, 10, 11; 80-günlük kallus.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	8	-								
3	14	13	-							
4	14	13	10	-						
5	5	4	10	9	-					
6	31	31	22	29	18	-				
7	35	47	41	37	38	24	-			
8	35	35	26	41	35	37	61	-		
9	24	25	19	23	22	34	50	41	-	
10	24	25	19	23	22	34	50	41	0	-
11	24	25	19	23	22	34	50	41	0	0

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi kontrol embriyolarda %14’e varan varyasyon görülmüştür. 40 günlük kalluslarda, polimorfizm yüzdesi %24 ile %61 arasında değişmektedir. 80 günlük kalluslarda ise polimorfizm görülmemiştir. Buna karşın kontrol ile 40 günlük kalluslar arasında %41, kontrol ile 80 günlük kalluslar arasında ise %25 polimorfizm gözlenmiştir. 40 günlük kalluslar ve 80 günlük kalluslar karşılaştırıldığında bu oranın %50’lere kadar çıktığı tespit edilmiştir.

4.4.İPBS-PCR İÇİN JACCARD BENZERLİK ORANLARININ HESAPLANMASI

Tablo 4.3’te görüldüğü gibi kontrol embriyolarda %28’e varan varyasyon görülmüştür. 40 günlük kalluslarda, polimorfizm yüzdesi %44 ile %58 arasında değişmektedir. 80 günlük kalluslarda ise %70 polimorfizm görülmüştür. Buna karşın kontrol ile 40 günlük kalluslar arasında %60, kontrol ile 80 günlük kalluslar arasında ise %74 polimorfizm gözlenmiştir. 40 günlük kalluslar ve 80 günlük kalluslar karşılaştırıldığında bu oranın %74’lere kadar çıktığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.3:İPBS sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri
1-5; kültüre alınmamış embriyo; 6, 7, 8; 40-günlük kallus; 9, 10, 11; 80-günlük kallus.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	17	-								
3	24	29	-							
4	28	24	20	-						
5	23	28	13	7	-					
6	23	28	25	25	24	-				
7	50	53	56	58	60	44	-			
8	45	42	41	44	47	55	58	-		
9	32	37	35	39	33	33	67	47	-	
10	35	32	39	33	37	28	55	42	18	-
11	65	70	64	74	68	68	72	74	61	70

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 40 günlük ve 80 günlük kalluslarda *Sukkula* retrotranspozonunun meydana getirdiği hareketler, kültüre alınmamış olgun arpa embriyoları ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Aynı embriyodan kökenlenen örnekler arasında herhangi bir polimorfizmin meydana gelip gelmediğini belirlemek için IRAP-PCR ve iPBS markır teknikleri kullanılmıştır. Kültüre alınmayan 5 olgun embriyo kontrol olarak kullanılmıştır. IRAP analizi sonucunda kontroller arasında %14 polimorfizm oranı gözlenirken, 40 günlük ve 80 günlük kalluslarda sırası ile %61 ve %0 polimorfizm oranı tespit edilmiştir. iPBS analizinde ise kontroller kendi aralarında %29, 40 günlük kalluslarda %58 ve 80 günlük kalluslarda %70 gibi farklı polimorfizm oranları gözlenmiştir. Bunun yanısıra hem IRAP hem de iPBS analizleri sonucunda 40 günlük ve 80 günlük kalluslar bir birleriyle karşılaştırılmış ve sırasıyla %50 ve %74 polimorfizm oranları elde edilmiştir. Sonuçlardan doku kültürü koşullarının ve kallus yaşlarının *Sukkula* retrotranspozonunun hareketlerini etkilediğini ve tüm bireylerin aynı etkiyi göstermediğini söylemek mümkündür.

Retrotranspozonların genom dinamiğinde ve gen aktivitesinde etkin rol oynadıkları bilinmesine karşın bu elementlerin biyolojisi ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır (Schulman, 2012). Otonom olmayan bir retrotranspozon olan *Sukkula* genom içerisinde hareket etmek için belli bir otonom transpozonu kullanır mı ve *Sukkula*'nın arpa genom büyümesinde evrimsel süreçteki etkisi nedir? Bu soruların yanıtı bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların otonom olmayan retrotranspozonlarla ilgili çalışmalara katkılar sağlaması beklenmektedir.

Alavi-Kia ve diğ. (2008), *Crocus* cinsinde filogenetik ilişkilerin ve genetik çeşitliliğin tespiti için, IRAP tekniğini kullanarak 3 arpa retrotranspozonunu (*BARE1*, *Sukkula* and *Nikita*) incelemiştir. Bu tip çalışmalar olmasına karşın tür içinde retrotranspozonların sebep olduğu varyasyon araştırmaları oldukça sınırlıdır (Yılmaz ve Gözükırmızı, 2013). Otonom özelliğe sahip olmamasına karşın *Sukkula* retrotranspozonunun tür içi varyasyonlara sebep olduğu söylenebilir. Kültürde kallus yaşları ile polimorfizm oranı arasında doğrusal bir orantı vardır (Yılmaz ve Gözükırmızı, 2013). Bu çalışmada da

olgun arpa embriyoları ile karşılaştırma yapıldığında benzer şekilde 40 ve 80 günlük kalluslarda polimorfizm oranının arttığı görülmüştür.

Çalışmanın sonuçları daha önce arpada yapılan genom varyasyonları ile ilgili araştırmaları destekler niteliktedir (Gozukirmizi ve diğ., 1990; Yılmaz ve Gozukirmizi, 2013).

Bugüne kadar,genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla (Alavi-Kia ve diğ., 2008; Belyayev ve diğ., 2010; Carvalho ve diğ., 2010), farklı stress koşullarının karşılaştırılmasında (Hamat-Mecbur ve diğ., 2012) ve somaklonal varyasyonun (Temel and Gozukirmizi, 2013) belirlenmesi için *Sukkula* retrotranspozonu ile pek çok çalışma yapılmıştır.

Yılmaz (2013) arpa doku kültüründe *BAGY2* retrotranspozonu ile yaptığı çalışmada kültür süresine bağlı olarak polimorfizm oranlarının arttığını gözlemiştir.Çalışmasında kontrol grubu olarak kültüre alınmamış arpa embriyolarını, deney grubu olarak 45 ve 90 günlük kallusları kullanmıştır.Kontrol grubu ile 45 ve 90 günlük kallusları birbirleriyle ve kendi içlerinde karşılaştırmıştır.Kontrol gruplarının kendi içlerinde homomorfik olduğunu gözlemiştir.Kontrol grupları ile 45 ve 90 günlük kallusları karşılaştırdığında polimorfizm oranlarının sırası ile %5 ve %20 olduğunu tespit etmiştir.Bu bulgular gruplar arasında görülen bant profillerinin farklı olması, doku kültürü süresi ve koşullarının, bireyler arasında farklı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

Bayram ve diğ., (2012), arpa kallus kültüründe *Nikita* retrotranspozonunun aktivite değişikliğini belirlemek için yaptıkları çalışmada, farklı embriyolardan köken alan aynı kültür süresine sahip kalluslardaki polimorfizm oranının değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumu, doku kültürü koşullarının bireyler üzerindeki etkisinin farklı olması ile açıklamışlardır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar da literatür ile benzerlik göstermektedir.

Bitki doku kültürü uygulamaları, stres koşullarından biri olarak bilinmektedir. Somaklonal varyasyonlar, doku kültüründe meydana gelen mutasyonlardır, tek bir bitkiden çoğaltılan klonal bitkilerde genetik ve fenotipik varyasyonlara sebep olur

(Larkin ve Scowcroft, 1981). Dizi değişimleri, kromozom düzeyinde meydana gelen değişimler ve DNA metilasyon değişimleri gibi farklı genetik ve epigenetik mekanizmalar bu varyasyonlara neden olur (Gözükırmızı ve diğ., 1990; Temel ve diğ., 2008). Kalluslarda, rejenere bitkilerde ve bu bitkilerden üretilen bitkilerde, sitogenetik anormaliler, dizi değişimleri, DNA metilasyon değişimleri ve transpozon hareketleri gözlenmiştir (Hirochika, 1993; Hirochika ve diğ., 1996; Kaeppler ve diğ., 2000; Li ve diğ., 2007; Santos ve diğ., 2008; Temel ve Gozukırmızı, 2013). Bu insersiyon (transpozisyon etkinliği) tam olarak bilinmemesine karşın *Sukkula* retrotranspozonu arpada bulunan en hareketli elementlerden biridir: *BARE1*, *BARE1>BAGY2=SUKKULA>NIKITA*(Leigh, 2003).

Retrotranspozonların sıklıkla doku kültürü koşullarında aktive olduğu bilinmektedir ((Tadege ve diğ., 2008). iPBS yöntemi korunmuş protein kodlama domenlerini hedeflediği için genomdaki retrotranspozonların polimorfizm oranlarını belirlemede oldukça etkin bir sistemdir (Kalendar ve diğ., 2010). PBS domeni TRIM ve LARD gibi protein kodlama domeni bulunmayan otonom olmayan retrotranspozonların meydana getirdiği polimorfizmin belirlenmesi için ideal bir yöntemdir (Kalendar ve diğ., 2010).

Bu çalışmada bitki doku kültürü koşullarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde iPBS ve IRAP yöntemleri, *Sukkula* gibi arpa genomunda oldukça aktif bir retrotranspozonun etkinliğinin anlaşılmasında kullanıldı. Her iki yöntemin de benzer sonuçlar göstermesi, polimorfizm oranını belirlemedeki etkinliklerinin oldukça yüksek olduğu göstermektedir.

Retrotranspozonların genom dinamiğinde ve gen aktivitesinde etkin rol oynadıkları bilinmesine karşın bu elementlerin biyolojisi ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır (Schulman, 2012). Otonom olmayan bir retrotranspozon olan *Sukkula* genom içerisinde hareket etmek için belli bir otonom transpozonu kullanır mı ve *Sukkula*’nın arpa genom büyümesinde evrimsel süreçteki etkisi nedir? Bu soruların yanıtı bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların otonom olmayan retrotranspozonlarla ilgili çalışmalara katkılar sağlaması beklenmektedir.

Doku kültüründe meydana gelen somaklonal varyasyonlar klonal bitki üretimini engellemektedir. Genom aktif yapıdır, bu aktif yapıda meydana gelen değişimler (geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz değişimler) günümüz teknolojileri ile sınırlı ölçüde belirlenebilmektedir. Ancak meydana gelen değişimlerin önlenmesi veya yönlendirilebilir hale gelmesi gelecek teknolojiler ile mümkün olabilir. Bu sayede klonal bitki üretiminde karşılaşılan aksaklıkların önüne geçilebilmesine katkılar sağlayabilir.

Doku kültürü koşullarında epigenetik değişiklikleri araştıran pek çok çalışmada kallus dokusunda metilasyon durumunun değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Temel ve diğ., 2008; Krizova ve diğ., 2009; Shan ve diğ., 2012). Bununla birlikte bazı retrotranspozonların transkripsiyonel seviyede düzenlenmesinde DNA metilasyonunun önemli olduğu bildirilmiştir (Bennetzen ve diğ., 1994). Bu çalışmada *Sukkula* retrotranspozonunun kallus kültürlerinde yüksek oranda polimorfizm göstermesi, kallusta meydana gelen metilasyon profili değişikliklerinden kaynaklanmış olabilir. Bu durum DNA metilasyonunun, diğer retrotranspozonlarda olduğu gibi *Sukkula*'nın aktivitesinin düzenlenmesinde bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Transpozonlar 1950'li yıllardan beri önemi anlaşılan hareketli dizilerdir. Günümüze dek transpozonların pek çok yeni özelliği ve yeni transpozon türleri belirlenmiştir. Zamanla transpozonların genomda tahmin edilenden daha fazla yer kapladıkları ve oldukça aktif elementler oldukları anlaşılmıştır.

Retrotranspozonların genom büyümesi, genomun transkripsiyonal, post transkripsiyonal ve epigenetik düzenlenmesi, ektopik rekombinasyon ile yeni genlerin ve gen ailelerinin oluşumuna neden olması, gibi pek çok rolü bulunmaktadır. Çoğu ökaryotik organizmada sentromerler, telomerler ve kromozomların diğer heterokromatik bölgeleri büyük miktarlarda retrotranspozon taşır. Bu durum bitkilerin işlevsel ve yapısal rolleri için retrotranspozonların gerekli olduklarını göstermektedir (Pardue ve diğ., 1997). Bununla birlikte retrotranspozonların genom düzenleme yeteneğinde olduklarını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca genomda yüksek kopya sayısına sahip olmaları ve yaygın dağılım göstermeleri retrotranspozonların ektopik rekombinasyon kaynakları olduklarına işaret etmektedir (SanMiguel ve diğ., 1996).

Bu çalışmada aynı embriyodan kökenlenen kalluslardafarklı kültür zamanlarında (40 ve 80 günlük) *Sukkula* retrotranspozonunun hareketleri araştırılmıştır ve kültüre alınmayan olgun arpa embriyosu ile karşılaştırılmıştır. Bu alışma, doku kültürü koşullarında yetiştirilen bitkilerde, otonom olmayan bir retrotranspozon olan *Sukkula* elementinin zamana bağlı olarak oluşturduğu hareketlerin incelenmesi yönünden nc bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

- ALAVI-KIA, S.S., MOHAMMADI, S.A., AHARIZAD, S., MOGHADDAM, M., 2008, Analysis of Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in *Crocus* Genus of Iran Using Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. Vol.22, P.795-800.
- ANONİM, 2007, *Barley Grain Ventral* [online], The Maltsters Association Of Great Britain, www.ukmalt.com/gallery/pages/image002.asp [Ziyaret Tarihi: 14 Mart 2012].
- ANONİM, 2008, *The Anatomy of a Barley Spike* [online], The Brewers The Market Guide, <http://www.brewingtechniques.com/bmg/schwarzsb.html> [Ziyaret Tarihi: 15 Mart 2012].
- ANONİM, 2012, Arpa taksonomisi [online], http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_taxonomy.html [Ziyaret Tarihi: 15 Mart 2012].
- ANTONIUS-KLEMOLA, K., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H., 2006, TRIM Retrotransposons Occur in Apple and are Polymorphic Between Varieties But Not Sports. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol.112, P.999–1008.
- BADR, A., MULLER, K., SCHÄFER-PREGL, R., EL RABEY, H., EFFGEN, S., IBRAHIM, H.H., POZZI, C., ROHDE, W. and SALAMANI, F., 2000, On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*. Vol.17, No.4.
- BAYRAM, E., YILMAZ, S., HAMAD-MECBUR, H., KARTAL, G., GOZUKIRMIZI, N., 2012, Nikita retrotransposon movements in barley (*Hordeum vulgare* L.) callus culture, *Plantomics*, 5 (3), 211-215.
- BELYAYEV, A., KALENDAR, R., BRODSKY, L., NEVO, E., SCHULMAN, A.H., RASKINA, O., 2010, Transposable Elements in a Marginal Plant Population: Temporal Fluctuations Provide New Insights Into Genome Evolution Of Wild Diploid Wheat. *Mobile DNA*. Vol.1, P.1-16.
- BENIT, L., DESSEN, P., HEIDMANN, T., 2001, Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes, *Journal of Virology*, 75 (23), 11709-11719.
- BENNETT, M.D., BHANDOL, P., LEITCH, I.J., 2000, Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses-807 New Estimates, *Annals of Botany*. Vol.86, P.859-909.
- BENNETT, M.D., LEITCH, I.J., 2005, Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects, *Annals of Botany*, 95, 45-90.
- BENNETZEN, J.L., SCHRICK, K., SPRINGER, P.S., BROWN, W.E., SANMIGUEL, P., 1994, Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of

- modified, highly repetitive DNA, *Genome*, 37(4), 565-576. BENNETZEN, J.L., 1996, The Contributions of Retroelements to Plant Genome Organization, Function and Evolution. *Trends in Microbiology*. Vol.4, P.347–353.
- BENNETZEN, J.L., 2000, Transposable Element Contributions to Plant Gene and Genome Evolution. *Plant Molecular Biology*. Vol.42, P.251–269.
- BESANSKY, N.J., 1990, A Retrotransposable Element From The Mosquito *Anopheles gambiae*. *Molecular and Cellular Biology*. Vol.10, P.863–871.
- BOEKE, J.D., 1997, LINEs and Alus – The polyA Connection. *Nature Genetics*. Vol.16, P.6–7.
- BOYKO, E., KALENDAR, R., KORZUN, V., GILL, B., SCHULMAN, A.H., 2002 Combined mapping of *Aegilops tauschii* by retrotransposon, microsatellite, and gene markers. *Plant Molecular Biology*. Vol.48, P.767–790.
- BRATTHAUER, G.L., FANNING T.G., 1992, Active *Line-1* Retrotransposons in Human Testicular Cancer, *Oncogene*, 7 (3), 507-517.
- BRUNEL, C., MARQUET, R., ROMBY, P., EHRESMANN, C., 2002, RNA loop-loop Interactions as Dynamic Functional Motifs. *Biochimie*. Vol.84, P.925–944.
- BURR, B., BURR, F.A., 1982, Ds Controlling Elements of Maize at The Shrunken Locus are Large and Dissimilar Insertions. *Cell*. Vol.29, P.977–986.
- CAMPBELL, B.C., LEMARE, S., PIPERIDIS, G., GODWIN, I.D., 2011, IRAP: a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley, *Molecular Breeding*, 27, 193-206.
- CARVALHO, A., GUEDES-PINTO, H., MARTINS-LOPES, P., LIMA-BRITO, J., 2010, Genetic Variability of Old Portuguese Bread Wheat Cultivars Assayed by IRAP and REMAP Markers. *Annals of Applied Biology*. Vol.156, P.337-345.
- DRISCOLL, M. D., GOLINELLI, M.P., HUGHES, S.H., 2001, In vitro analysis of human immunodeficiency virus type 1 minus-strand strong-stop DNA synthesis and genomic RNA processing. *Journal of Virology*, 75: 672–686.
- EICKBUSH, T.H., JAMBURUTHUGODA, V.K., 2008, The Diversity of Retrotransposons and The Properties of Their Reverse Transcriptases, *Virus Research*. Vol.134, No.(1-2).
- ESTECIO, M.R.H., GALLEGOS, J., VALLOT, C., CASTORO, R.J., CHUNG, J., MAEGAWA, S., OKI, Y., KONDO, Y., JELINEK, J., SHEN, L., HARTUNG, H., APLAN, P.D., CZERNIAK, B.A., LIANG, S., ISSA, J.P.J., 2010, Genome architecture marked by retrotransposons modulates predisposition to DNA methylation in cancer, *Genome Research*, 20, 1369-1382.
- EVANS, M.J., BACHARACH, E., GOFF, S.P., 2004, RNA sequences in the Moloney murine leukemia virus genome bound by the GAGprecursor protein in the yeast three-hybrid system. *J. Virol.*, 78: 677–7684.

- EVRENSEL, C., YILMAZ, S., TEMEL, A., GOZUKIRMIZI, N., 2011, Variations in *BARE-1* insertion patterns in barley callus cultures, *Genetics and Molecular Biology Research*, 10 (2), 980-987.
- FEDOROFF, N., WESSLER, S., SHURE, M., 1983, Isolation Of The Transposable Maize Controlling Elements Ac and Ds. *Cell*. Vol.35, P.235–242.
- FEDOROFF, N., 2000, Transposons And Genome Evolution in Plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.97, No.13.
- FESCHOTTE, C., PRITHAM, E.J., 2007, DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*, 41: 331–368.
- FESCHOTTE, C., 2008, Transposable elements and the evolution of regulatory networks, *Nature Review Genetics*, vol. 9, 397-405.
- FINER, J.J., 1995, Direct Somatic Embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. P.92-102.
- FINNEGAN, D.J., 1989, Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution, *Trends in Genetics*. Vol.5, P.103-107.
- FLAVELL, R.B., BENNETT, M.D., SMITH, J.B., SMITH, D.B., 1974, Genome Size and The Proportion of Repeated Nucleotide Sequence DNA in Plants. *Biochemical Genetics*. Vol.12, P.257–269.
- FLAVELL, A.J., 1995, Retroelements Reverse Transcriptase And Evolution, *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry And Molecular Biology*, 110 (1), 3-15.
- GABUS, C., FICHEUX, D., RAU, M., KEITH, G., SANDMEYER, S., DARLIX, J.L., 1998, The yeast Ty3 retrotransposon contains a 5'-3' bipartite primer-binding site and encodes nucleocapsid protein NCp9 functionally homologous to HIV-1 NCp7, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 17 (16), 4873-4880.
- GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., ORALER, G., OKATAN, Y., PALAVAN, N., 1990, Callus Induction, Plant Regeneration and Chromosomal Variations in Barley, *Acta Botanica Neerlandica*. Vol.39, No.4.
- GRANDBASTIEN, M.L., 1998, Activation of Plant Retrotransposons Under Stress Conditions. *Trends in Plant Science*. Vol.3, No.5.
- GRANDBASTIEN, M.A., AUDEON, C., BONNIVARD, E., CASACUBERTA, J.M., CHALHOUB, B., COSTA, A.P.P., LE, Q.H., MELAYAH, D., PETIT, M., PONCET, C., TAM, S.M., SLUYS, M.A.V., MHIRI, C., 2005, Stress activation and genomic impact of *Tnt1* retrotransposons in Solanaceae, *Cytogenetic and Genome Research*, 110, 229-241.
- GRANDBASTIEN, M-A., SPIELMANN, A., CABOCHE, M., 1989, *Tnt1*, a Mobile Retroviral-Like Transposable Element of Tobacco isolated by Plant Cell Genetics. *Nature*. Vol.337, P.376–380.

- HAMAT-MECBUR, H., YILMAZ, S., TEMEL, A., SAHIN, K., GOZUKIRMIZI, G., 2012, Effects of Epirubicin on Barley Seedlings, *Toxicology and Industrial Health*, doi: 10.1177/0748233712451768.
- HARRISON, G.P., HUNTER, E., LEVER, A.M., 1995, Secondary structure model of the Mason-Pfizer monkey virus 5' leader sequence: identification of a structural motif common to a variety of retroviruses. *J. Virol.*, 69: 2175–2186.
- HAVECKER, E.R, GAO, X. and VOYTAS, D.F., 2004, The Diversity of LTR Retrotransposons, *Genome Biology*. Vol.5, No.225.
- NELSON, P., VOUSDEN, K.H., HUBBERT, N.L., LOWY, D. R., SCHILLER, J.T., 1989, HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO Journal* 8, 3905-3910.
- HESLOP-HARRISON, J.S., 2000, Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *Plant Cell*. Vol.12, P.617–636.
- HIROCHIKA, H., 1993, Activation of Tobacco Retrotransposons During Tissue Culture, *The EMBO Journal*. Vol.12, No.6.
- HIROCHIKA, H., OKAMOTO, H., KAKUTANI, T., 2000, Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation, *The Plant Cell*, 12, 357-368.
- HIROCHIKA, H., SUGIMOTO, K., OTSUKI, Y., TSUGAWA, H., KANDA, M., 1996, Retrotransposons of Rice involved in Mutations Induced By Tissue Culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.93, P.7783-7788.
- HUANG, C.R.L., BURNS, K.H., BOEKE, J.D., 2012, Active transposition in genomes, *The Annual Review of Genetics*, 46, 651-75.
- HUANG, J., ZHANG, K., SHEN, Y., HUANG, Z., LI, M., TANG, D., GU, M., CHENG, Z., 2009, Identification of a High Frequency Transposon Induced by Tissue Culture, *nDaiz*, a Member of the *hAT* Family in Rice, *Genomics*. Vol.93, P.274-281.
- JAASKELAINEN, M.J., MYKKANEN, A.H., ARNA, T., VICIENT, C.M., SUONIEMI, A., KALENDAR, R., SAVILAHTI, H., SCHULMAN, A.H., 1999, Retrotransposon BARE-1: Expression of Encoded Proteins and Formation of Virus-Like Particles in Barley Cells. *The Plant Journal*, Vol. 20, P.413–422.
- JACCARD, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin de la societe vaudoise des sciences naturelles*. Vol.44, P.223-270.
- JIANG, N., BAO, Z., TEMNYKH, S., CHENG, Z., JIANG, J., WING, R.A., MCCOUCH, S.R. and WESSLER, S.R., 2002, *Dasheng*: a recently amplified nonautonomous long terminal repeat element that is a major component of pericentromeric regions in rice, *Genetics*, 161, 1293-1305.

- JIANG, N., BAO, Z., ZHANG, X., HIROCHIKA, H., EDDY, S.R., MCCOUCH, S.R., WESSLER, S.R., 2003, An Active DNA Transposon Family in Rice. *Nature*. Vol.421, P.163–167.
- KAEPPLER, S.M., KAEPPLER, H.F., RHEE, Y., 2000, Epigenetic Aspects of Somaclonal Variation in Plants. *Plant Molecular Biology*, Vol.43, P.179-188.
- KALENDAR, R., VICIENT, C.M., PELEG, O., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., BOLSHOY, A. And SCHULMAN, A.H., 2004, Large Retrotransposon Derivatives: Abundant, Conserved but Nonautonomous Retroelements of Barley and Related Genomes, *Genetics*. Vol.166, P.1437-1450.
- KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H. 2006, IRAP and REMAP for Retrotransposon-Based Genotyping and Fingerprinting. *Nature Protocols*. Vol.1, No.5.
- KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMYKAL, P., SCHULMAN, A.H., 2010, iPBS: A Universal Method for DNA Fingerprinting and Retrotransposon Isolation, *Theoretical and Applied Genetics*. Vol.121, P.1419-1430.
- KAPITONOV, V.V., JURKA, J., 2008, A Universal Classification of Eukaryotic Transposable Elements Implemented in Repbase, *Nature Reviews Genetics*, 9, 411-412.
- KASHKUSH, K., FELDMAN, M., LEVY, A.A., 2002, Gene Loss, Silencing and Activation in a newly Synthesized Wheat Allotetraploid. *Genetics*. Vol.160, P.1651–1659.
- KASHKUSH, K., FELDMAN, M., LEVY, A.A., 2003, Transcriptional Activation of Retrotransposons Alters The Expression of Adjacent Genes in Wheat. *Nature Genetics*. Vol.33, P.102–106.
- KASHKUSH, K., KHASDAN, V., 2007, Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes, *Genetics*, 177, 1975-1985.
- KAZAZIAN, H.H. JR., GOODIER, J.L., 2002, LINE drive: Retrotransposition and Genome Instability. *Cell*. Vol.110, P.277–280.
- KAZAZIAN, H.H. JR., 2004, Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*. Vol.303, No.5664.
- KERWOOD, D.J., CAVALUZZI, M.J., BORER, 2001, Structure of SL4 RNA from the HIV-1 packaging signal. *Biochemistry*, 40: 14518–14529.
- KHAN, R., GIEDROC, D.P., 1992, Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (10), 6689-6695.
- KIDWELL, M.G., LISCH, D.R., 2000, Transposable Elements and Host Genome Evolution, *Trends In Ecology And Evolution*, **15** (3), 95-99.

- KORDIS, D., 2005, A Genomic Perspective on The Chromodomain-Containing Retrotransposons: Chromoviruses, *Gene*, 347 (2), 161-173.
- KRIZOVA, K., FOJTOVA, M., DEPICKER, A., KOVARIK, A., 2009, Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles1[w] , *Plant Physiology*, 149, 1493-1504. KUMAR, A, BENNETZEN, J.L., 1999, Plant Retrotransposons. *Annual Review of Genetics*. Vol.33, P.479–532.
- LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R., 1981, Somaclonal Variation-A Novel Source of Variability From Cell Cultures For Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol.6, No.4.
- LATEN, H.M., MAJUMDAR, A., GAUCHER, E.A., 1998, *SIRE-1*, a *copia*/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6897-6902.
- LEIGH, F., KALENDAR, R., LEA, V., LEE, D., DONINI, P., SCHULMAN, A.H., 2003, Comparison of The Utility of Barley Retrotransposon Families For Genetic Analysis by Molecular Marker Techniques. *Molecular Genetics and Genomics*. Vol.269, P.464-474.
- LENOIR, A., LAVIE, L., PRIETO, J-L., GOUBELY, C., CÔTÉ, J-C., PÉLISSIER, T., DERAGON, J-M., 2001, The Evolutionary Origin and Genomic Organization of SINEs in *Arabidopsisthaliana*. *Molecular Biology and Evolution*. Vol.18, P.2315–2322.
- LI, X., YU, X., WANG, N., FENG, Q., DONG, Z., LIU, L., SHEN, J., LIU, B., 2007, Genetic and Epigenetic Instabilities Induced by Tissue Culture in Wild Barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol.90, P.153-168.
- LLORENS, C., MUNOZ-POMER, A., BERNAD, L., BOTELLA, H. and MOYA, A., 2009, Network Dynamics of Eukaryotic LTR Retroelements Beyond Phylogenetic Trees, *Biology Direct*. Vol.4, P.41.
- LONING, W.E., SEADLER, H., 1997, Plant Transposons: Contributors To Evolution?, *Gene*, 205 (1-2), 245-253.
- MA, J., DEVOS, K.M., BENNETZEN, J.L., 2004, Analyses of LTR-Retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice, *Genome Research*, 14, 860-869.
- MADLUNG, A., COMAI, L., 2004, The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure, *Annals of Botany*. Vol.94, No.4.
- MAK, J., KLEIMAN, L., 1997, Primer tRNAs for reverse transcription, *Journal of Virology*, 71 (11), 8087–8095.

- McCLINTOCK, B., 1950, The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.36, P.344-355.
- McCLINTOCK, B., 1984, The Significance of Responses of the Genome to Challenge, *Science Journal*. Vol.226, P.792.
- MALIK, H.S., EICKBUSH, T.H., 1999, Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR-Retrotransposons, *Journal of Virology*, 73 (6), 5186-5190.
- MALIK, H.S., EICKBUSH, T.H., 2001, Phylogenetic Analysis of Ribonuclease H domains Suggests A Late, Chimeric Origin Of LTR Retrotransposable Elements and Retroviruses. *Genome Research*. Vol.11, P.1187-1197.
- MANNINEN, O., KALENDAR, R., ROBINSON, J., SCHULMAN, A.H., 2000, Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Mol Gen Genet.*, 264(3):325-34.
- MANNINEN, I., SCHULMAN, A.H., 1993, BARE-1, A Copia-Like Retroelement in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*. Vol.22, P.829-846.
- MEYERS, B.C., TINGEY, S.V., MORGANTE, M., 2001, Abundance, Distribution, and Transcriptional Activity of Repetitive Elements in The Maize Genome. *Genome Reserarch*. Vol.11, P.1660-1676.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Phsiol Plant*, 15, 473-479.
- NELLAKE, C., YAO, Y., JONES-BRANDO, L., MALLET, F., YOLKEN, R.H., KARLSSON, H., 2006, Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection, *BioMed Central Retrovirology*, 3 (44), 1-11.
- NEUMANN, P., POZARKOVA, D., KOBLIZKOVA, A., MACAS, J., 2005, PIGY, A NEW PLANT ENVELOPE-CLASS LTR-RETROTRANSPON, *MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS*, 273 (1), 43-53.
- NOMA, K., NAKAJIMA, R., OHTSUBO, H., OHTSUBO, E., 1997, RIRE1, a retrotransposon from wild rice *Oryza australiensis*, *Genes and Genetic Systems*, 72, 131-140.
- OHTSUBO, H., KUMEKAWA, N., OHTSUBO, E., 1999, RIRE2 a novel gypsy-type retrotransposon from rice, *Genes and Genetic Systems* 74, 83-91.
- PAILLART, J.C., SHEHU-XHILAGA, M., MARQUET, R., MAK, J., 2004, Dimerization of Retroviral RNA Genomes: An Inseparable Pair. *Nature Reviews Microbiology*, Vol.2, P.461-472.
- PARDUE M.L. DANILEVSKAYA O.N., 1997, Evolutionary links between telomeres and transposable elements, *Genetica*, 100:73-84.

- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., HESLOP-HARRISON, J.S., KUMAR, A., FLAVELL, A.J., 1996, The *Ty1-Copia* Group of Retrotransposons in *Vicia* Species: Copy Number, Sequence Heterogeneity and Chromosomal Localisation, *Molecular and General Genetics*. Vol.205, P.305-315.
- PEARL, L.H., 1987, The catalytic mechanism of aspartic proteinases, *Federation of European Biochemical Societies*, 214 (1), 8-12.
- PEREDO, E.L., REVILLA, M.A., ARROYO-GARCIA, R., 2006, Assessment of Genetic and Epigenetic Variation in Hop Plants Regenerated from Sequential Subcultures of Organogenic Calli, *Journal of Plant Physiology*. Vol.163, No.10.
- POCZAI, P., VARGA, I., LAOS, M., CSEH, A., BELL, N., VALKONEN, J.P.T., HYVONEN, J., 2013, Advances in Plant Gene-Targeted and Functional Markers: A Review. *Plant Methods*. Vol.9, P, 6.
- POURKHEIRANDISH, M. and KOMATSUDA, T., 2007, The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective, *Annals of Botany*, Vol.100, No.7.
- POUTEAU, S., GRANDBASTIEN, M.A., BOCCARA, M., 1994, Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon, *The Plant Journal*, 5 (4), 535-542.
- POUTEAU, S., HUTTNER, E., GRANDBASTIEN, M.A., CABOCHE, M., 1991, Specific Expression Of The Tobacco *Tnt1* Retrotransposon In Protoplasts, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 10 (7), 1911-1918.
- RABINOWICZ, P.D., CITEK, R., BUDIMAN, M.A., NUNBERG, A., BEDELL, J.A., LAKEY, N., O'SHAUGHNESSY, A.L., NASCIMENTO, L.U., McCOMBIE, W.R., MARTIENSSEN, R.A., 2005, Differential Methylation of Genes and Repeats in Land Plants, *Genome Research*. Vol.15, No.10.
- RAMSAY, L.M., SAYER J.A., GADD G.M., 1999, Stress responses of fungal colonies towards toxic metals. In *The Fungal Colony*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p178-200.
- ROEBUCK, K.A., SAIFUDDIN, M., 1999, Regulation of HIV-1transcription. *Gene Exp*. 8,67–84.
- SABOT, F., SOURDILLE, P., BERNARD, M., 2005, Advent of a New Retrotransposon Structure: The Long Form of The Veju Elements. *Genetica*. Vol.125, P.325–332.
- SABOT, F., SCHULMAN, A.H., 2006, Parasitism and The Retrotransposon Life Cycle in Plants: A Hitchhiker's Guide to The Genome. *Heredity*. P. 1-8.
- SABOT, F., SOURDILLE, P., CHANTRET, N., BERNARD, M., 2006, Morgane, a New LTR Retrotransposon Group, and Its Subfamilies in Wheats. *Genetica*. Doi: 10.1007/S10709-006-0016-3.

- SANMIGUEL, P., GAUT, B.S., TIKHONOV, A., NAKAJIMA, Y., BENNETZEN, J.L., 1998, The Paleontology Of Intergene Retrotransposons Of Maize, *Nature Genetics*, 20, 43-45.
- SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A., JIN, Y-K., MOTCHOULSKAIA, N., ZAKHAROV, D., MELAKE-BERHAN, A., SPRINGER, P.S., EDWARDS, K.J., LEE, M., AVRAMOVA, Z., BENNETZEN, J.L., 1996, Nested Retrotransposons in The Intergenic Regions of The Maize Genome, *Science*. Vol.274, No.765–768.
- SANTOS, M.D., BUSO, G.C., TORRES, A.C., 2008, Evaluation of Genetic Variability in Micropropagated Propagules of Ornamental Pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] Using RAPD Markers. *Genetics and Molecular Research*, Vol.7, P.1097-1105.
- SCHULMAN, A.H., KALENDAR, R., 2005, A Movable Feast: Diverse Retrotransposons and Their Contribution To Barley Genome Dynamics. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol.110, P.598–605.
- SCHULMAN, A.H., 2012, Hitching a Ride: Nonautonomous retrotransposons and parasitism as a lifestyle, Eds: M.-A. Grandbastien and J. M., Casacuberta, *Plant Transposable Elements (Chapter 5)*, Topics in Current Genetics 24, doi: 10.1007/978-3-642-31842-9_5.
- SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, K., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P. and STEIN, N., 2009, The International Barley Sequencing Consortium—At the Treshold of Efficient Access to the Barley Genome. *Plant Physiology*. Vol.149, P.142-147.
- SHAN, X., LI, Y., TAN, M., ZHAO, Q., 2012, Tissue culture-induced alteration in cytosine methylation in new rice recombinant inbred lines, *African Journal of Biotechnology*, 11 (19), 4338-4344. SHIRASU, K., SCHULMAN, A.H., LAHAYE, T., 2000, A Contiguous 66-kb Barley DNA Sequence Provides Evidence for Reversible Genome Expansion, *Genome Research*. Vol.10, P.908-915.
- SUCK, G., TRAUT, W., 2000, TROMB, A New Retrotransposon of The Gypsy-Ty3 Group From The Fly *Megaselia scalaris*. *Gene*. Vol.255, P.51–57.
- SUONIEMI, A., SCHMIDT, D., SCHULMAN, A.H., 1997 *BARE-1* Insertion Site Preferences and Evolutionary Conservation of RNA and cDNA Processing Sites. *Genetica*. Vol.100, P.219–230.
- SUONIEMI, A., TANSKANEN, J., SCHULMAN, A.H., 1998, Gypsy-Like Retrotransposons Are Widespread in The Plant Kingdom. The *Plant Journal*. Vol.13, P.699–705.
- SUZUKI, S., ONO, R., NARITA, T., PASK, A.J., SHAW, G., WANG, C., 1, KOHDA, T., ALSOP, A.E., GRAVES, J.A.M., KOHARA, Y., ISHINO, F., RENFREE, M.B., KANEKO-ISHINO, T., 2007, Retrotransposon silencing by DNA

- methylation can drive mammalian genomic imprinting, *PLoS Genetics*, 3 (4), 531-537.
- SZAFRANSKI, K., DINGERMAN, T., GLOCKNER, G., WINCKLER, T., 2004, Template Jumping by a LINE Reverse Transcriptase Has Created A SINE-Like 5S rRNA Retropseudogene in *Dictyostelium*. *Molecular Genetics and Genomics*. Vol.271, P.98–102.
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, Ratet P, Mysore KS, 2008, Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*, *Plant J*. 2008 Apr;54(2):335-47.
- TAKEDA, S., SUGIMOTO, K., OTSUKI, H., HIROCHIKA, H., 1998, Transcriptional Activation Of The Tobacco Retrotransposon *Tto1* By Wounding And Methyl Jasmonate, *Plant Molecular Biology*, 36 (3), 365-376.
- TARLA BİTKİLERİ MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ, 2013, Arpa Islahı Çalışmaları, http://www.tarlabitkileri.gov.tr/index.php?option=com_k2&view=item&id=127:arpa-islak-birimi&Itemid=287&lang=en, [Ziyaret Tarihi: 12 Mart 2013].
- TCHORBADJIEVA, M.I., PANTCHEV, I.Y., 2004, DNA Methylation and Somatic Rmbryogenesis of Orchardgrass (*Dactylis Glomerata* L.). *Bulgarian Journal Plant Physiology*. Vol.30, No.(1-2).
- TEMEL, A., KARTAL, G., GOZUKIRMIZI, N., 2008, Genetic and Epigenetic Variations in Barley Calli Cultures. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. Vol.22, P.911-914
- TEMEL, A., GOZUKIRMIZI, N., 2013, Analysis of Retrotransposition and DNA Methylation in Barley Callus Culture. *Acta Biologica Hungarica*. Vol.64, P.86-95.
- THE INTERNATIONAL BARLEY GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2012, A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome, *Nature*, 491, 711-717.
- TISSERAT, B., 1991, Embriyogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration, *Plant Cell Culture*. P.79-105.
- TODESCHINI, A.L., MORILLON, A., SPRINGER, M., LESAGE, P., 2005, Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 25 (17), 7459-7472.
- TURNER, B.G., SUMMERS, M.F., 1999, Structural Biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*. Vol.285, P.1–32.
- UYSAL, M.E., YILDIRIM, A.F., 2003, Konya İlinde Kışlık ve Yazlık Ekilen Arpa Çeşitlerinde Yaprakbiti (Homoptera:Aphidoidea) Populasyon Gelişimi. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*. Vol.17, No.32.

- VICIENT, C.M., SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JO'NSSON, K., TANSKANEN, J., BEHARAV, A., NEVO, E., SCHULMAN, A. H., 1999, Retrotransposon *BARE-1* and Its Role in Genome Evolution in The genus *Hordeum*. *Plant Cell*, Vol.11, P.1769–1784.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H., 2001a, *Envelope*-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants, *Genome Research*, 11, 2041-2049.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H., 2005, Variability, Recombination and Mosaic Evolution of The Barley *BARE-1* Retrotransposon. *Journal of Molecular Evolution*. Vol.61, P.275–291.
- VON BOTHMER, R., JACOBSEN, N., BADEN, C., JORGENSEN, R.B., LINDELAURSEN, I., 1995, *An ecogeographical study of the genus Hordeum*, 2nd ed., systematic and ecogeographic studies on crop genepools 7. International plant genetic resources institute, Roma, 929-0432-292.
- WESSLER, S.R., BUREAU, T.E., WHITE, S.E., 1995, LTR-Retrotransposons and MITES: important players in The Evolution of Plant Genomes. *Current Opinion Genetics and Development*. Vol.5, P.814–821.
- WICKER, T., N. STEIN, L. ALBAR, C. FEUILLET, E. SCHLAGENHAUF, KELLER, B., 2001, Analysis of a Contiguous 211 kb Sequence in Diploid Wheat (*Triticum monococcum*) Reveals Multiple Mechanisms of Genome Evolution. *The Plant Journal*. Vol.26, P.307–316.
- WICKER, T., SABOT, F., HUA-VAN, A., BENNETZEN, J.L., CAPY, P., CHALHOUB, B., FLAVELL, A., LEROY, P., MORGANTE, M., PANAUND, O., PAUX, E., SANMIGUEL, P. and SCHULMAN, A.H., 2007, A Unified Classified Classification System For Eukaryotic Transposable Elements. *Nature Reviews Genetics*. Vol.8, P.973-982.
- WILHELM, M., WILHELM, F.X., 2001, Reverse transcription of retroviruses and LTR-Retrotransposons, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1246-1262.
- WILKINS, A.S., 2010, The Enemy within: An Epigenetic Role of Retrotransposons in Cancer Initiation, *Bioessays*, 32 (10), 856-865.
- WILLS, J.W., CRAVEN, R.C., 1991, Form, function, and use of retroviral GAG proteins, *AIDS*, 5 (6), 639-654.
- WITTE, C.P., LE, Q.H., BUREAU, T., KUMAR, A., 2001, Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature (TRIM) Are involved in Restructuring Plant Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol.98, P.13778–13783.
- WRIGHT, D.A., VOYTAS, D.F., 2002, *Athila4* of *Arabidopsis* and *Calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses, *Genome Research*, 12, 122-131.

- XIONG, Y., EICKBUSH, T.H., 1988, Similarity of Reverse Transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns, *Molecular Biology and Evolution*, 5 (6), 675-690.
- YANG, J., BOGERD, H., LE, S.Y., CULLEN, B.R., 2000, The human endogenous retrovirus K Rev response element coincides with a predicted RNA folding region. *RNA*, 6: 1551–1564.
- YILMAZ, S., GOZUKIRMIZI, N., 2013, Variation of Retrotransposon Movement in Barley Callus Cultures and Regenerated Shoots of Barley. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. P.3:1-6.
- YILMAZ, S., 2013, Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Doku Kültüründe Retrotranspozon Hareketlerinin ve  r nlerinin Belirlenmesi, * stanbul Üniversitesi Fen Fakültesi*, Doktora Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

31.08.1984 tarihinde Bulgaristan'ın Ardino kasabasında doğdum. 2002'de İstanbul Plevne Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldum. 2006 güz döneminde başladığım Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı'ndaki yüksek lisans eğitimimi 2008 yılında tamamladım. Aynı yıl Moleküler Biyoloji ve Genetik doktora programına başladım.