



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

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

Sibel YILMAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Nisan, 2013

İSTANBUL

Bu çalışma 19/04/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

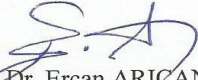


Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Tez Jürisi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 17704 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya,

Tez çalışmalarım sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım çalışma arkadaşlarıma ve aileme,

Lisansüstü eğitimim süresince burs sağlayarak destek olan TÜBİTAK-BİDEB'e sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2013

Sibel YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. LTR-RETROTRANSPOZONLARININ YAPISI	4
2.1.1. Uzun Uç Tekrar (“Long Terminal Repeat” - LTR) Dizileri	4
2.1.2. Primer Bağlanma Bölgesi (“Primer Binding Site” - PBS)	6
2.1.3. Grup-spesifik Antijen (“Group-specific antigen” - GAG)	6
2.1.4. Poliprotein (“Polyprotein” - POL) Bölgesi	7
2.1.5. Polipürin Bölgesi (“Polypurine Tract” - PPT)	7
2.1.6. Nadir Bulunan Genler	8
2.2. LTR-RETROTRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI	9
2.2.1. Otonom LTR-Retroelementler	10
2.2.1.1. <i>Ty1/copia</i>	10
2.2.1.2. <i>Ty3/gypsy</i>	10
2.2.1.3. <i>Bel/Pao</i>	11
2.2.1.4. <i>Retroviridae</i>	11
2.2.2. Otonom olmayan LTR-Retroelementler	11
2.2.2.1. <i>LARD</i> (“ <i>Large Retrotransposons Derivatives</i> ”)	11

2.2.2.2. <i>TRIM</i> (“ <i>Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature</i> ”).....	12
2.3. LTR-RETROTRANSPOZONLARIN HAREKET MEKANİZMASI	12
2.3.1. LTR-Retrotranspozonların Transkripsiyonu ve Translasyonu	13
2.3.2. LTR-Retrotranspozonların Revers Transkripsiyonu.....	13
2.3.3. LTR-Retrotranspozonların Genoma Entegrasyonu	15
2.4. LTR-RETROTRANSPOZON HAREKETLERİNİN DÜZENLENMESİ..	16
2.5. TRANSPOZONLARIN KONAK HÜCREDEKİ GÖREVLERİ	17
2.6. TRANSPOZONLARIN CANLI GENOMLARINDAKİ YÜZDELERİ	20
2.6.1. Arpa Transpozonları	22
2.6.1.1. <i>Barley Retroelement-1 (BARE1)</i>	23
2.6.1.2. <i>Barley Gypsy-2 (BAGY2)</i>	24
2.7. TRANSPOZONLARIN ÇALIŞILMA ALANLARI.....	26
2.8. RETROTRANSPOZON TEMELLİ MARKER TEKNİKLERİ	27
2.9. LTR-RETROTRANSPOZON TEMELLİ ÇALIŞMALAR	30
2.9.1. LTR-Retrotranspozon Temelli Evrimsel ve Filogenetik Çalışmalar	30
2.9.2. Çeşitli Stres Faktörleri ile Yapılan Çalışmalar	35
3. MALZEME VE YÖNTEM	40
3.1. BİTKİ MATERYALİNİN YETİŞTİRİLMESİ	41
3.2. DNA İZOLASYONU	42
3.3. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	43
3.4. IRAP TEKNİĞİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ	44
3.5. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ	45
3.6. POLİMORFİZMİN HESAPLANMASI	46
3.7. <i>BAGY2</i> ARA DOMENLERİNİN ANALİZİ.....	46
3.7.1. <i>BAGY2</i> Ara Domenleri İçin Primer Tasarımı	47
3.7.2. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin PCR İle Çoğaltılması.....	47
3.7.3. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin Klonlanması	48
3.7.3.1. <i>Ligasyon</i>	48
3.7.3.2. <i>Kompetan (yeterli) hücrelerin hazırlanması</i>	49
3.7.3.3. <i>Transformasyon</i>	50
3.7.3.4. <i>Rekombinant kolonilerin belirlenmesi</i>	50
3.7.3.5. <i>Plazmit izolasyonu ve restriksiyon enzimi kesimi</i>	51

3.7.4. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin Dizi Analizi.....	51
3.7.5. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin Kopya Sayısının Belirlenmesi.....	52
3.7.6. İstatistiksel Analizler	53
4. BULGULAR	55
4.1. DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI.....	55
4.2. DNA İZOLASYONU SONUÇLARI	56
4.3. IRAP-PCR SONUÇLARI	57
4.4. <i>BAGY2</i> ARA DOMENLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI	60
4.4.1. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin PCR Sonuçları	60
4.4.2. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin Klonlanma ve Dizi Analizi Sonuçları	64
4.4.3. <i>BAGY2</i> Ara Domenlerinin Kopya Sayısı Değişimi Sonuçları	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
5.1. KONTROL ÖRNEKLERİNİN IRAP DEĞERLENDİRMELERİ.....	80
5.2. DOKU KÜLTÜRÜ ÖRNEKLERİNİN IRAP DEĞERLENDİRMELERİ .	82
5.3. <i>BAGY2</i> ARA DOMENLERİNİN KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİ.....	84
KAYNAKLAR	88
EKLER	102
Ek1: Doku kültürü çalışmasında kullanılan besi yerlerinin hazırlanışı	102
Ek2: Elektroforezde kullanılan tamponların hazırlanışı	103
Ek3: Transformasyonda kullanılan çözeltilerin ve besi yerlerinin hazırlanışı	104
Ek4: TREP veri tabanından elde edilen <i>BAGY2</i> 'ye ait TREP3162 dizisi.....	106
Ek5: Deney sonuçlarından elde edilen domenlerin dizileri.....	107
Ek6: qPCR için standart eğri grafikleri.....	108
ÖZGEÇMİŞ	110

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: LTR-Retrotranspozonunun şematik gösterimi	4
Şekil 2.2	: Otonom LTR-Retroelementlerin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.3	: LTR-Retrotranspozonların genel hayat döngüsü	12
Şekil 2.4	: LTR-Retrotranspozonların revers transkripsiyonu.....	14
Şekil 2.5	: Bazı önemli bitki türlerindeki transpozon yüzdeleri	21
Şekil 2.6	: Arpa genomundaki transpozon yüzdeleri.....	23
Şekil 2.7	: Arpa kromozomlarında <i>BAGY2</i> retrotranspozonunun dağılımı	26
Şekil 2.8	: LTR-Retrotranspozon temelli marker teknikleri.....	28
Şekil 3.1	: Tez çalışmasının genel akışı.....	40
Şekil 3.2	: Klonlamada kullanılan vektör haritası	48
Şekil 4.1	: Çalışmada kullanılan doku kültürü örnekleri	56
Şekil 4.2	: İzole edilen DNA'ların aragoz jel elektroforezi görüntüsü.....	57
Şekil 4.3	: Kontrol örneklerinin IRAP-PCR sonuçları	58
Şekil 4.4	: Doku kültürü örneklerinin IRAP-PCR sonuçları	59
Şekil 4.5	: <i>BAGY2</i> GAG domeninin PCR sonuçları	62
Şekil 4.6	: <i>BAGY2</i> PR domeninin PCR sonuçları.....	62
Şekil 4.7	: <i>BAGY2</i> RT domeninin PCR sonuçları.....	63
Şekil 4.8	: <i>BAGY2</i> RH domeninin PCR sonuçları	63
Şekil 4.9	: <i>BAGY2</i> INT domeninin PCR sonuçları	63
Şekil 4.10	: <i>BAGY2</i> ENV domeninin PCR sonuçları	64
Şekil 4.11	: Jelden geri kazanılan PCR ürünleri	65
Şekil 4.12	: Koloni PCR sonuçları.....	65
Şekil 4.13	: Restriksiyon enzimi kesimi sonuçları.....	66
Şekil 4.14	: qPCR primerlerinin özgünlük kontrolü sonuçları	68
Şekil 4.15	: <i>Actin</i> geni qPCR Cq değerleri	69
Şekil 4.16	: <i>Actin</i> geni qPCR SQ değerleri.....	70
Şekil 4.17	: <i>BAGY2</i> GAG domeni qPCR Cq değerleri.....	72
Şekil 4.18	: <i>BAGY2</i> GAG domeni qPCR SQ değerleri	73
Şekil 4.19	: <i>BAGY2</i> PR domeni qPCR Cq değerleri.....	74
Şekil 4.20	: <i>BAGY2</i> PR domeni qPCR SQ değerleri	74
Şekil 4.21	: <i>BAGY2</i> RT domeni qPCR Cq değerleri	75
Şekil 4.22	: <i>BAGY2</i> RT domeni qPCR SQ değerleri	76
Şekil 4.23	: <i>BAGY2</i> RH domeni qPCR Cq değerleri	77
Şekil 4.24	: <i>BAGY2</i> RH domeni qPCR SQ değerleri.....	77
Şekil 4.25	: <i>BAGY2</i> INT domeni qPCR Cq değerleri.....	78
Şekil 4.26	: <i>BAGY2</i> INT domeni qPCR SQ değerleri	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Çalışmada kullanılan primerlerin dizisi	44
Tablo 3.2	: IRAP-PCR bileşenleri ve miktarları.....	45
Tablo 3.3	: IRAP-PCR koşulları	45
Tablo 3.4	: Poliakrilamid jel bileşenleri	46
Tablo 3.5	: Ara domenlerin çoğaltılması için kullanılan PCR bileşenleri	47
Tablo 3.6	: Ara domenler çoğaltılması için kullanılan PCR koşulları.....	48
Tablo 3.7	: Blunting reaksiyon bileşenleri ve miktarları	49
Tablo 3.8	: Retriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler	51
Tablo 3.9	: Real-Time PCR bileşenleri ve miktarları	53
Tablo 3.10	: Real-Time PCR koşulları	53
Tablo 4.1	: IRAP-PCR sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri	60
Tablo 4.2	: AF254799.1 ve TREP3162 dizilerinin tblastn analizi sonuçları.....	61
Tablo 4.3	: BAGY2 ara domenlerinin dizi analizi sonuçları	67
Tablo 4.4	: qPCR standart eğrilerinin sonuçları	69
Tablo 4.5	: BAGY2 domenlerinin Cq ve SQ sonuçları ortalamaları	71
Tablo 4.6	: GAG domeni için yapılan Tukey testi p değerleri	73
Tablo 4.7	: PR domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri.....	74
Tablo 4.8	: RT domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri	76
Tablo 4.9	: RH domeni için yapılan Tukey testi p değerleri.....	77
Tablo 4.10	: INT domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri.....	79

SEMBOL LİSTESİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AFLP	: “Amplified Fragment Length Polymorphism” (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
AP	: Aspartik peptidaz
BAGY2	: “ <i>Barley Gypsy-2</i> ”
BARE1	: “ <i>Barley Retroelement-1</i> ”
bç	: Baz çifti
CA	: “Capsid protein” (Kapsid proteini)
CHR	: “Chromodomain” (Kromodomen)
Cq	: “Quantification cycle” (Kantifikasyon döngüsü)
C-terminal	: “Carboxy-terminus” (Karboksil-uç)
cv	: “Cultivar” (Kültür varyetesi)
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMS	: Etil metansülfonat
ENV	: “Envelope” (Zarf)
ERV	: “Endogeneous Retrovirus” (Endojen retrovirüs)
EST	: “Expressed Sequence Tags” (Eksprese olan dizi etiketleri)
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
GAG	: “Group-specific antigen” (Gruba özgü antijen)
H3K9	: Histon 3 Lizin 9
INT	: “Integrase” (İntegraz)
IPBS	: Inter Primer Binding Site Amplification (Primer bağlanma bölgeleri arası çoğaltım)
IRAP	: “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” (Retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi)
ISSR	: “Inter simple sequence repeat” (Kısa dizi tekrarları arası)
Kb	: Kilo baz
LADR	: “Large Retrotransposon Derivatives” (Büyük retrotranspozon türevleri)
LINE	: “Long Interspersed Element”
LTR	: “Long Terminal Repeat” (Uzun uç tekrar dizileri)
M	: Molar
MA	: “Matrix protein” (Matriks proteini)
Mb	: Megabaz
mg	: Miligram
MS	: Murashige ve Skoog besi yeri
MSAP	: “Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism” (Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi)

NC	: “Nucleocapsid protein” (Nükleokapsit proteini)
ng	: Nanogram
OD	: Optik densite
ORF	: “Open Reading Frame” (Açık okuma çerçevesi)
PAGE	: “Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (Poliakrilamit jel elektroforezi)
PBS	: “Primer Binding Site” (Primer bağlanma bölgesi)
PCR	: “Polymerase Chain Reaction” (Polimeraz zincir reaksiyonu)
POL	: “Polyprotein” (Poliprotein)
PPT	: “PolyPurine Tract” (Polipürin bölgesi)
PR	: “Protease” (Proteaz)
qPCR	: “Real-time Quantitative PCR”
R	: “Repeated region” (Tekrar bölgesi)
RAPD	: “Random Amplification of Polymorphic DNA” (Polimorfik DNA’nın rastgele çoğaltımı)
RBIP	: “Retrotransposon Based Insertional Polymorphism” (Retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizm)
REMAP	: “Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism” (Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi)
RH	: “Ribonuclease H” (Ribonükleaz H - RNazH)
RNA	: Ribonükleik asit
RRAP	: “RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism” (RAPD-retrotranspozon çoğaltım polimorfizmi)
RT	: “Reverse Transcriptase” (Revers transkriptaz)
SQ	: “Starting Quantity” (Başlangıç miktarı)
SSAP	: “Sequence Specific Amplified Polymorphism” (Diziye özgü çoğaltım polimorfizmi)
SU	: “Surface” (Yüzey proteini)
TM	: Transmembran
TRIM	: “Terminal-repeat Retrotransposons In Miniature” (Küçük uç tekrarlı retrotranspozonlar)
TY	: “Transposon Yeast” (Maya transpozonu)
U3	: “Unique for 3’ end of RNA” (RNA’nın 3’-ucu için özgün)
U5	: “Unique for 5’ end of RNA” (RNA’nın 5’-ucu için özgün)
UV	: Ultraviyole
VLP	: “Virus Like Particle” (Virüs benzeri parçacık)
YR	: “Tyrosine recombinaz” (Tirozin rekombinaz)

ÖZET

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

Bu tez çalışması kapsamında, arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) kallus ve sürgünlerinde, kültürü süresine bağlı olarak meydana gelen *BAGY2* retrotranspozonunun hareketinden kaynaklanan insersiyonel polimorfizm araştırıldı.

Çalışmada doku kültürü örneği olarak tek bir embriyodan köken alan 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünler kullanıldı. Bu örnekler bir çalışma grubu olarak değerlendirildi ve tüm moleküler çalışmalar üç çalışma grubu ile tekrarlandı. Bununla birlikte çalışmada kontrol amaçlı olarak, kültüre alınmamış embriyo (Kontrol 1), filtre kağıdında çimlendirilmiş fidelerin yaprakları (Kontrol 2) ve MS besiyeri yerinde çimlendirilen fidelerin yaprakları (Kontrol 3) kullanıldı. Bireyler arasında doğal olarak meydana gelen bir *BAGY2* polimorfizmi olup olmadığını belirlemek için her kontrolde dört farklı birey ile deneyler tekrarlandı. *BAGY2* polimorfizminin belirlenmesi için IRAP marker tekniği kullanıldı. IRAP sonuçlarının doğruluğunu kontrol etmek amacı ile örnekler arasındaki *BAGY2* ara domenlerinin kopya sayısı değişimleri qPCR ile belirlendi. Bununla birlikte çalışmada kullanılan arpa varyetesinde tüm *BAGY2* ara domenlerinin tam kopya halinde bulunduğunu göstermek için Kontrol 1 örneklerinde ara domenlerin dizi analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen diziler ve *BAGY2* protein dizileri, tblastn ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlendi.

Kontrol 1 örnekleri ile yapılan IRAP-PCR sonucunda bireyler arasında doğal bir *BAGY2* insersiyonel polimorfizmi olmadığı görüldü. Buna karşın Kontrol 1 / Kontrol 2 ve Kontrol 1 / Kontrol 3 örnekleri arasında %8 polimorfizm olduğunun tespit edilmesi, farklı organlar arasındaki *BAGY2* insersiyonel profilinin farklı olabileceğini gösterdi. Doku kültürü örnekleri arasında %0-20 oranında polimorfizm tespit edildi. Sürgünlerdeki polimorfizm oranının kallus örneklerine göre düşük olması genomu daha kararlı olan hücrelerin rejenerasyon şansının yüksek olabileceğini gösterdi. qPCR analizleri ile kallus ve sürgünlerdeki *BAGY2* ara domenlerinin kopya sayısının değişiklik gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar IRAP tekniği ile belirlenen polimorfik bantların *BAGY2* kopya sayısı artışından kaynaklanabileceğini doğruladı. *BAGY2* ara domenlerinin dizi analizleri sonucunda ise GAG %90, PR %86, RT %92, RH %94 ve INT ise %92 oranında *BAGY2* protein dizisi ile benzerlik gösterdi. Bu sonuçlar, çalışmada kullanılan arpa varyetesinde tüm *BAGY2* ara domenlerinin tam kopya halinde bulunduğunu kanıtladı.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, doku kültürü süresinin *BAGY2* retrotranspozonunun hareketinden kaynaklanan insersiyonel polimorfizme neden

olduğunu ve retrotranspozonların somaklonal varyasyon kaynağı olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar, doku kültürü süresinin retrotranspozonların insersiyonel hareketlerine olan etkisinin belirlenmesine katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, hayvan kök hücreleri ile yapılan çalışmalarda doku kültürü sürecinin retrotranspozon hareketleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için bir model olabilir. Retrotranspozonların insersiyonel hareketlerinden kaynaklanan polimorfizmlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar, retrotranspozon kaynaklı hastalıkların anlaşılması için temel oluşturabilir.

SUMMARY

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

In this study, the insertional polymorphism deriving from *BAGY2* retrotransposon movement in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) calli and shoots due to culturing duration was investigated.

In the study, 45- and 90-day-old calli deriving from the same embryo and their regenerants were used as tissue culture samples. These samples were considered as study a group and all molecular studies were replicated with 3 study groups. At the same time, uncultured embryo (Control 1), seedling leaves germinated between filter papers (Control 2) and seedling leaves germinated on MS medium (Control 3) were used as control in the study. The experiments were replicated with 4 individuals in each control to determine if there was any naturally occurring *BAGY2* polymorphism between the individuals. IRAP marker technique was employed to detect *BAGY2* polymorphism. To verify the IRAP results, copy number alterations of *BAGY2* internal domains between individuals were analyzed by qPCR. In addition, to confirm that all the *BAGY2* internal domains were present as a complete copy, internal domains of Control 1 samples were sequenced. The obtained sequences and *BAGY2* protein sequences were compared by tblastn and the similarity rates were determined.

IRAP-PCR results with control samples showed no natural *BAGY2* insertional polymorphism between individuals. However, the detection of 8% polymorphism between Control 1/Control 2 and Control 1/Control 3 samples showed that the *BAGY2* insertional profile might vary between different organs. 0-20% polymorphism was detected between tissue culture samples. The lower polymorphism rate in the shoots compared to the calli samples showed that the cells with more stable genome had an elevated chance to regenerate. By qPCR analyses, it was determined that the copy number of *BAGY2* internal domains in calli and shoots showed alterations. These results confirmed that the polymorphic bands detected by IRAP technique could result from the increase in *BAGY2* copy number. The sequencing results of *BAGY2* internal domains revealed similarity rates by GAG 90%, PR 86%, RT 92%, RH 94%, and INT 92% with *BAGY2* protein sequence. These results proved that all the *BAGY2* internal domains were present as a complete copy in the barley variety used in the study.

The results obtained from this study indicated that tissue culture duration lead to insertional polymorphism due to the movement of *BAGY2* retrotransposon and that the retrotransposons could be the source of somaclonal variation. These results might contribute to the detection of the tissue culture duration effects on insertional movements of retrotransposons. Besides, it could be a model to define the effects of tissue culture duration on retrotransposon movements in animal stem cells studies. The

studies for the detection of polymorphisms derived from insertional movements of retrotransposons could provide a basis to understand the retrotransposon-based diseases.

1. GİRİŞ

Transpozonlar genom içinde yer değiştirerek mutasyonlara ve genomdaki DNA miktarında değişikliklere sebep olan DNA dizileridir. Bu nedenle genomun hareketli elemanları olarak kabul edilirler. Transpozonlar ilk kez 1940'lı yılların sonlarında Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde tanımlanmıştır (McClintock, 1950). Buna karşın o yıllarda genomun kararlı olduğu fikri kabul gördüğü için bu büyük keşfin önemi yaklaşık 40 yıl boyunca anlaşılamamıştır. 1980'li yıllardan sonra yeni tekniklerin gelişmesi ve genom çalışmalarının artması ile transpozonların hemen hemen her canlı türünde bulunduğu ve pek çok türde genomun büyük bir kısmının transpozonlardan oluştuğu görülmüştür (Huang ve diğ., 2012). Özellikle büyük genoma sahip bitkilerde (mısır, arpa, buğday vb.), genomun yaklaşık %80-90'ını transpozonların oluşturduğu bulunmuştur. Bu nedenle arpa gibi tahıl grubu bitkiler, transpozon çalışmaları için iyi bir model organizmadır.

Gün geçtikçe artan çalışmalar sonucunda farklı hareket mekanizmaları kullanan yeni transpozon çeşitleri bulunmuş ve transpozonlar için bir sınıflandırma sistemine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla ilk sınıflandırma sistemi Finnegan (1989) tarafından transpozonların hareket mekanizmaları temel alınarak yapılmıştır. Bu sınıflandırmada transpozonlar iki ana gruba ayrılmıştır. Sınıf I (Retrotranspozonlar) olarak tanımlanan transpozonlar bir RNA ara ürünü kullanarak kopyala-yapıştır mekanizmasıyla hareket ederler. Bu tip retrotranspozon hareketleri sonucunda genomdaki DNA miktarında artış olur. Buna karşın Sınıf II (DNA Transpozonları) transpozonlar bulundukları bölgeden kesilip başka bir bölgeye girerek kes-yapıştır şeklinde hareket ettikleri için genomda DNA artışına neden olmazlar.

Transpozonlar, genomun hareketli elemanları olarak tanımlanmalarına karşın pek çoğu evrimsel süreçte aktivitelerini kaybetmiş durumdadır. Bununla birlikte transpozonların aktivasyon durumları çeşitli iç ya da dış faktörlerle değişiklik gösterebilmektedir. 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). Doku kültürü koşulları da bir stres faktörü olarak bilinmektedir.

Doku kültürü, yapay besi yerlerinde bitki ya da hayvanlardan alınan dokuların (eksplant) çoğaltılmasıdır. Bitki doku kültürü tekniği, tohumla üretimi zor olan bitkilerin mikroçoğaltımı, biyoteknolojik uygulamalarla transgenik bitkilerin elde edilmesi ve üstün özellikli bitkilerin klonlarının oluşturulması gibi pek çok amaç için rutin olarak kullanılmaktadır. Pratikteki kullanımına karşın doku kültürü uygulamalarının pek çok zorluğu vardır. Bu zorlukların başında somaklonal varyasyonlar sebebi ile klonal bitkilerin elde edilememesi gelmektedir.

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. Somaklonal varyasyonlar, kromozom sayısı ve yapısındaki değişiklikler, gen mutasyonları, somatik krossing-over, kardeş kromatid değişimi, insersiyon, delesyon, metilasyon değişimi, transpozon aktiviteleri gibi pek çok genetik ve epigenetik değişikliklerin sonucunda meydana gelebilir (Lee ve Phillips, 1988; Gözükırmızı ve diğ., 1990; Kaeppler ve diğ., 2000; Jain, 2001).

Günümüze kadar, doku kültüründe meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikleri araştırmaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır (Gözükırmızı ve diğ., 1990; Müller ve diğ., 1990; Temel ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2010). Buna karşın transpozonların doku kültürü koşullarında gösterdiği aktivite farklılıkları üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır (Hirochika, 1993; Grandbastien, 1998; Campbell ve diğ., 2011; Evrensel ve diğ., 2011; Bayram ve diğ., 2012). Bu nedenle transpozonların somaklonal varyasyonların oluşumundaki etkileri tam olarak anlaşılamamıştır. Bu tez çalışması kapsamında, arpa kalluslarında ve kallustan rejenere olan sürgünlerde, kültür süresine bağlı olarak *BAGY2* retrotranspozonunun hareketi sonucunda meydana gelen genetik farklılıkları araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Transpozonlar ilk kez Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde tanımlanan hareketli DNA parçalarıdır (McClintock, 1950). 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 Saedler, 1997; Fedoroff, 2000; Kidwell ve Lisch, 2000; Kazazian, 2004; Feschotte ve Pritam, 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).

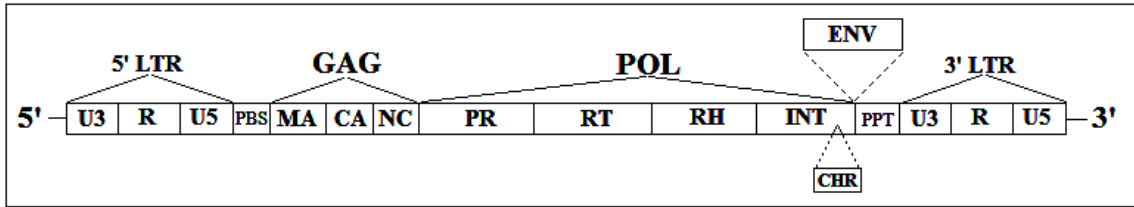
Retrotranspozonlar canlılarda en yaygın olarak bulunan transpozon çeşididir. Bugüne kadar bazı özellikleri bakımından farklılıklar gösteren pek çok retrotranspozon tanımlanmıştır. Bu nedenle retrotranspozonların sınıflandırılması henüz tamamlanamamıştır. Retrotranspozonlar, 5' ve 3' uçlarında Uzun Uç Tekrar ("Long Terminal Repeat" - LTR) dizileri taşıyıp taşıyamalarına göre iki grup altında sınıflandırılır: LTR ve nonLTR-Retrotranspozonlar.

LTR-Retrotranspozonları tüm transpozon çeşitleri içindeki en büyük alt gruptur. Pek çok canlı genomunun büyük bir kısmını oluşturur (Cordaux ve Batzer, 2009; Rebollo ve diğ., 2012; The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). LTR-Retrotranspozonları grubunda yer alan transpozonların büyük bir kısmı 5'- ve 3'-LTR dizilerinin arasında, hareketleri için gerekli olan enzimleri kodlayan ara domenlere sahiptirler. Tam kopya halindeki bir LTR-Retrotranspozonda en az 5 ara domen bulunur. Bununla birlikte LTR-Retrotranspozonları bir protein ürünü olmayan; ancak

retrotranspozonun hareketi sırasında gerekli olan bazı kısa DNA dizileri de taşır (Kumar ve Bennetzen, 1999; Vitte ve Bennetzen, 2006; Eickbush ve Jamburuthugoda, 2008).

2.1. LTR-RETROTRANSPOZONLARININ YAPISI

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 2.1’de şematik olarak gösterilmiştir (Havecker ve diğ., 2004).



Şekil 2.1: LTR-Retrotranspozonunun şematik gösterimi

LTR, Long Terminal Repeat; R, Repeated region; U3, Unique for 3' end of RNA; U5, Unique for 5' end of RNA; PBS, Primer Binding Site; GAG, Group-specific antigen; MA, Matrix protein; CA, Capsid protein; NC, Nucleocapsid protein; POL, Polyprotein; PR, Protease; RT, Reverse Transcriptase; RH, Ribonuclease H; INT, Integrase; CHR, Chromodomain; ENV, Envelope; PPT, PolyPurine Tract (Havecker ve diğ., 2004 kaynağından uyarlanmıştır-Şekil ölçekli değildir.)

2.1.1. 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 aynı 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 2.1). 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 aynı 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).

2.1.2. Primer Bağlanma Bölgesi (“Primer Binding Site” - PBS)

PBS dizisi 5'-LTR ve retrotranspozon domenlerinin 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).

2.1.3. 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).

GAG domeni, 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).

GAG domeninin 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).

2.1.4. Poliprotein (“Polyprotein” - POL) Bölgesi

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), revers transkripsiyonu gerçekleştirmiş olan retrotranspozon DNA'sının genomu 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).

2.1.5. 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, revers transkripsiyon sırasında DNA-RNA hibritindeki RNA'nın yıkımı sonucunda tek zincirli halde kalan DNA ipliğinin (negatif DNA zinciri) koplementerinin (pozitif DNA zinciri) sentezinin başlatılmasında görev alır (Wilhelm ve Wilhelm, 2001).

2.1.6. Nadir Bulunan Genler

Otonom olan bir retrotranspozon kendi replikasyonunu gerçekleştirebilmek için GAG, PR, RT, RH ve INT domenlerinin 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 ENV proteini kodlayan domenlere sahiptirler (Wright ve Voytas, 1998). Buna karşın, evrimsel süreçte bu retrotranspozonların çoğu ENV domenlerini kaybetmişlerdir. Bu retrotranspozonlar ENV domenini yeniden kazanarak retrovirüslere dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle endojen retrovirüsler (ERV) olarak da adlandırılırlar. ENV domeni, retrovirüslerde olduğu gibi retrotranspozonlarda da GAG proteinleri ile çevrilmiş retrotranspozon DNA'sının hücreler, hatta organizmalar arasında enfeksiyonunu sağlar. ENV domeni, GAG ve POL bölgelerinden ayrı bir ORF'ye sahiptir (Vicent ve diğ., 2001a; 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. pozisyonundaki 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).

2.2. LTR-RETROTRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI

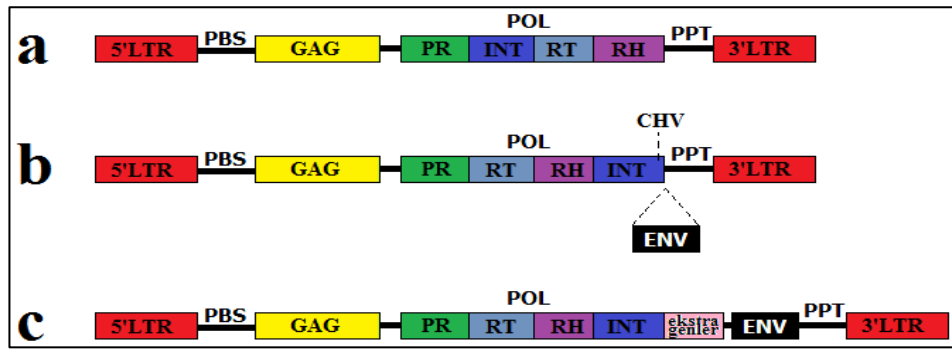
Transpozonlar ilk kez Finnegan (1989) tarafından hareket mekanizmaları temel alınarak sınıflandırılmıştır. Gün geçtikçe pek çok organizmanın genom projesinin tamamlanması ve mobilom alanında yapılan çalışmaların artması, farklı transpozon çeşitlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu nedenle, retrotranspozonların sınıflandırılmasında hiyerarşik bir sisteme gereksinim duyulmuştur. Bu sistemde transpozonlar hareket mekanizmaları temelinde Retrotranspozonlar (Sınıf I transpozonlar) ve DNA transpozonları (Sınıf II transpozonlar) olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Wicker ve diğ., 2007).

Retrotranspozonlar ve retrovirüsler, aralarındaki benzerlikler nedeni ile sınıflandırmada birlikte ele alınır. Bu nedenle sınıflandırma sırasında her iki grubu da kapsamaları için retroelement terimi kullanılır. Retroelementlerin sınıflandırılması henüz tamamlanmamış olmasına karşın dört grup altında toplanmışlardır. Bunlar LTR-Retroelementler, nonLTR-Retroelementler, Tirozin rekombinaz ("Tyrosine recombinase" - YR) Retroelementler ve Penelope Retroelementlerdir (Eickbush ve Jamburuthugoda, 2008).

LTR-Retroelementler, iki ucunda LTR dizileri taşıyan retroelementlerdir. Bugüne kadar bitki, hayvan ve mantarlarda tanımlanmış en yaygın transpozon (ya da retroelement) çeşitidir. Otonom ve otonom olmayan LTR-Retroelementler olarak ikiye ayrılır.

2.2.1. Otonom LTR-Retroelementler

Otonom LTR-Retroelementler, LTR dizileri arasında, hareketleri için gerekli olan proteinleri kodlayan gen kümesine sahiptir. Bununla birlikte bu grubun bazı üyeleri ENV ve CHR domenlerini de içermektedir. Ty1/copia, Ty3/gypsy, Bel/Pao ve Retroviridae olmak üzere dört alt grup olarak sınıflandırılırlar (Llorens ve diğ., 2009). Şekil 2.2’de dört alt grup otonom LTR-Retroelementlerin genel yapıları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Otonom LTR-Retroelementlerin şematik gösterimi
(a) Ty1/copia (b) Ty3/gypsy ve Bel/Pao (c) Retroviridae
(Eickbush ve Jamburuthugoda, 2008 kaynağından uyarlanmıştır-Şekil ölçekli değildir.)

2.2.1.1. Ty1/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 2.2.a). 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 düşünülmektedir. Buna karşın, yapılan çalışmalarla bitkilerde çok yaygın olarak bulunan Sireviruslar'ın de ENV domenine sahip oldukları saptanmıştır (Laten ve diğ., 1998).

2.2.1.2. Ty3/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 2.2.b). Bu gruba giren retrotranspozonlar omurgalıların endojen retrovirüsleri ile büyük benzerlikler gösterirler. Bu nedenle evrimsel süreçte genomu sonradan dahil olan retrovirüsler oldukları düşünülmektedir. Bu gruba giren pek çok retroelement ENV domenine 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).

2.2.1.3. *Bel/Pao*

Bu grubun üyeleri sadece metazoanlarda tanımlanmıştır. POL bölgesinin organizasyonu bakımından Ty3/gypsy ve Retroviridae ile benzerdir (Şekil 2.2.b). Grubun pek çok üyesinin ENV domeni içerdiği bilinmektedir. Pao, Sinbad, Bel, Tas ve Suzu olmak üzere beş genusta sınıflandırılırlar (Copeland ve diğ., 2005).

2.2.1.4. *Retroviridae*

Omurgalı hayvanlarda tanımlanan endojen retrovirüslerdir (ERV). POL bölgesinin organizasyonu bakımından Ty3/gypsy ile hemen hemen aynıdır. Buna karşın pek çok retroviridae üyesi ekstra genler de içermektedir (Şekil 2.2.c). Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Spumaretrovirus ve Lentivirus olmak üzere yedi genusta sınıflandırılır (Gifford ve Tristem, 2003).

2.2.2. Otonom olmayan LTR-Retroelementler

Bu grupta yer alan retroelementler LTR, PBS ve PPT dizilerini içermelerine karşın, GAG ve POL bölgelerine sahip değildir. Evrimsel süreçte otonom LTR-Retroelementlerden köken aldıkları düşünülmektedir. Bugüne kadar sadece bitkilerde tanımlanmışlardır. Yapı farklılıkları bakımından "Large Retrotransposons Derivatives (LARD)" ve "Terminal-repeat Retrotransposons In Miniature (TRIM)" olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar.

2.2.2.1. *LARD ("Large Retrotransposons Derivatives")*

Uzunlukları 5.5 kb ile 8.5 kb arasında değişen elementlerdir. Tahıl grubu bitkilerinde tanımlanmışlardır. LTR dizileri arasında kodlama yapmayan uzun bir bölgeye sahiptir. Bu bölge PBS ve PPT dizilerini içerir. Hareketleri sırasında Ty3/gypsy retroelementleri

tarafından kodlanan proteinleri ve enzimleri kullanırlar. Bu nedenle evrimsel süreçte Ty3/gypsy grubundan köken aldığı düşünülür (Kalendar ve diğ., 2004).

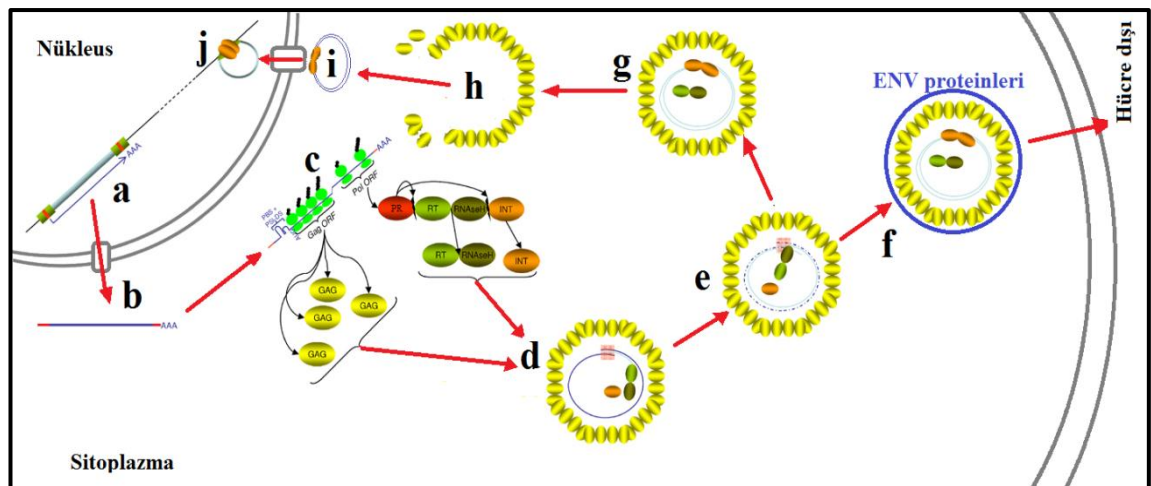
2.2.2.2. TRIM (“Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature”)

Bitkilerde tanımlanmış oldukça küçük (<540 bç) retrotranspozonlardır. 100-250 bç uzunluğunda LTR'lere sahiptirler. LTR'ler arasında kalan kodlama yapmayan bölgenin uzunluğu 100-300 bç arasında değişir. PBS ve PPT dizileri bu bölgede bulunur. Ty1/copia ya da Ty3/gypsy gruplarından köken aldığı düşünülmektedir. Buna karşın kesin bir kanıt bulunamamıştır (Witte ve diğ., 2001).

2.3. LTR-RETROTRANSPOZONLARIN HAREKET MEKANİZMASI

Retrotranspozonlar hareket ederken bir mRNA ara ürünü kullanarak kendi cDNA kopyalarını oluşturur ve yeni oluşan bu kopya genoma entegre olur. Bir retrotranspozonun hareketi sırasında transkripsiyon basamağından genoma entegre olma basamağına kadar geçen süre retrotranspozonun hayat döngüsü olarak adlandırılır.

Gerek genomda yaygın bulunmaları gerekse retrovirüslere benzerlikleri nedeni ile hayat döngüsü en iyi bilinen retrotranspozon çeşidi LTR-retrotranspozonlarıdır. Bir LTR-Retrotranspozonunun hayat döngüsü genel olarak; transkripsiyon/translasyon, revers transkripsiyon ve genoma entegrasyon olmak üzere üç basamaktan oluşur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: LTR-Retrotranspozonların genel hayat döngüsü

(a) Transkripsiyon (b) Sitoplazmaya taşınım (c) Translasyon (d) VLP oluşumu (e) Revers transkripsiyon (f) Hücre dışına taşınım
(g) Nükleus zarına yönelim (h) VLP yapısının bozulması (i) Nükleusa taşınım (j) Genoma entegrasyon
(Sabot ve Schulman, 2006 kaynağından uyarlanmıştır.)

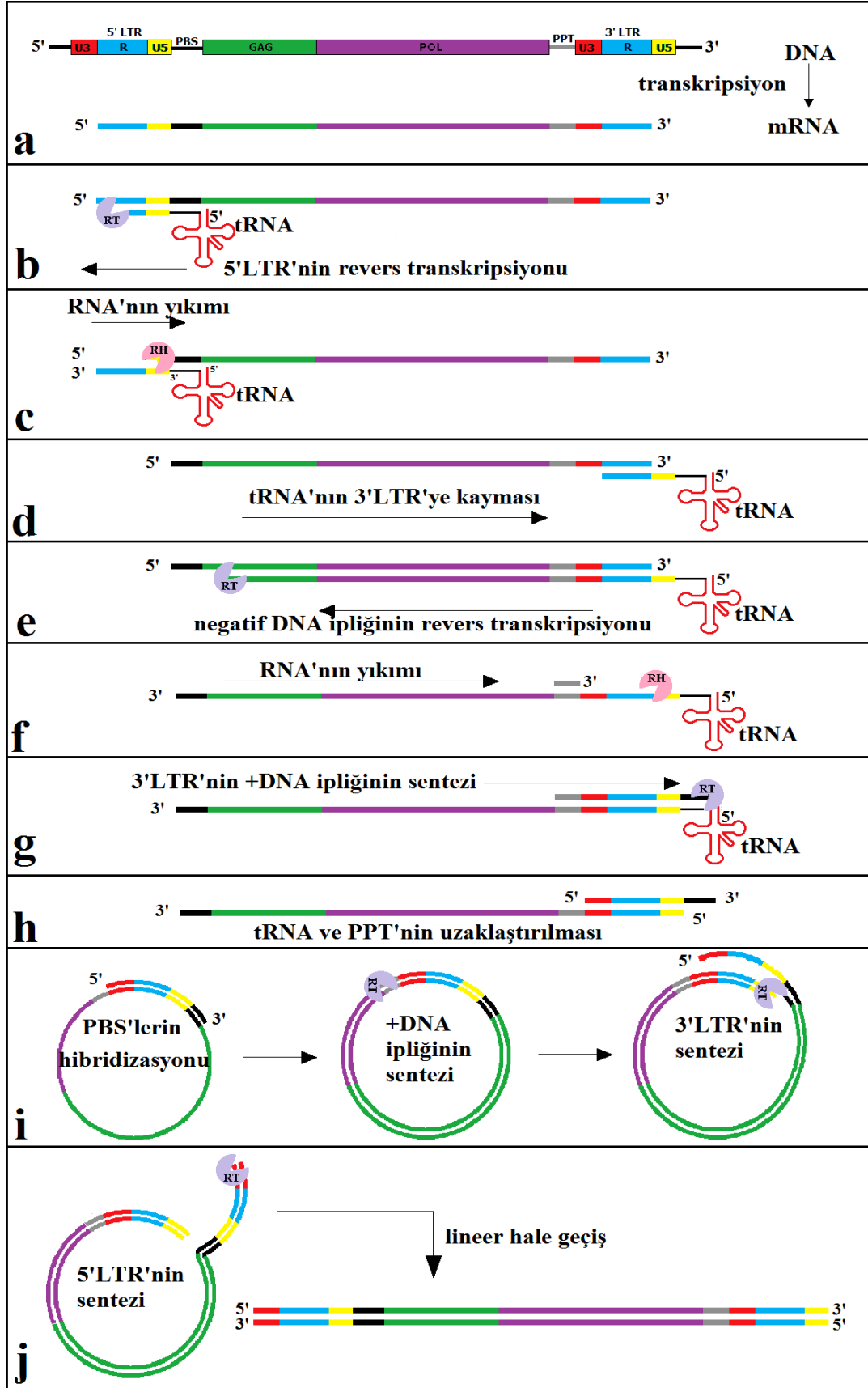
2.3.1. LTR-Retrotranspozonların Transkripsiyonu ve Translasyonu

LTR-retrotranspozonların hayat döngüsü transkripsiyonla başlar (Şekil 2.3 ve 2.4.a). Retrotranspozonlar RNA polimeraz kodlayan gene sahip olmadıkları için kullanılan RNA polimeraz hücresel kökenlidir. Bununla birlikte translasyon sırasında da hücre kaynaklarını (ribozomlar, tRNA'lar ve translasyon için gereken diğer faktörler) kullanırlar. Bu nedenle transkripsiyon ve translasyon aşamasında retrotranspozonlar hücreye bağımlı, başka bir deyişle parazittir. Buna ek olarak otonom olmayan LTR-Retrotranspozonlar hareketlerini sağlayan enzimleri kodlayan domenlere (GAG, RT, RH, INT, PR) sahip olmadıklarından dolayı diğer retrotranspozonların enzimlerini kullanırlar. Bu durumda otonom olmayan LTR-Retrotranspozonlar süper parazit olarak kabul edilirler.

LTR-Retrotranspozonların transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından yapılır (Rebollo ve diğ., 2012). Transkripsiyon, RNA polimeraz II enziminin 5'-LTR'sinin U3 bölgesinde bulunan promotör dizisine bağlanması ile başlar. Ardından 5'-LTR'nin R bölgesinden 3'-LTR'nin R bölgesine kadar olan dizinin transkripsiyonu gerçekleşir. mRNA sitoplazmaya taşınır ve translasyonu yapılır. LTR-Retrotranspozonları genellikle tek bir ORF'ye sahip oldukları için tüm domenler aynı polipeptid zinciri üzerinde bulunur. Bu nedenle zincir retrotranspozon tarafından kodlanan proteaz enzimi ile kesilir ve proteinler işlevsellik kazanacakları son hallerine işlenir. Olgunlaşma sonrasında GAG proteinleri retrotranspozon mRNA'sını ve kodlanan diğer enzimleri sararak virüs benzeri bir yapı oluşturur. Revers transkripsiyon bu yapının içinde gerçekleşir (Jaaskelainen ve diğ., 1999; Sabot ve Schulman, 2006).

2.3.2. LTR-Retrotranspozonların Revers Transkripsiyonu

Hücresel kaynaklı bir tRNA'nın 3'-ucundaki yaklaşık 18 nükleotitlik bir dizi retrotranspozon mRNA'sının PBS bölgesine bağlanarak revers transkriptaz (RT) için primer işlevi görür. Ardından RT, 5'-LTR'deki U5 ve R bölgelerine komplementer olan negatif DNA ipliğini sentezler (Şekil 2.4.b). RNazH (RH) 5'-LTR bölgesindeki RNA ipliğini degrade eder (Şekil 2.4.c). tRNA ve 5'-LTR'nin negatif DNA'sı, 3'-LTR bölgesine kayarak R bölgelerinden eşleşirler (Şekil 2.4.d). Bu yapı RT için primer olarak görev yapar ve RT, negatif DNA ipliğinin sentezini gerçekleştirir (Şekil 2.4.e).



Şekil 2.4: LTR-Retrotranspozonların revers transkripsiyonu
(Wilhelm ve Wilhelm, 2001 kaynağından yararlanılarak özgün çizilmiştir)

Oluşan RNA-DNA hibritindeki RNA, PPT bölgesi haricinde, RH tarafından yıkılır (Şekil 2.4.f). RT, bu kalan PPT-RNA'sını primer olarak kullanır ve 3'-LTR ile PBS bölgelerinin pozitif DNA ipliğini sentezler (Şekil 2.4.g). tRNA ve PPT, RH tarafından uzaklaştırılır (Şekil 2.4.h). Ardından iki uçta bulunan PBS bölgelerinin birleşmesi ile halkasal bir yapı meydana gelir ve RT, 3'-LTR'nin U5 bölgesine kadar + DNA ipliğini sentezler (Şekil 2.4.i). Bu esnada halkasal yapı açılır ve RT diğer ipliğe geçerek 5'-LTR'nin sentezini tamamlar (Şekil 2.4.j). Sentezlenen cDNA'nın doğrusal hale geçmesi ile revers transkripsiyon tamamlanmış olur (Kumar ve Bennetzen, 1999; Wilhelm ve Wilhelm, 2001).

2.3.3. LTR-Retrotranspozonların Genoma Entegrasyonu

Yeni sentezlenen retrotranspozon cDNA'sı VLP yapısının içinde iken 5' ve 3' uçlarında INT enziminin C-terminal bölgesine bağlanır. Ardından VLP yapısı hedef bölgeye yönelir. Bu aşamada retrotranspozon çeşidine bağlı olarak VLP'nin iki farklı hedefi olabilir. Eğer retrotranspozon işlevsel bir ENV domenine sahipse VLP yapısı ENV proteinleri ile paketlenir. ENV proteininin sahip olduğu sinyaller sayesinde hücre zarına doğru yönelir ve hücre dışına çıkarak diğer hücreleri enfekte edebilir (Şekil 3.2.f). ENV domeni taşımayan retrotranspozonlar ise GAG proteinlerinde bulunan nüklear membran sinyalleri sayesinde nukleusa yönelir. Bu sırada VLP yapısı bozulur ve retrotranspozon cDNA'sı serbest kalır. INT proteinleri ile bağlı durumda olan retrotranspozon cDNA'sı nüklear pordan geçer ve kromozom üzerindeki hedef bölgeye yönelir (Sabot ve Schulman, 2006).

Hedef bölgeye yönelimin pek çok retrotranspozonda rastgele olduğu düşünülmektedir. Buna karşın Ty3/gypsy grubuna dahil olan Chromoviruslar'ın, INT enziminde bulunan CHR domeni sayesinde H3K9 metilasyonunu tanıyarak heterokromatin bölgelere yöneldikleri bilinmektedir (Malik ve Eickbush, 1999; Kordis, 2005; Nefedova ve diğ., 2011).

Retrotranspozon cDNA'sı hedef bölgeye ulaştığında INT enziminin N-terminal bölgesindeki "zinc-finger" motifi sayesinde hücre DNA'sına bağlanır. Ardından INT enzimi sentral katalitik bölgesi ile hedef DNA'da 2-16 bp'lik bir asimetric çift zincir kesimi yapar. Kesim sonrasında retrotranspozon cDNA'sının hücre DNA'sı ile

ligasyonu gerçekleştirilir. DNA’da kalan kırıklar hücrenin DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilir. Böylece retrotranspozonun yeni bir kopyası genoma katılmış olur (Bennetzen, 2000; Havecker ve diğ. 2004).

LTR-Retrotranspozonlar, henüz tam olarak aydınlatılamamış karmaşık bir hayat döngüsüne sahip olmalarına karşın, aktivitelerinin LTR dizilerine bağlı olduğu iyi bilinmektedir. LTR dizilerinde herhangi bir mutasyon taşıyan retrotranspozonlar, tüm ara domenlere sahip olsalar bile yeni kopyalarını oluşturamazlar; bu nedenle LTR-Retrotranspozonlarının anlatımları büyük ölçüde LTR dizileri aracılığı ile düzenlenir.

2.4 LTR-RETROTRANSPOZON HAREKETLERİNİN DÜZENLENMESİ

Retrotranspozon hareketlerinin düzenlenmesi için canlıya, dokuya ve çevresel koşullara özgü pek çok mekanizma vardır. Bu düzenlenmeler transkripsiyonel, translasyonel ya da insersiyonel düzeyde olabilir. Retrotranspozon çeşidine bağlı olarak düzenlenme seviyeleri ve mekanizmaları farklılık gösterebilir. Retrotranspozon hareketlerinin düzenlenme mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın, konak hücrenin ve retrotranspozonun kendi hareketlerini düzenlediği düşünülmektedir (Pouteau ve diğ., 1991; Suoniemi ve diğ., 1996a; Labrador ve Corces, 1997).

Retrotranspozonlar arasında düzenlenme mekanizmaları en iyi bilinenler LTR-Retrotranspozonlardır. LTR dizileri promotör ve “cis-acting” dizilerini taşıdığı için transkripsiyonel seviyedeki düzenlenmede önemlidir. LTR dizileri başka transpozonların insersiyonları sonucunda bütünlüğünü kaybedebilir ve retrotranspozon transkripsiyonu gerçekleşemez (Kumar ve diğ., 1997). LTR dizilerinde meydana gelen bu gibi değişiklikler kalıcıdır ve konak hücre tarafından genomu transpozon hareketlerinden korumak için geliştirilen bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (SanMiguel ve diğ., 1996). Buna karşın LTR bölgesinde bulunan CpG adacıklarının metillenmesi retrotranspozonun geçici olarak inaktifleştirilmesini sağlar (Bennetzen ve diğ., 1994; Hirochika ve diğ., 2000). Metilasyon, LTR-Retrotranspozonlarının geçici sessizleştirilmesinde en çok kullanılan epigenetik mekanizmadır. Buna karşın uzun süreli metilasyon, C-T yer değiştirme mutasyonlarına sebep olabilir. Bu gibi durumlar

retrotranspozonun transkripsiyonunu geri dönüşümsüz olarak engeller (SanMiguel ve diğ., 1996; Yoder ve diğ., 1997; Sharma ve diğ., 2008).

LTR-Retrotranspozonların sessizleştirilmesinde kullanılan diğ er bir epigenetik mekanizma ise histon asetilasyonudur (Duran-Dubief ve diğ., 2007). Retrotranspozonların büyük bir kısmı heterokromatin bölgede yer aldığı için bu bölgede görülen asetilasyon sonucu aktivitelerini kaybederler. Buna karşın retrotranspozonun bulunduğu heterokromatin bölgede meydana gelen bir deasetilasyon sonucunda aktivite geri kazanılabilir.

LTR-retrotranspozonların transkripsiyonlarının düzenlenmesi kendi aktiviteleri sonucunda da meydana gelebilir. Bazı retrotranspozonların antisens yönde de transkripsiyon yaptıkları bilinmektedir (Lankenau ve diğ., 1994; Danilevskaya ve diğ., 1999; Servant ve diğ., 2012). Bu mekanizma tam olarak anlaşılamamasına karşın, karşıt diziden sentezlenen mRNA'nın retrotranspozonun anlamlı dizisinden sentezlenen mRNA ile birleşerek çift iplikli hale geldiği ve RNA interferans mekanizması ile baskılandığı düşünülmektedir (Matsuda ve Garfinkel, 2009; Servant ve diğ., 2012).

2.5. TRANSPOZONLARIN KONAK HÜCREDEKİ GÖREVLERİ

Transpozonlar uzun yıllar boyunca genomda etkisiz, bencil DNA'lar olarak düşünülmüştür. Buna karşın günümüzde transpozonların, evrimden gen anlatımının düzenlenmesine kadar pek çok biyolojik olayda görev aldıkları bilinmektedir. Özellikle sentromerik ve telomerik bölgelerin bütünlüğünün korunması için önemlidirler (Pardue ve DeBaryshe, 2003; Wong ve Choo, 2004; Ma ve Jackson, 2006).

Transpozonların, canlılar üzerine olan en büyük etkisinin evrimsel süreçte yeni türlerin oluşumuna olan katkıları olduğu düşünülmektedir. Özellikle retrotranspozonların, replikatif tipteki hayat döngüleri nedeni ile canlı genomlarının şekillenmesinde büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir. Evrimsel süreç boyunca bu hareketli DNA parçaları genomda biriktirilerek günümüz canlı genomlarının büyük bir kısmını oluşturmuştur. Genomda girdikleri bölgelerde mutasyonlara neden olarak yeni allellerin oluşumuna katkıda bulunmuşlardır. Bu sayede evrimsel süreçte yeni varyetelerin ve

hatta türlerin ortaya çıkmasını sağlamışlardır. Özellikle LTR-Retrotranspozonları genoma girdikleri bölgeden tekrar çıkmadıkları için neden oldukları mutasyonlar kalıcıdır. Genomda kalıcı olan bu mutasyonlar, olumlu yönde oldukları zaman doğal seleksiyonda canlıya üstünlük sağlamışlardır. Bununla birlikte transpozonlar arasında görülen homolog rekombinasyonlar da genom çeşitliliğine büyük katkıda bulunmuştur. (Walker ve diğ., 1995). Transpozonların hareketleri sadece aynı hücrenin kromozomları arasında değildir. LTR-Retrotranspozonları, taşıdıkları ENV domenleri sayesinde hücre dışına atılarak diğer hücreleri ve hatta diğer türleri enfekte edebilirler. Bu nedenle LTR-Retrotranspozonlarının evrimsel süreçte türler arası gen geçişinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Jordan ve diğ., 1999).

Kromozomlarda neden oldukları dizi değişiklikleri ve DNA miktarı artışlarının yanı sıra transpozonlar gen anlatımının düzenlenmesinde de büyük bir öneme sahiptir. Transpozonlar genellikle heterokromatin bölgelere girmelerine karşın gen bakımından zengin bölgeleri de hedef alabilirler. Genlerin ekson ya da intron bölgelerine girerek genin protein ürününü değiştirebilir, yeni özellikler kazandırabilir ya da tamamen işlevsiz hale getirebilir. Bir genin intron bölgesine giren transpozonlar, genin transkripsiyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmasa bile ilgili genin mRNA'sının işlenmesi sırasında RNA'nın kırılma basamağını etkileyerek alternatif gen ürünleri oluşturabilir. Bu gibi bir durumda kırılma bölgesi taşıyan bir transpozon DNA'sı ekson gibi algılanarak olgun mRNA'ya dahil edilip eksonlaştırılır (Kashkush ve diğ., 2003).

LTR-Retrotranspozonların genoma entegrasyonu 5'-3' ya da 3'-5' yönde olabilir. Bir genin intron bölgesine 3'-5' yönde giren LTR-Retrotranspozonlar (özellikle solo-LTR'ler) antisens yönde transkripsiyon olmasına neden olabilir. Bu gibi bir durumda genin transkripsiyonu normal bir şekilde gerçekleşse bile transpozon promotörü tarafından sentezlenen antisens RNA sayesinde ilgili genin anlatımı post-transkripsiyonel olarak baskılanır (Lankenau ve diğ., 1994; Seitz ve diğ., 2003).

Genlerin kodlama yapan bölgelerine girerek neden oldukları bu değişikliklerin yanı sıra transpozonlar (özellikle LTR-Retrotranspozonları), genlerin promotör bölgelerine yakın konumlara entegre olarak ilgili genin anlatımını durdurabilir. Bu duruma ters olarak, LTR bölgelerinde taşıdıkları promotörler komşu genler için alternatif bir transkripsiyon

başlangıç bölgesi sağlayabilir ve bu genin anlatımını arttırabilir. Her iki durumda da ilgili genin görev aldığı biyolojik yolakta değişikliklere neden olurlar (Kashkush ve diğ., 2003).

Genellikle kalıcı olarak neden oldukları bu gen anlatım profillerindeki değişikliklerin yanı sıra transpozonlar, epigenetik mekanizmalarla gen anlatımının düzenlenmesinde de görev alırlar. Özellikle LTR-Retrotranspozonları LTR bölgelerinde taşıdıkları CpG adacıkları nedeni ile potansiyel metilasyon bölgeleridirler. Bu adacıklar metillendiği zaman hem transpozonun hem de komşu genlerin transkripsiyonları baskılanabilir (Kashkush ve diğ., 2003).

Transpozonların biyolojik süreçlerde sebep olduğu tüm bu değişiklikler canlıya olumlu yönde etki edebileceği gibi olumsuz yönde de etki edebilir. İnsanlarda görülen bazı hastalıkların transpozon aktivitelerinden kaynaklandığı önceki çalışmalarda tespit edilmiştir. Transpozonların hastalıklarla olan ilişkisi ilk kez Kazazian ve diğ., (1988) tarafından, insanlarda yaygın olarak bulunan *LINE1* retrotranspozonunun, Faktör VIII genine entegrasyonu sonucu hemofili A hastalığının oluşumuna sebep olmasının gösterilmesiyle ortaya çıkarılmıştır. Bu durum aynı zamanda insanlardaki bazı transpozonların aktivitelerini sürdürdüğünü de kanıtlamıştır. Bunlara ek olarak retrovirüslere olan benzerlikleri nedeni ile LTR-Retrotranspozonların bazı kanser türlerinin oluşumunda da etkin olabileceği bildirilmiştir (Bowen ve Jordan, 2002; Suter ve diğ., 2004; Wilkins, 2010).

Transpozonların gen anlatımı üzerine olan tüm bu etkileri çok az transpozon çeşidi için kanıtlanabilmiştir. Henüz pek çok transpozonun genomdaki fonksiyonları belirlenememiştir. Normal şartlarda inaktif durumda olan bazı transpozonların stres koşullarında aktif duruma geçmesi, transpozonların endojen ya da eksojen stres kaynaklarına bir cevap olabileceğini de göstermiştir. Patojen saldırısı, tuz stresi, doku kültürü gibi bitkilerde stres yolaklarını uyaran faktörlerin transpozonların aktivitelerini etkilediği daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Pouteau ve diğ., 1991; Hirochika ve diğ., 1996; Grandbastien ve diğ., 2005; Todeschini ve diğ., 2005; Nellaker ve diğ., 2006). Buna karşın transpozonların stres mekanizmasındaki rolleri tam olarak açıklanamamıştır.

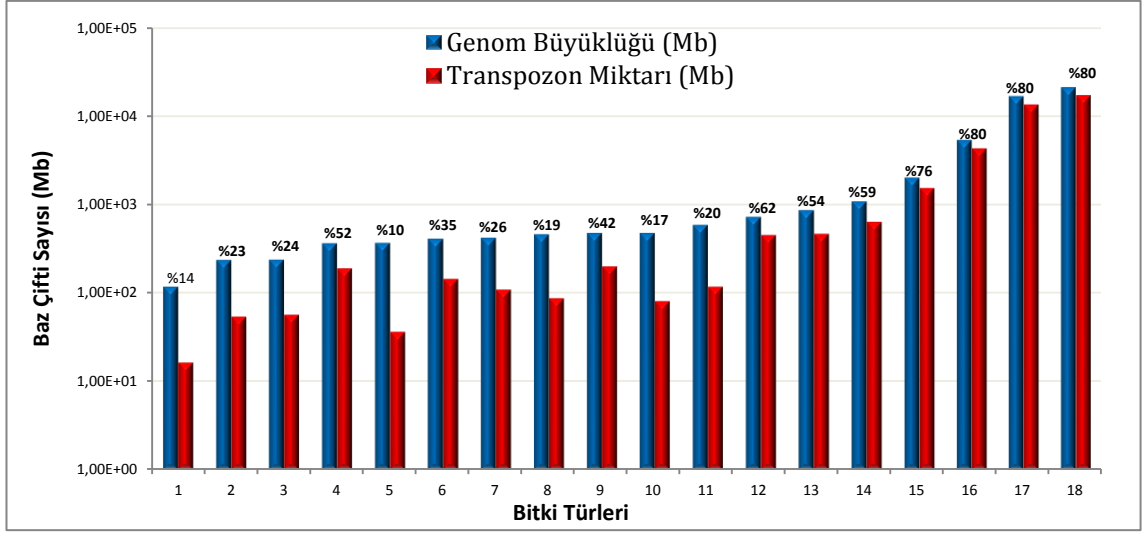
2.6. TRANSPOZONLARIN CANLI GENOMLARINDAKİ YÜZDELERİ

Transpozonlar pek çok canlının genomunda büyük bir yüzdeye sahiptir. Günümüze kadar sadece *Plasmodium* cinsinin bazı türlerinde transpozon varlığına rastlanmamıştır. Bu istisna dışında transpozonlar, bugüne kadar çalışılan tüm ökaryotlarda ve prokaryotlarda tanımlanmıştır (Bowen ve Jordan, 2002; Vitte ve Bennetzen, 2006; Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2012). Bununla birlikte transpozonların mitokondri genomunda da bulunduğu bildirilmiştir (Schuster ve Brennicke, 1987; Unseld ve diğ., 1997; Cai ve diğ., 2008).

Transpozonların genomdaki yüzdeleri, türler arasında hatta aynı türün varyeteleri arasında değişiklik göstermektedir. Prokaryotların çoğunda transpozon miktarı %1-3 arasında değişmektedir. Mayada ise transpozonların, genomun yaklaşık %3'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Hayvanlarda genomun %3-45 kadarını oluşturan transpozonlar, memeli genomunun %25-45'ini kapsar (Deininger ve Batzer, 2002).

İnsan genomunun %45'i transpozonlardan oluşur. DNA transpozonları bu oranın sadece %2.8'ini oluşturur. İnsan genomunda en çok bulunan transpozon çeşidi %33.7'lik bir oranla nonLTR-Retrotranspozonlardır. Pek çok canlı genomunun büyük bir yüzdesini oluşturan LTR-Retrotranspozonlar ise insan genomunun sadece %8.5'ini oluşturur (Cordaux ve Batzer, 2009).

Bitkiler en yüksek transpozon yüzdesine sahip olan canlılardır (%50-98). Şekil 2.5'te bazı önemli bitki türlerinin genom büyüklükleri ve içerdikleri transpozon miktarları verilmiştir (Hawkins ve diğ., 2006; Holligan ve diğ., 2006; The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007; Ming ve diğ., 2008; Wang ve Liu, 2008; Huang ve diğ., 2009; Qiu ve diğ., 2009; Wicker ve diğ., 2009; Kovach ve diğ., 2010; Schmutz ve diğ., 2010; Argout ve diğ., 2011; Shulaev ve diğ., 2011).



Şekil 2.5: Bazı önemli bitki türlerindeki transpozon yüzdeleri

(1) *Arabidopsis thaliana* (2) *Fragaria vesca* (3) *Cucumis sativus* (4) *Carica papaya* (5) *Medicago truncatula* (6) *Oryza sativa* (7) *Theobroma cacao* (8) *Lotus japonicus* (9) *Populus trichocarpa* (10) *Vitis vinifera* (11) *Brassica oleracea* (12) *Sorghum bicolor* (13) *Gossypium raimondii* (14) *Glycine max* (15) *Zea mays* (16) *Hordeum vulgare* (17) *Triticum aestivum* (18) *Pinus taeda* (Genom büyüklükleri logaritmik olarak verilmiştir.)

Bir canlının genomundaki transpozon miktarı genellikle genom büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bu durum kopyala-yapıştır mekanizması ile hareket eden transpozonların, genomun büyümesine neden olmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle tahıl grupları, tüm canlılar arasında en fazla transpozon miktarına sahip olan bitkilerdir ve transpozon yüzdelerinin büyük bir kısmını LTR-Retrotranspozonları oluşturur (Qiu ve diğ., 2009; Schmutz ve diğ., 2010; The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

LTR-Retrotranspozonları tahıl genomlarında yüksek oranda bulunmalarına karşın pek çoğu tam kopya halinde değildir. 5'- ve 3'-LTR bölgeleri arasındaki dizi benzerliği nedeni ile LTR'ler arası rekombinasyon sıklıkla görülen bir durumdur. Bu nedenle retrotranspozonlar genomda solo-LTR'ler halinde kalır. Solo-LTR'ler ara domenlerini kaybetmiş retrotranspozon kalıntılarıdır. Buna karşın diğer LTR-Retrotranspozonların enzimlerini kullanarak hareket edebilmektedirler (Vitte ve Panaud, 2003; Ma ve diğ., 2004).

Tahıllar grubunda yer alan mısır, buğday, arpa gibi bitkilerin genomlarının büyük bir kısmı transpozonlardan oluştuğu için bu gruptaki bitkiler transpozon çalışmaları için

ideal model organizmalar olarak görülmektedir. Özellikle arpa bitkisi, pek çok aktif LTR-Retrotranspozon grubu içermesi bakımından önem taşımaktadır.

2.6.1. Arpa Transpozonları

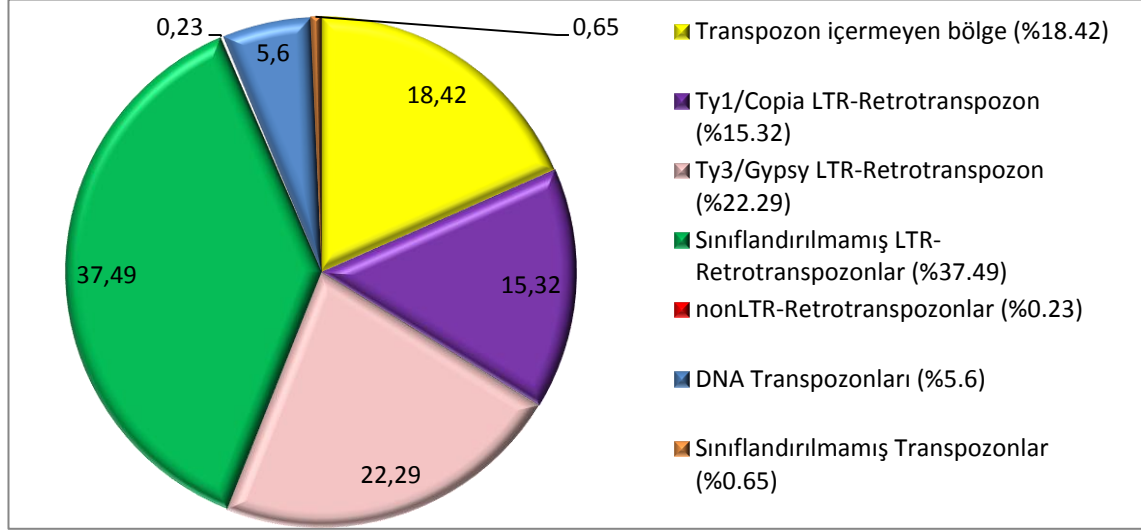
Arpa (*Hordeum vulgare* L.) *Poaceae* familyasında yer alan önemli bir ürün bitkisidir. Yaklaşık on bin yıl önce, bugünkü İsrail, Ürdün, Lübnan, Batı Suriye, Batı İran, Irak ile Güneydoğu Türkiye'yi kapsayan ve Bereketli Hilal olarak isimlendirilen bölgede kültüre alındığı bilinmektedir (Badr ve diğ., 2000; Salamini ve diğ., 2002). Günümüze kadar gerek ıslah çalışmaları gerekse doğal seleksiyonlar sonucunda, tarımsal üretimini kolaylaştıracak fenotipik özellikler kazanmıştır (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007).

Dünyada arpanın tahıllar arasındaki üretimi, mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. Bugün dünyada ekimi yapılan arpanın %65'i hayvan yemi olarak, %33'ü maltlık olarak bira ve viski yapımı ile biyodizel üretiminde, %2'si de insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde ise tüketimin %90'ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı ise maltlık olarak bira sanayisinde ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Foster ve diğ., 2000; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007).

Arpanın haploid kromozom sayısı $n=7$ 'dir. Diploid ($2n=2x=14$), tetraploid ($2n=4x=28$) ve hexaploid ($2n=6x=42$) genotipe sahip 32 tür içerir (Bothmer ve diğ., 1995). Haploid genom büyüklüğü yaklaşık olarak 5300 Mb'den oluşur. Genomunun büyük bir kısmı (%80-90) transpozonlar ve tekrarlı dizilerden oluştuğu için günümüz teknikleri ile genom dizileme çalışmaları oldukça zordur. Bu nedenle 1997 yılında başlanan genom projesi henüz tamamlanmıştır (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 2.6’da arpa genomundaki transpozonların yüzde miktarları verilmiştir (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).



Şekil 2.6: 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).

2.6.1.1. *Barley Retroelement-1 (BARE1)*

BARE1 arpada bulunan en yaygın ve aktif retrotranspozondur (Manninen ve Schulman, 1993). Daha önce yapılan çalışmalarla somatik dokularda transkripsiyonel olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Suoniemi ve diğ., 1996b; Jaaskelainen ve diğ., 1999). Aktivitesi yüksek oranda devam ettiği için genomdaki kopya sayısı arpa varyeteleri arasında, hatta hücreler arasında farklılık gösterebilir. Kesin olmamakla birlikte genomdaki kopya sayısının 14-16 bin arasında olduğu bildirilmiştir (Vicent ve diğ., 1999). Bu kopyaların pek çoğu evrimsel süreçte ara domenlerini kaybetmiş ve solo-LTR’ler olarak kalmıştır (Vicent ve diğ., 1999). Çok kopya halinde bulunması nedeni ile arpa genomunun yaklaşık olarak %12’sini oluşturur (Kalendar ve diğ., 2000; Soleimani ve diğ., 2006).

BARE1 5' ve 3' uçlarında yaklaşık 1800 bp uzunluğunda LTR dizileri içerir. Ara domenlerinin uzunluğu toplamı yaklaşık olarak 5275 baz çiftidir. Ara domenlerin retrotranspozon içindeki konumları Ty1/copia grubunun diğer üyeleri gibidir (GAG-PR-INT-RT-RH). GAG ve POL (PR-INT-RT-RH) bölgeleri iki ayrı ORF şeklindedir. *BARE1* 5'-LTR bölgesinde iki TATA kutusu içerir. Bu iki TATA kutusu farklı koşullarda *BARE1* mRNA'sının transkripsiyonundan sorumludur (Manninen ve Schulman, 1993). Transkripsiyon hücresel kaynaklı bir RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Revers transkripsiyon sırasında pek çok bitki retrotranspozonu gibi tRNA^{met} 3' bölgesini primer olarak kullanır (Suoniemi ve diğ., 1997).

BARE1 arpa genomunda genellikle birbirlerine ve diğer transpozonlara yakın olacak şekilde kümelenmiştir (Suoniemi ve diğ., 1997). Genomda genellikle kodlama yapmayan tekrarlı bölgelerde bulunmasına karşın, *in situ* hibridizasyon çalışmaları ile *BARE1*'in arpada tüm kromozomlarda sentromer ve telomer bölgeleri haricinde bulunduğu gösterilmiştir (Suoniemi ve diğ., 1996a).

Arpada *BARE1*'den sonra en yaygın olarak bulunan LTR-Retrotranspozonlar Ty3/gypsy grubunda yer alır. Bunlar arpa genomunda bulunma yüzdelerine göre *Sabrina* (%8.43), *Wham* (%5.5), *Barley Gypsy-2 - BAGY2* (%5.15) ve *Sukkula* (%3.59) olarak sıralanırlar. Bununla birlikte daha düşük bir yüzdeye sahip olan *Jeli* (%2.04), *Laura* (%1.98), *Haight* (%1.07), *Vagabond* (%0.99) ve *Sabina* (%0.89) LTR-Retrotranspozonları da Ty3/gypsy grubunda yer almaktadır (Wicker ve diğ., 2009).

2.6.1.2. Barley Gypsy-2 (BAGY2)

BAGY2 retrotranspozonu da *BARE1* gibi arpada aktif durumda bulunan LTR-Retrotranspozonları arasındadır (Shirasu ve diğ., 2000). Leigh ve diğ. (2003) arpada bulunan LTR-Retrotranspozonlarını, aktiviteleri bakımından *BARE1*>*BAGY2*=*Sukkula*>*Nikita*>*Sabrina* olarak sıralamışlardır. Bu sıralamada ikinci olan *BAGY2* retrotranspozonunun arpada; embriyo, kallus, yaprak, kök, çiçek ve diğer üreme organlarında aktif olarak anlatımının yapıldığı bildirilmiştir (Vicient ve diğ., 2001a; Maraklı ve diğ., 2012).

BAGY2, Ty3/gypsy LTR-Retrotranspozon grubunun Non-chromovirus alt grubundaki *Athila* sınıfına dahildir. *Athila* sınıfının üyesi olan retrotranspozonlar ENV domenine

sahip oldukları için potansiyel bitki endojen retrovirüsleri olarak görülür (Wright ve Voytas, 2002).

BAGY2, 5' ve 3' uçlarında yaklaşık olarak 1500 bp uzunluğunda LTR dizileri içerir. ENV domeni içermeyen bir *BAGY2* retrotranspozonunun büyüklüğü 10 Kb kadardır. Ara domenlerin retrotranspozon içindeki konumları diğer Ty3/gypsy grubunun üyeleri ile aynıdır (GAG-PR-RT-RH-INT-ENV). GAG ve POL bölgeleri iki ayrı ORF şeklindedir. ENV domenine sahip olan *BAGY2* kopyaları üçüncü bir ORF içerir. Transkripsiyon, hücrel kaynaklı bir RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Revers transkripsiyon başlangıcı için gerekli olan PBS bölgesi pek çok LTR-Retrotranspozonlarından farklı olarak tRNA^{asp} ile komplementerdir (Shirasu ve diğ., 2000; Wright ve Voytas, 2002). tRNA^{asp} primeri ENV domeni içeren bitki LTR-Retrotranspozonlarında yaygın olarak kullanılır. Revers transkripsiyon sırasında pozitif DNA ipliğinin sentezinin başlatılmasında görev alan ve 12-18 purin bazlarından oluşan iki korunmuş PPT bölgesi içerir. *BAGY2*'deki GAG ve POL bölgelerinin aktif transkripsiyonu ve genoma entegrasyonunun daha önceki çalışmalarda belirlenmesine karşın ENV domeninin aktivitesi sadece transkripsiyonel düzeyde saptanabilmiştir. Bununla birlikte ENV domeni içeren *BAGY2* kopyalarının transkripsiyon sonrasında alternatif olarak kırıldığı tespit edilmiştir (Shirasu ve diğ., 2000; Vicient ve diğ., 2001a; Wright ve Voytas, 2002).

BAGY2 diğer transpozonlar gibi arpa genomunda genellikle kümeler halinde bulunur. Bununla birlikte yapılan *in situ* çalışmalar ile *BAGY2*'nin tüm arpa kromozomlarında sub-telomerik bölgeler haricinde bulunduğu belirlenmiştir. Şekil 2.7'de 14 arpa kromozomundaki *BAGY2* retrotranspozonunun dağılımı FISH tekniği ile gösterilmiştir (Wicker ve diğ., 2009).

BAGY2'nin ara domenlerini kaybedip solo-LTR'ler halinde kalması sıklıkla görülen bir durumdur. Kopya sayısının tam olarak bilinmemesine karşın arpa genomunun yaklaşık %5.15'ini oluşturduğu düşünülmektedir (Wicker ve diğ., 2009). Veri tabanlarında bulunan *BAGY2* LTR dizileri genellikle diğer transpozonlar tarafından parçalanmış durumdadır. Bu durum, *BAGY2* aktivitesini düzenlemek için bitki genomu tarafından kullanılan bir mekanizma olarak görülebilir.



Şekil 2.7: Arpa kromozomlarında *BAGY2* retrotranspozonunun dağılımı
BAGY2 retrotranspozonunun bulunduğu kromozom bölgeleri yeşil, bulunmadığı bölgeler kırmızı olarak görülmektedir
(Wicker ve diğ., 2009)

Özellikle LTR-Retrotranspozonların bitki genomlarının büyük bir yüzdesini oluşturması, moleküler biyolojinin farklı uygulama alanlarında transpozonlardan yararlanılabileceğini göstermektedir.

2.7. TRANSPOZONLARIN ÇALIŞILMA ALANLARI

Transpozonlar (özellikle LTR-Retrotranspozonlar) genoma entegre oldukları bölgelerde genellikle kalıcı mutasyonlara sebep olurlar. Oluşan bu mutant karakterler döllenme ile yeni nesillere aktarılabilir. Bu nedenle yeni mutant hatların elde edilmesinde kullanılan yöntemlerin başında transpozon insersiyonları gelmektedir. Transpozonların yönlendirilmiş mutasyonları ile belli bir genin tamamen susturulması (“knockout” genler) sonucunda bu genin fonksiyonları çalışılabilir (Largaespada, 2009; Xu ve diğ., 2011).

Bununla birlikte son yıllarda transpozonların bir vektör gibi kullanılarak yabancı bir genin genoma entegrasyonunu sağlamaya yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Bu yollarla elde edilen transgenik canlılarda, aktarımı yapılan yabancı genin yönlendirilmiş bir insersiyonla genomda belirli bir bölgeye entegre olacağı düşünülmektedir. Transpozonlar genellikle heterokromatin bölgeleri hedef aldığı için transpozonlar ile

yapılan gen aktarım işlemlerinin genomda bulunan işlevsel genlere zarar vermeyeceği düşünülmektedir (Largaespada, 2009; Voigt ve diğ., 2012).

Transpozonların neden olduğu insersiyonal polimorfizmler daha çok DNA parmakizi, genetik haritalama, moleküler filogeni ve evrim gibi alanlarda belirleyici bir genetik marker olarak kullanılır. Özellikle retrotranspozon markerleri ile türler arası akrabalık ilişkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla retrotranspozon insersiyon polimorfizmlerini temel alan pek çok marker yöntemi geliştirilmiştir.

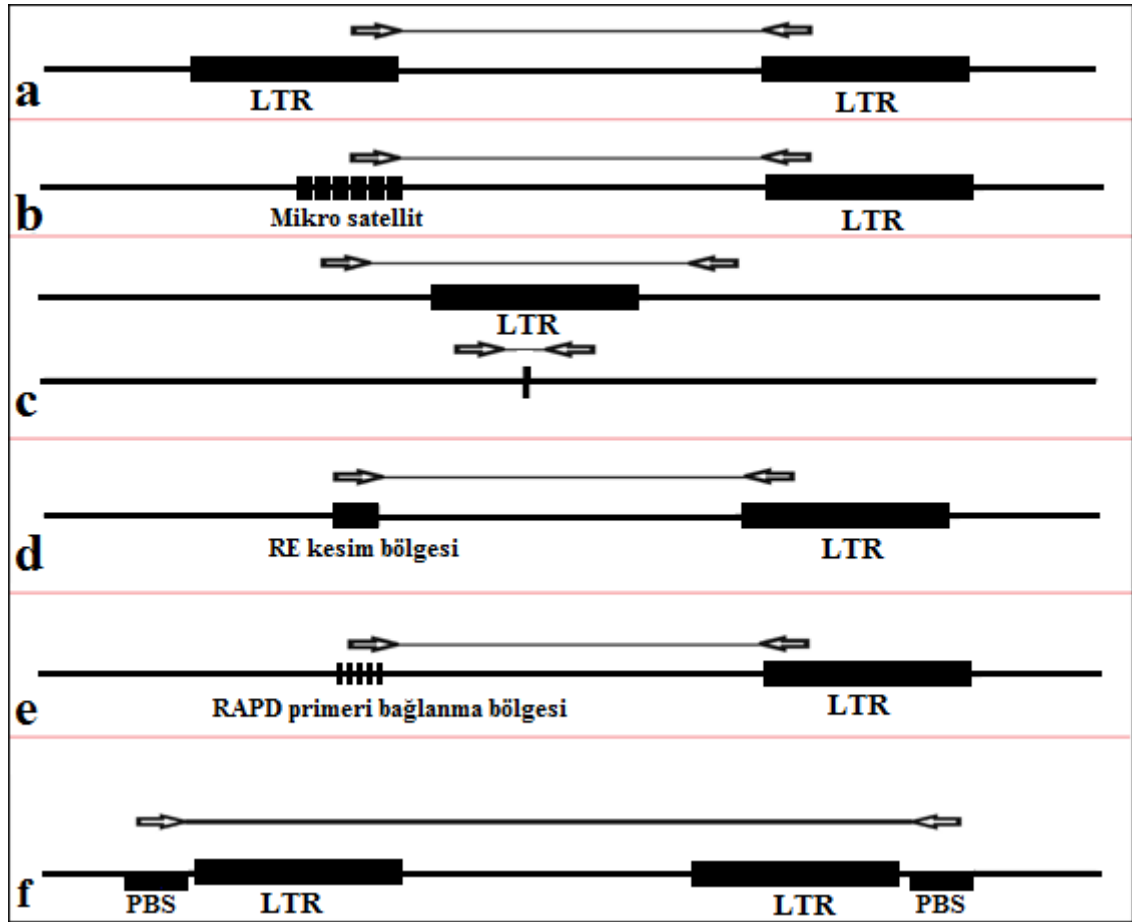
2.8. RETROTRANSPOZON TEMELLİ MARKER TEKNİKLERİ

Retrotranspozonların canlı genomlarının büyük bir kısmını oluşturduğunun ortaya çıkmasıyla moleküler filogeni çalışmaları için kullanılabilecekleri düşünülmüştür. Bu amaçla retrotranspozon kaynaklı polimorfizmleri belirlemeye yönelik pek çok marker tekniği geliştirilmiştir (Queen ve diğ., 2004; Grzebelus, 2006).

Bitkilerde kullanılan retrotranspozon temelli marker teknikleri genellikle LTR-Retrotranspozonları için geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar; retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi (“Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” - IRAP), retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi (“REtrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism” - REMAP), retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizm (“Retrotransposon Based Insertional Polymorphism” - RBIP), diziye özgü çoğaltım polimorfizmi (“Sequence Specific Amplified Polymorphism” - SSAP), RAPD-retrotranspozon çoğaltım polimorfizmi (“RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism” - RRAP) ve primer bağlanma bölgeleri arası çoğaltım (“Inter Primer Binding Site Amplification” - IPBS)’dır (Şekil 2.8).

IRAP, iki LTR-Retrotranspozon arasında kalan intergenomik bölgenin PCR ile çoğaltılması prensibini temel alan bir marker tekniğidir (Şekil 2.8.a). PCR’da kullanılan primerler retrotranspozonun LTR dizilerinin uçlarına göre tasarlanır. 3’-LTR dizisine göre ileri (F) ve 5’-LTR dizisine göre de geri (R) primerler kullanılır. PCR ürünleri agaroz ya da poliakrilamit jelde ayrılır ve örnekler arasındaki polimorfik bantlar

belirlenir. Elde edilen bant profilinden yararlanılarak polimorfizm oranı hesaplanır. IRAP uygulanabilirliği bakımından kolay ve hızlı bir yöntemdir. Buna karşın kullanılacak primerlerin tasarlanması için dizi bilgisine gereksinim duyulur. Bununla birlikte jelde gözlemlenen polimorfik bantlar her zaman çalışılan retrotranspozondan kaynaklanmış olmayabilir. Genomdaki diğer transpozonların ilgili retrotranspozonlar arasında kalan bölgeye insersiyonu sonucunda da polimorfizm gözlenebilir (Kalendar ve diğ., 1999).



Şekil 2. 8: LTR-Retrotranspozon temelli marker teknikleri

(a) IRAP (b) REMAP (c) RBIP (d) SSAP (e) RRAP (f) IPBS (Kalendar, 2011 kaynağından değiştirilmiştir).

REMAP, prensipte IRAP ile benzer bir yöntemdir. Genomda, bir mikrosatellit bölgesine yakın insersiyon yapmış olan retrotranspozonun LTR bölgesi ve mikrosatellit arasında kalan genomik bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayanır (Şekil 2.8.b). Örnekler arasındaki polimorfizm IRAP'ta olduğu gibi jelde görüntülenen bant profiline göre belirlenir. REMAP'ta da IRAP marker yönteminde olduğu gibi primer tasarımı için dizi bilgisine gereksinim vardır (Kalendar ve diğ., 1999).

RBIP, iki allel arasındaki retrotranspozon polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PCR'a dayalı bir marker tekniğidir (Şekil 2.8.c). İki farklı PCR'ın karşılaştırılması ile polimorfizm belirlenir. PCR'ların birinde, retrotranspozona ve yakınındaki bir genomik bölgeye özgün primerler kullanılır. Bu reaksiyon sonucunda çalışılan transpozonun LTR bölgesi çoğaltılır. Diğer reaksiyonda ise retrotranspozonu çevreleyen genomik DNA'ya özgün iki primer kullanılır. İki reaksiyon arasındaki bant profilleri farklılığı ilgili bölgede, retrotranspozon insersiyonu olup olmadığını gösterir. Yöntem primer tasarımı için dizi bilgisine gereksinim duyar (Flavell ve diğ., 1998).

SSAP, retrotranspozonlar için geliştirilen ilk marker tekniğidir. Restriksiyon enzim kesim bölgesine dayalı bir yöntemdir (Şekil 2.8.d). Bu nedenle çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi ("Amplified Fragment Length Polymorphism" - AFLP) tekniği ile benzerlik gösterir. Genomik DNA iki farklı enzim ile kesilir ve bir ucuna adaptör takılır. Adaptör diziye ve transpozona özgü iki primer kullanılarak PCR yapılır. PCR sonucunda örnekler arasındaki bant profilleri incelenerek polimorfizm belirlenir. Diğer retrotranspozon marker tekniklerine oranla daha masraflı ve zor bir tekniktir. Aynı zamanda LTR bölgesine özgü tasarlanacak olan primer için dizi bilgisine gereksinim duyar (Queen ve diğ., 2004).

RRAP, polimorfik DNA'nın rastgele çoğaltımı ("Random Amplification of Polymorphic DNA" - RAPD) marker tekniği ile LTR-Retrotranspozon marker tekniklerinin birleşimidir (Şekil 2.8.e). Teknikte bir RAPD primeri ve bir LTR primeri kullanılarak PCR yapılır. PCR ürünleri agaroz ya da poliakrilamid jelde ayrılır. IRAP tekniğinde olduğu gibi polimorfik bantlar belirlenir. Yöntemin uygulamadaki kolaylığına karşın analizi diğer tekniklere göre zordur. Gözlemlenen polimorfik bantların RAPD primerlerinden mi yoksa LTR primerinden mi kaynaklandığının belirlenmesi için ayrıca bir RAPD reaksiyonu yapılması gerekmektedir. Böylece retrotranspozon hareketlerinden kaynaklanan polimorfizm RAPD ve RRAP reaksiyonlarının karşılaştırılması ile belirlenir. RAPD primerleri için dizi bilgisine gereksinim duyulmamasına karşın LTR primeri için dizi bilgisi gereklidir (Aalami ve diğ., 2012).

IPBS, LTR-Retrotranspozonlarında korunmuş olan primer bağlanma bölgelerine (PBS) özgün primerler ile yapılan bir PCR tekniğidir (Şekil 2.8.f). Retrotranspozonların LTR bölgelerinde korunmuş diziler olmadığı için diğer marker tekniklerinde kullanılan LTR primerlerinin tasarımı oldukça zordur. Buna karşın LTR-Retrotranspozonların çoğu evrimsel süreçte korunmuş PBS bölgeleri içerirler. Bu bölge hücresel kaynaklı bir tRNA'nın 3' ucu ile komplementerdir. Böylece PCR sonucunda iki PBS bölgesi arasında kalan bölge çoğaltılır. PCR ürünleri diğer tekniklerde olduğu gibi jelde analiz edilir ve polimorfizm belirlenir. Yöntemin en büyük avantajı primer tasarımı için dizi bilgisine gereksinim duymamasıdır (Kalendar, 2011).

Retrotranspozonlar ile yapılan çalışmaların çoğu bu marker tekniklerini kullanarak akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi üzerinedir. Bununla birlikte stres koşullarında retrotranspozon aktivitelerinin incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır.

2.9. LTR-RETROTRANSPOZON TEMELLİ ÇALIŞMALAR

Transpozonlarla ilgili ilk çalışmalar Barbara McClintock tarafından mısırdaki Ac/Ds (Activator/Dissociation) elementlerinin belirlenmesi ile başlamıştır (McClintock, 1950). LTR-Retrotranspozonlarının ilk örnekleri ise sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) “copia-like” ve mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) “Ty1” olarak tanımlanmıştır (Montgomery ve Langley, 1983; Boeke ve diğ., 1988). Gün geçtikçe artan çalışmalarla, LTR-transpozonların canlı genomlarının büyük bir kısmını oluşturduğu ortaya çıkmıştır. Ardından LTR-Retrotranspozonlarının genomda neden oldukları insersiyonel polimorfizmleri belirleyen pek çok marker tekniği geliştirilmiş ve LTR-Retrotranspozonların genom evrimindeki rollerinin belirlenmesi ile türler arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

2.9.1. LTR-Retrotranspozon Temelli Evrimsel ve Filogenetik Çalışmalar

Kumar ve diğ. (1997) Ty1/copia grubunda yer alan retrotranspozonların genomik organizasyonlarını ve çeşitliliğini hem dikotil hem de monokotil bitkilerde araştırmışlardır. Çalışmada bitki materyali olarak patates (*Solanum tuberosum*), bakla (*Vicia faba*), *Vicia melanops*, *Vicia sativa*, arpa (*Hordeum vulgare*), çavdar (*Secale cereale*) ve soğan (*Allium cepa*) kullanılmıştır. Bitkiler Ty1/copia retrotranspozonlarının

RT domenleri dizi benzerlikleri bakımından karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir heterojenite olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Ty1/copia retrotranspozonlarının kopya sayısının da birkaç yüz kopyadan milyonlarca kopyalara kadar değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada farklı olarak *in situ* hibridizasyon tekniği ile retrotranspozonların, *V. faba*, *S. cereale*, ve *H. vulgare* bitkilerinde daha çok ökromatin bölgelere dağılım gösterdiği; bunun tersine *A. cepa* bitkisinde heterokromatin bölgelerde yoğunlaştığı gözlenmiştir.

Vicient ve diğ. (1999) *BARE1* retrotranspozonunun, arpa bitkisinin evrimindeki rolünü belirlemek için *BARE1* RT ve INT domenleri ile LTR bölgelerinin genomdaki kopya sayılarını farklı ploidi seviyelerindeki bitkilerde karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarla *BARE1* retrotranspozonunun arpa genomunda ortalama 13.7×10^3 tam kopya halinde bulunduğunu göstermişlerdir. Bu oranın arpa genomunun yaklaşık %2.9'u olduğunu, bununla birlikte solo-LTR dizileri ele alındığında bu oranın çok daha yüksek olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca *BARE1* kopya sayısının ploidi seviyesi artışı ile orantılı olarak arttığını belirtmişlerdir. Haploid genomda RT domeni kopya sayısının ploidi düzeyi farklı bitkilerde 4.5×10^3 ile 29.9×10^3 arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. İntegraz domeni kopya sayısının ise 4.3×10^3 ile 18.1×10^3 değerleri arasında olduğunu ve iki domenin (RT, INT) aynı bitkide farklı sayılarda bulunabileceğini göstermişlerdir. *BARE1* LTR dizilerinin kopya sayıları ise 69.9×10^3 - 407×10^3 arasında saptanmıştır. LTR dizilerinin çok kopya halinde bulunması sonucunda, *BARE1* retrotranspozonunun arpa genomunda daha çok solo-LTR dizileri olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kalendar ve diğ. (2000) farklı iklime sahip bölgelerde yetişen yabani arpalarda (*Hordeum spontaneum*) *BARE1* retrotranspozonunun insersiyon profilini ve kopya sayısını belirlemeye yönelik çalışmalar yapmışlardır. Özellikle kuru bir iklime sahip güney bölgelerinde *BARE1* kopya sayısında bir artış görüldüğünü bildirmişlerdir. Buna karşın homolog rekombinasyonlar sonucunda solo-LTR dizilerinde de artış olduğunu; böylece tam kopya halinde olan *BARE1* retrotranspozonlarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durumun retrotranspozon aktivitesi ile meydana gelen genom büyümesinin dengelenmesi için ortaya çıkan bir mekanizma olabileceğini önermişlerdir.

Shirasu ve diğ. (2000) genom büyümesi ile retrotranspozonlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için arpada *Rar1* lokusunda detaylı bir inceleme yapmışlardır. İncelenen dizi 66 kb uzunluğundaki bölge NCBI veri tabanına AF254799 numarası ile kaydedilmiştir. Bu bölgede 4 yeni LTR-Retrotranspozon (*Nikita*, *Sukkula*, *Sabrina* ve *BAGY-2*) ve *BARE1*'e ait bazı diziler tanımlamışlardır. Bu retrotranspozonların en az 15 integrasyon yaptıklarını ve pek çoğunun solo-LTR halinde bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle homolog rekombinasyonlar sonucunda retrotranspozon ara domenlerinin genomdan atılmasının arpada yaygın bir durum olduğunu bildirmişlerdir.

Vicient ve diğ. (2001b) veri tabanlarında bulunan EST ("Expressed Sequence Tag") dizileri ile bilinen retrotranspozon dizilerini karşılaştırarak, EST verilerinde bulunan transpozon miktarını belirlemişlerdir. Çalışmada pek çok retrotranspozon dizisinin EST verileri ile eşleştiği bulunmuştur. Bu farklı retrotranspozonların dikotil ya da monokotil bitkilerde dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir. Arpada *BAGY2* için 7; *BARE1* içinse 23 EST eşleşmesi elde etmişlerdir. Bununla birlikte "immunoblotting" çalışmaları ile *BARE1* GAG domeninin protein ürününü tespit ederek translasyonel aktivitesini göstermişlerdir.

Rodriguez ve diğ. (2006) Steptoe-Morex (S-M) "double haploid" arpa popülasyonunda SSAP marker tekniğini kullanarak analizler yapmışlardır. Altı SSAP primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda 98 polimorfik bant elde etmişlerdir. Bununla birlikte 81 tane SSAP lokusunun dominant karakterde ve 7 kromozoma dağılmış olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda retrotranspozon temelli SSAP tekniğinin, DNA parmak izi, biyoçeşitlilik ve filogenetik analizler gibi pek çok alanda kullanılabilecek bir teknik olduğunu bildirmişlerdir.

Alavi-Kia ve diğ. (2008) *Crocus* bitkisinin İran için endemik olan türlerinde filogenetik akrabalık ilişkilerini belirlemek için IRAP marker tekniğini kullanmışlardır. Çalışmada, arpada bulunan *BARE1*, *Sukkula* ve *Nikita* LTR-Retrotranspozonları için tasarlanan 7 farklı LTR primeri kullanılmıştır. Bu primerler 28 farklı kombinasyonda kullanılmış ve her reaksiyondan ortalama 65 PCR bandı elde edilmiştir. Bant polimorfizmine bakılarak popülasyon içindeki heterojenitenin (%55.5) popülasyonlar arası heterojeniteden (%44.5) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın en önemli sonucu ise, farklı

bitki türleri arasında aynı LTR-Retrotranspozon primerlerinin kullanılabileceğinin gösterilmesidir.

Bento ve diğ. (2008) IRAP, REMAP ve ISSR marker tekniklerini kullanarak buğday, pirinç ve çavdar bitkileri arasındaki retrotranspozon temelli çeşitliliği incelemişlerdir. Çalışmada daha önce arpada tanımlanmış olan *Nikita*, *Sukkula*, *Sabrina* ve *Stowaway* retrotranspozonlarına özgü primerler kullanılmıştır. Buğday ve pirincin karşılaştırmalı analizlerinde bant profil benzerliğinin %34 olduğunu bildirmişler ve bu bölgelerin iki bitkide korunmuş olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte buğdayda bulunup çavdarda bulunmayan polimorfik bir bandın dizi analizini gerçekleştirmişler ve bu bandın Ty1/copia grubunda yer alan *Claudia* ve *Barbara* retrotranspozonları ile benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde pirinçte bulunan; fakat çavdarda bulunmayan polimorfik bir bandın, indüklenebilir savunma sisteminde görev alan bir protein (hidroksiprolince zengin glikoproteinler) ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini dizi analizi ile saptamışlardır. Bu bulgular doğrultusunda, evrimsel süreçte retrotranspozonların sadece heterokromatin bölgelere değil aynı zamanda gen bakımından zengin olan bölgelere de girebileceğini belirtmişlerdir.

Saeidi ve diğ. (2008) İran'da bazı önemli bölgelerde yetişen yabancı tip *Aegilops tauschii* varyeteleri ve alt türlerindeki çeşitliliği IRAP marker tekniği kullanarak araştırmışlardır. Bu amaçla daha önce arpada tanımlanan bazı retrotranspozonlara özgü primer kombinasyonları kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre toplamda çoğaltılan 171 banttan 169 tanesinin polimorfik olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak farklı coğrafik koşullarda yetişen bitkilerde retrotranspozon aktivitelerinin farklı olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, IRAP marker tekniğinin bir takson içindeki genetik çeşitlilik ve akrabalığı belirlemek için uygun bir yöntem olmasına karşın taksonlar arasındaki analizler için yetersiz olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu alanda DNA dizi analizleri ya da kromozomlar üzerindeki marker bölgelerin daha kullanışlı olabileceğini önermişlerdir.

Carvalho ve diğ. (2010) IRAP ve REMAP tekniklerini kullanarak 48 farklı Portekiz buğday kültüründeki genetik varyasyonu incelemişlerdir. Çalışmada *BARE1*, *Sukkula* ve *Nikita* retrotranspozonlarına özgü 5 IRAP primeri ve mikrosatellit bölgeleri için 4

REMAP primeri kullanmışlar; IRAP analizlerinde ortalama 103 tanesi polimorfik olan 113 bant ve REMAP'ta 51 tanesi polimorfik olan 53 bant gözlemlemişlerdir. Her iki marker sisteminin de yüksek oranda polimorfik bant verdiğini belirterek elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda IRAP tekniğinin retrotranspozonlara bağlı olan genetik çeşitliliği belirlemede daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve diğ. (2010) Ty1/copia ve Ty3/gypsy retrotranspozonlarının RT domenlerinde korunmuş olan bölgeleri dejenere primerler kullanarak Japon kayısısından çoğaltmışlar ve dizi analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Dizi analizleri sonuçlarına göre Ty1/copia RT domenlerinin %32.3 ve Ty3/gypsy RT domenlerinin ise %27.5 tanesinin stop kodonu ya da çerçeve kayması mutasyonları taşıdığını bildirmişlerdir. Ayrıca Ty1/copia retrotranspozonlarının Ty3/gypsy grubuna girenlere oranla daha çok heterojenite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Japon kayısısında, UV ya da 2,4-D uygulamalarının her iki grupta da transkripsiyonel bir aktiviteye yol açmadığını belirtmişlerdir.

Maraklı ve diğ. (2012) IRAP marker tekniği kullanarak arpada aynı bitkinin kök ve yaprakları arasındaki *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonlarının polimorfizmine bakmışlardır. *BAGY2* retrotranspozonunun kök, yaprak ve embriyo arasında aynı IRAP bant profiline sahip olduğunu, bu nedenle organ gelişimi sırasında aktif olmayabileceğini bildirmişlerdir. Buna karşın *BARE1* IRAP PCR sonuçlarına göre embriyo ile kök arasında %45, embriyo ve yaprak arasında %34, kök ve yaprak arasında %50 polimorfizm olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen bu bulgulara dayanarak *BARE1* gibi arpada yaygın olarak bulunan retrotranspozonların farklı organlarda insersiyonel olarak aktivite farklılığı gösterebileceğini bildirmişlerdir.

Literatürde, retrotranspozonların genom evrimindeki rollerinin ve türler arası akrabalık ilişkilerinin, retrotranspozon temelli marker teknikleri ile belirlenmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte pek çok bitki türünde yeni retrotranspozonların tanımlanması ve bunların canlıdaki işlevlerinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Bugüne kadar tanımlanan pek çok retrotranspozonun inaktif durumda olması ve onların çeşitli stres faktörleri ile uyarılabileceği fikrinin ortaya atılması retrotranspozonlar için yeni bir çalışma alanının

ortaya çıkmasını sağlamıştır. Çeşitli kimyasal maddeler, tuz, kuraklık, yaralanma ve patojen enfeksiyonu gibi birçok stres faktörü altında retrotranspozon aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmalar arasında en dikkat çekenler, doku kültürü koşullarında retrotranspozonların aktivite değişikliklerinin incelenmesine yönelik çalışmalardır.

2.9.2. Çeşitli Stres Faktörleri ile Yapılan Çalışmalar

Hirochika (1993) doku kültürü koşullarında retrotranspozon aktivitelerinin arttığını göstermiş ve bu çalışma stres ve retrotranspozon aktivitesi değişiklikleri arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik öncü çalışmalardan biri olmuştur. Çalışmada *Tto1*, *Tto2*, *Tto3* ve *Tnt1* retrotranspozonlarının tütün protoplast kültüründeki transkripsiyon profili değişimleri incelenmiştir. Çalışılan retrotranspozonların RT domenleri PCR ile cDNA'dan çoğaltılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Tto1* kopya sayısının hem protoplast kültüründe hem de rejenere bitkilerde yaklaşık 10 kat arttığını bildirilmiştir. Bununla birlikte *Tto2* ve *Tnt1* kopya sayısında da düşük oranda artış olduğu belirtilmiştir.

Hirochika ve diğ. (1996) pirinç bitkisinde 15 yeni retrotranspozon ailesi (*Tos6-Tos20*) tanımlamışlar ve bu retrotranspozonların normal koşullarda inaktif olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın hücre süspansiyon kültürü koşullarında *Tos10*, *Tos17* ve *Tos19* retrotranspozonlarının aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiş ve aktivitesi en fazla artış gösterenin *Tos17* olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte *Tos17* retrotranspozonunun kopya sayısının kültür süresinin uzamasıyla da arttığını belirtmişlerdir. Kültürden rejenere olan tüm bitkilerde de bu kopya sayısı artışının mevcut olduğunu göstermişlerdir. *Tos17* transkriptinin sadece doku kültürü koşullarında saptanabilmiş olması nedeni ile normal koşullarda bu retrotranspozon aktivitesinin transkripsiyonel seviyede düzenleniyor olabileceğini öngörmüşlerdir. Elde edilen sonuçlara göre *Tos17* aktivitesinin doku kültürü ile indüklenen mutasyonlar sonucu olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu durumun genlerin işlevsel analizlerinde ya da insersiyonel mutasyon çalışmalarında kullanılabilecek iyi bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir.

Hirochika ve diğ. (2000) tütün *Tto1* retrotranspozonunun *Arabidopsis* bitkisine transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Transformasyon sırasında kullanılan marker genin (*HPT*) kopya sayısının transgenik bitkilerde bir ya da iki kopya iken *Tto1*

retrotranspozonunun 10-15 kopya halinde bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara göre *Tto1* retrotranspozonunun transgenik *Arabidopsis* hatlarında aktif olarak transformasyon yapabildiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, bir aşamadan sonra *Tto1* kopya sayısının sabit kaldığını ve transkript miktarının azaldığını gözlemlemişlerdir. *Tto1* retrotranspozonunda görülen bu sessizleşmenin DNA metilasyonu ile ilgili olup olmadığını ortaya çıkarmak için *Tto1* taşıyan transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde DNA metilasyonunu azaltan ikinci bir mutasyon (*ddm1* mutasyonu) yapmışlardır. Homozigot *ddm1* mutasyonu taşıyan bitkilerde *Tto1* retrotranspozonunun aktivitesini incelemişler ve hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede aktif olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlar doğrultusunda *Tto1* retrotranspozonunun aktivitesinin DNA metilasyonu ile düzenlendiğini bildirmişlerdir.

Ikeda ve diğ. (2001) bir bitki patojeni olan *Magnaporthe grisea* fungusunda tanımlanan Ty3/gypsy retrotranspozonu *MAGGY*'nin çeşitli stres koşulları altındaki aktivitesini araştırmışlardır. Stres faktörleri olarak; ısı şoku, bakır sülfat uygulaması, bazı antifungal maddeler, UV uygulaması ve oksidatif stres kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *MAGGY* retrotranspozonunun sadece ısı şoku, bakır sülfat ve oksidatif stres koşullarında aktivite artışı gösterdiği bildirilmiştir.

Liu ve diğ. (2004) pirinçte tanımlanan *Tos17* retrotranspozonunun, üç pirinç kültür varyetesinde transkripsiyonel transpozisyon aktivitesini incelemişlerdir. Bu amaçla kallus, rejenere bitkiler ve normal tohum bitkileri kullanılmıştır. Bununla birlikte 5-azasitidinle muamele edilen bitkilerde *Tos17* retrotranspozondaki CG metilasyon profilini incelemişlerdir. Çalışılan kültürlerin sadece birinde *Tos17*'nin bir süre transkripsiyonel olarak aktif olduğunu ve bu aktivasyonun rejenerasyon başlamadan hemen önce baskılandığını bildirmişlerdir. 5-azasitidin uygulaması ile iki kültürde *Tos17* CG bölgelerinin metilasyon durumunun azaldığını bildirmişler; buna karşın herhangi bir aktivite artışı bulamamışlardır.

Muhammad ve Othman (2005) RAPD ve IRAP marker tekniklerini kullanarak muzda somaklonal varyasyon kaynaklarını araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda hem RAPD hem de IRAP marker teknikleri ile klonlar arasında polimorfizm olduğunu

gözlemlemişlerdir. Gözlemlenen bu polimorfizmlere dayanarak, retrotranspozon hareketlerinin bir çeşitlilik kaynağı olduğunu ve doku kültürü koşullarında meydana gelen somaklonal varyasyonların tespiti için birden fazla marker tekniğinin kullanılması gerektiğini önermişlerdir.

Tapia ve diğ. (2005) *TCL1* retrotranspozonunun *Lycopersicon chilense* bitkisindeki aktivitesini stres koşullarında incelemişlerdir. Bu retrotranspozonun normal koşullarda sadece kökte transkripsiyonunun yapıldığını gözlemlemişler ve dokuya özgü bir kontrol mekanizması olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte *TCL1* aktivitesinin yaralanma, protoplast oluşumu ve tuz stresi koşullarında arttığını buna karşın kuraklık stresi ile değişmediğini göstermişlerdir.

Li ve diğ. (2007) yabani bir arpa türünün (*Hordeum brevisubulatum*) olgunlaşmamış çiçek durumundan elde ettikleri kallus ve sürgünlerdeki genetik ve epigenetik değişiklikleri AFLP, SSAP ve MSAP marker tekniklerini kullanarak incelemişlerdir. Tek bir bitkiden elde ettikleri kallusların ve 44 rejenerantın AFLP sonuçlarında, toplamda 793 banttan 74 tanesinin polimorfik olduğunu ve genetik varyasyonun %9.3 olduğunu gözlemlemişlerdir. SSAP analizleri sonuçlarına göre, 151 tanesi polimorfik olan 768 bant elde edildiğini ve genetik varyasyon oranının %19.7 olduğunu bildirmişlerdir. MSAP analizleri sonuçları ile doku kültürü koşullarında sitozin metilasyonu değişimi olduğunu bildirmişlerdir. MSAP analizlerinden elde edilen bazı polimorfik bantların dizi analizleri ile polimorfizmin hem protein kodlayan genlerde hem de transpozon/retrotranspozonlarda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Bonchev ve diğ. (2010) etil metansülfonat (EMS) ile elde edilen hekzaploid buğday ve çavdar mutantlarında, *BARE1* ve *WIS2-1A* retrotranspozonlarının transkripsiyonel aktivite değişikliklerini ve sebep oldukları insersiyonel polimorfizmleri incelemişlerdir. Polimorfizmin belirlenmesi için SSAP, IRAP ve REMAP marker tekniklerini kullanmışlardır. Retrotranspozonların transkripsiyon aktivitesinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek içinse INT, RT ve 5'-LTR bölgeleri için RT-PCR analizi yapmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgularla, EMS'nin retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizme sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte

mutant bitkilerde retrotranspozonun transkripsiyonel aktivitesinde de artış olduğunu bildirmişlerdir.

Campbel ve diğ. (2011) IRAP ve ISSR marker tekniklerini kullanarak 30 günlük arpa kalluslarından rejenere olan sürgünlerdeki *BARE1* polimorfizmini incelemişlerdir. Çalışma 147 rejenerant ve parental kontrolleri ile yapılmıştır. ISSR analizleri sonucunda 29 tanesi polimorfik olan 218 bant elde etmişlerdir. Bu 29 polimorfik banttan 12 tanesinin kontrol bitkilerde olmayan yeni bantlar olduğunu bildirmişlerdir. IRAP analizleri sonucunda ise 15 tanesi polimorfik olan 121 bant elde etmişler ve bu 15 banttan 9 tanesinin kontrol bitkilerinde bulunmadığını bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre doku kültürü koşullarının arpa sürgünlerinde polimorfizme sebep olduğunu ve IRAP, ISSR gibi marker tekniklerinin bu polimorfizmi belirlemek için uygun bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Evrensel ve diğ. (2011) 30, 45 ve 60 günlük arpa kalluslarında *BARE1* retrotranspozonunun sebep olduğu polimorfizmi IRAP marker yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada *BARE1* LTR dizilerine özgü olan 10 farklı primer ile 25 kombinasyon yapılarak polimorfizm oranları hesaplanmıştır. Bu 25 primer kombinasyonundan 14 tanesinin polimorfizm hesaplanması için yeterli bantları verdiği belirtilmiştir. Tüm reaksiyonların sonucunda 66'sı polimorfik olan 197 PCR bandı elde etmişlerdir. Primer kombinasyonları tek tek karşılaştırıldığında polimorfik bant sayısının %0-53 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Örneklerdeki benzerlik indeksi analizleri sonucunda ise en büyük farklılığın (%25) embriyo ve 45 günlük kalluslar arasında olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda doku kültürü süresinin arpa kalluslarında değişen oranlarda *BARE1* insersiyon polimorfizmine yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Bayram ve diğ. (2012) tek bir embriyodan köken alan 30, 60 ve 90 günlük arpa kalluslarında *Nikita* retrotranspozonu polimorfizmini iki farklı primer kullanarak IRAP tekniği ile araştırmışlardır. Çalışma 3 tekrarlı halde yapılmıştır. Her iki primerin IRAP sonuçlarında 20 homomorfik bant elde etmişlerdir. Bununla birlikte farklı embriyodan köken alan iki tane 90 günlük kallusta bazı polimorfik bantların varlığı gösterilmiştir.

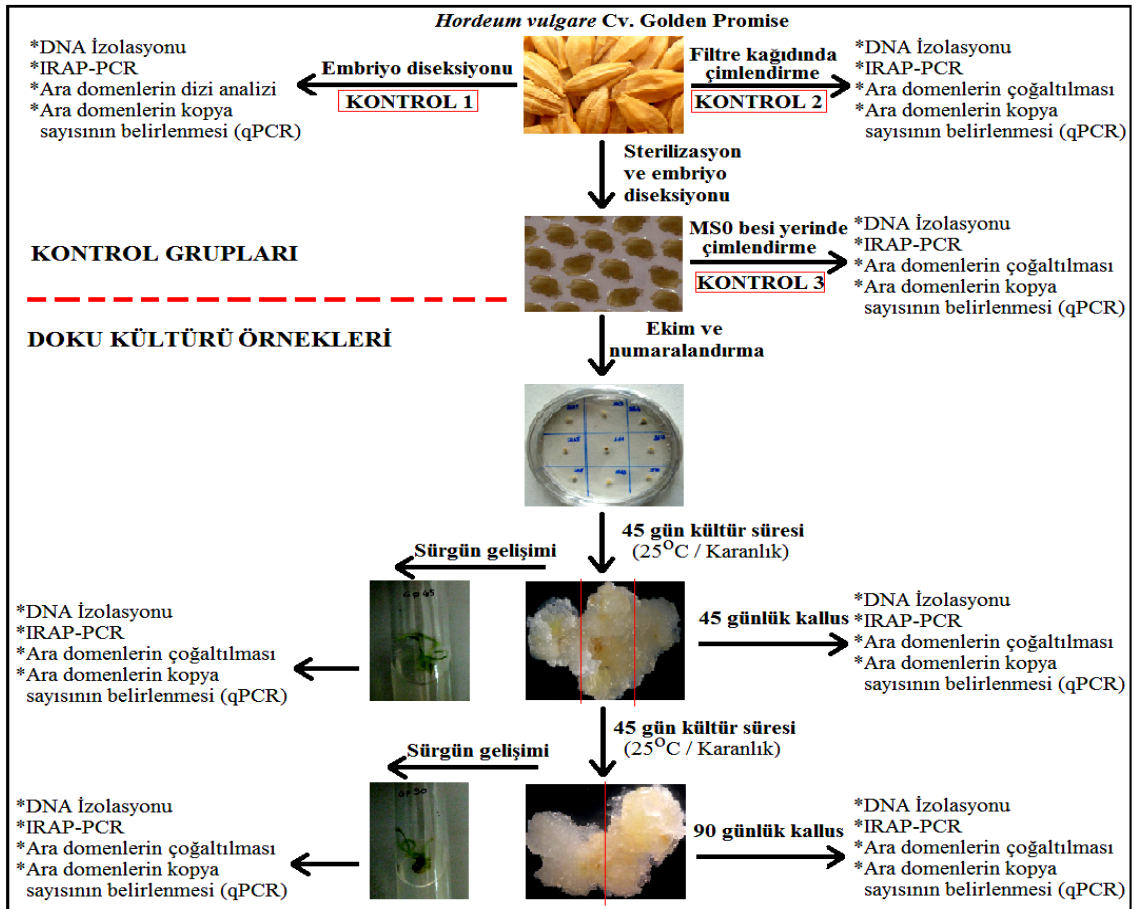
Bu bantların farklı olması nedeni ile doku kültürü koşullarının bireyler arasında farklı etkiler yaptığını savunmuşlardır.

Hamat-Mecbur ve diğ. (2012) 10 ve 20 gün süre ile iki farklı konsantrasyonda (250 ve 500 µg/ml) epirubicin antibiyotiği uygulanan arpa bitkisinde *BAGY2*, *BARE1* ve *Sukkula* retrotranspozonlarının sebep olduğu polimorfizmi IRAP marker yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlardaki epirubicin uygulamasının *BAGY2* ve *Sukkula* retrotranspozonuna bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Buna karşın 500 µg/ml konsantrasyonda uygulanan epirubicinin *BARE1*'de polimorfik bantlara neden olduğunu belirtmişlerdir.

Retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizmleri belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma olmasına karşın, stres koşullarındaki retrotranspozon aktiviteleri değişimi üzerine çalışmalar oldukça azdır. Özellikle pek çok uygulama alanında rutin olarak kullanılan bir yöntem olan doku kültürünün, neden olduğu stres koşulları ile retrotranspozon aktivitelerini nasıl etkilediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında farklı kültür sürelerine sahip arpa kallusları ve sürgünlerdeki *BAGY2* retrotranspozonunun sebep olduğu insersiyonel polimorfizm, IRAP marker tekniği kullanılarak incelendi. Bu amaçla tek bir arpa embriyosundan elde edilen 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünler kullanıldı. Bununla birlikte kullanılan örneklerdeki *BAGY2* ara domenlerinin (GAG, PR, RT, RH ve INT) kopya sayısındaki farklılıklar Real-time Quantitative PCR (qPCR) yöntemi ile belirlendi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında arpa (*Hordeum vulgare* L. Cv. Golden Promise) kallus kültüründe ve kültürden rejenere olan sürgünlerde meydana gelen *BAGY2* retrotranspozonunun hareketi “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” (IRAP) marker tekniği kullanılarak araştırıldı. Bununla birlikte genomda *BAGY2*’ye ait ara domenlerin (GAG, PR, RT, RH, INT) kopya sayısındaki değişiklikler qPCR ile belirlendi. Çalışmada bitki materyali olarak arpanın Golden Promise varyetesi kullanıldı. Tohumlar ABD Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Servisi (“United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service”) tarafından sağlandı. Şekil 3.1’de çalışmanın genel akışı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının genel akışı

3.1. BİTKİ MATERYALİNİN YETİŞTİRİLMESİ

Çalışmada deney grubu olarak arpa olgun embriyolarından elde edilen 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünler kullanıldı. Bununla birlikte kültüre alınmamış olgun embriyo (Kontrol 1), filtre kağıdında çimlendirilmiş 10 günlük fidelerin yaprakları (Kontrol 2) ve besi yerinde çimlendirilmiş 10 günlük fidelerin yaprakları (Kontrol 3) olmak üzere üç farklı kontrol grubu kullanıldı. Tüm kontroller 4 tekrarlı olarak yapıldı.

Arpa olgun embriyolarından kallus gelişimini teşvik etmek için 4 mg/L Dicamba (3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asit) içeren Murashige ve Skoog (MS) besi yeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). Kallustan sürgün rejenerasyonunu teşvik etmek için ise 0.5 mg/L zeatin [6-(4-Hidroksi-3-metilbüt-2-enilamino)pürin] içeren MS besi yerleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan besi yerlerinin hazırlanışı Ek 1’de verilmiştir. Doku kültürü çalışmasında tüm işlemler steril kabin (Gelair Laminar Flow, TC48) içerisinde gerçekleştirildi.

Kallus kültürünün kurulması için olgun arpa tohumları %20’lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika süre ile steril edildi. Ardından 3 defa 10’ar dakika steril dH₂O ile yıkanarak çamaşır suyu uzaklaştırıldı. Tohumlar testalarından ayrıldıktan sonra steril bir bistüri ile embriyoları çıkarıldı. Daha sonra embriyolar saf etanol içerisinde 30 saniye bekletildi ve steril dH₂O ile yıkanarak etanolün uzaklaştırılması sağlandı. Ardından embriyolar steril kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Embriyonun çimlenmesini önlemek için embriyonik kök ve sürgün kısımları zedelenerek, Dicamba’lı (4 mg/L) MS besi yerine aktarıldı. Her bir embriyoya numara verildi ve kallus oluşumu için petriler alüminyum folyo ile kapatılarak, bitki büyütme kabininde (Sanyo, MLR-352H) 25°C’de karanlıkta 45 gün süre ile kültüre alındı. Kallusların besi yerleri 20 gün ara ile yenilendi.

45 gün sonunda her bir kallus üç eşit parçaya ayrıldı ve her parçaya köken aldıkları embriyoya ait olan numara verildi. Parçalardan biri DNA izolasyonu için kullanıldı. Diğer bir parça sürgün rejenerasyonu için zeatinli (0.5 mg/L) MS besi yerine aktarıldı ve bitki büyütme kabininde 25°C’de, 16 saat aydınlık (1500 lux)/8 saat karanlık

periyodunda 30 gün süre ile kültüre alındı. Süre sonunda gelişen sürgünler DNA izolasyonu için kullanıldı. Kallusun üçüncü parçası ise 90 günlük kallus eldesi için tekrar Dicamba'lı (4 mg/L) MS besiyeri yerinde aktarıldı ve bitki büyütme kabini içinde 25°C'de karanlıkta 45 gün süre ile kültüre alındı. 45 günün sonunda gelişen 90 günlük kalluslar iki parçaya ayrıldı ve tekrar her parçaya köken aldıkları embriyonun numarası verildi. Parçalardan biri DNA izolasyonu için diğeri ise sürgün gelişimi için yukarıda belirtilen koşullarda kültüre alındı. 30 gün sonunda gelişen sürgünden DNA izolasyonu yapıldı. Bu şekilde, tek bir embriyodan gelişen 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünlerden oluşan bir deney grubu elde edildi. Tüm moleküler çalışmalar bu şekilde elde edilmiş 3 grup ile tekrarlandı.

3.2. DNA İZOLASYONU

Çalışmada DNA izolasyonu için TRI Reagent® (Sigma, T9424) kullanıldı. İzolasyon sırasında nükleaz içermeyen steril plastik malzemeler (mikrosantrifüj tüpleri, pipet uçları) kullanıldı. Örneklerin homojenizasyonunda kullanılan porselen havanların sterilizasyonu için %0.1 oranında DEPC (dietilpirokarbonat) içeren dH₂O kullanıldı. Havanlar DEPC'li suda 37°C'de bir gece bekletildi. Daha sonra 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile otoklavlandı ve 250°C'deki pastör fırınında 5 saat bekletildi. İzolasyon firmanın önerdiği protokol değiştirilerek aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- a) Bitki materyalleri sıvı azot ile steril porselen havan içerisinde parçalandı ve toz haline gelen dokuların üzerine TRI Reagent® (50 mg doku için 1000 µl) eklendi.
- b) Homojen hale gelen örnekler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- c) Örneklerin üzerine, kullanılan TRI Reagent® miktarıyla orantılı olarak 0.2 hacim (v/v) kloroform eklendi ve tüpler birkaç defa alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- d) Tüpler 12000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada örnekler üç faza ayrıldı. Üst faz yeni bir tüpe alındı ve RNA ile yapılacak olan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Diğer iki faz ise protein ve DNA izolasyonu için kullanıldı.

- e) Tüplerde kalan iki fazın üzerine 0.3 hacim (v/v) %100 etil alkol eklendi ve tüpler birkaç defa alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- f) Süre sonunda tüpler 2000 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir tüpe alınarak protein ile yapılacak olan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Çökeltiler üzerinden DNA izolasyonuna devam edildi.
- g) Çökeltiler, %10'luk etil alkol içinde çözündürülmüş olan trisodyum sitrat solüsyonu (0.1 M) ile 3 defa yıkandı. Her yıkamada tüpler iyice karıştırılarak çökeltilerin solüsyon içinde homojen olarak dağılması sağlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- h) Her yıkama sonrasında tüpler 2000 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı.
- i) Son yıkamanın ardından çökeltiler %75'lik (v/v) etil alkol ile oda sıcaklığında 15 dakika süre ile yıkandı ve 2000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
- j) Üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökeltiler oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika süre ile kurutuldu.
- k) Çökeltilerin üzerine 100 µl nükleaz içermeyen steril dH₂O eklendi ve tüpler karıştırılarak çökeltilerin su içinde homojen olarak dağılması sağlandı.
- l) Tüpler oda sıcaklığında bu şekilde bir gece boyunca bekletilerek çökelti içinde bulunan DNA'ların suda çözünmesi sağlandı.
- m) Süre sonunda tüpler 2000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve DNA içeren üst sıvı yeni bir tüpe alındı.
- n) DNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jelde belirlendi ve miktarı spektrofotometrede (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c) ölçülerek tüm örneklerin konsantrasyonları 10 ng/µl'ye ayarlandı.

3.3. AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZİ

İzole edilen DNA'ların kalitesi 1X TAE (Tris-EDTA-Asetat) tamponu ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Elektroforezde kullanılan tamponların hazırlanışı Ek 2'de verilmiştir. 1 g agaroz (Sigma, A9539) 100 ml 1X TAE içinde mikrodalga fırında eritildi ve 55-60°C sıcaklığa ulaşana kadar oda sıcaklığında bekletildi. Ardından, 10 mg/ml stok etidyum bromür (Sigma, E1510) solüsyonundan 5 µl eklendi ve karıştırıldı.

Jel yatay elektroforez kasetine döküldü ve bir tarak yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında polimerize olması beklendi. Polimerize olan jel, tarak çıkarıldıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Her DNA örneğinin 2 µl'si 1 µl 6X yükleme tamponu ve 3 µl dH₂O ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforezde marker olarak GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0311) kullanıldı. DNA örnekleri 100 voltta 30 dakika süre ile yürütüldü ve UV tablasında görüntülenerek fotoğrafı çekildi.

3.4. IRAP TEKNİĞİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ

Çalışmada *BAGY2* retrotranspozonunun farklı yaşlardaki arpa kallusları ve sürgünlerinde neden olduğu polimorfizmi belirlemek için IRAP marker tekniği kullanıldı. Bu amaçla Vicient ve diğ., (2001a) tarafından tasarlanan *BAGY2* LTR dizilerine özgün primerler kullanıldı (Tablo 3.1, Primer no; 1 ve 2).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan primerlerin dizisi

No	Adı	Dizisi (5'→3')	Hedef Büyükliği (bp)	Kullanım amacı
1	E0521-F	TCGAAAGGTCTATGATTGATCCC	Değişken	IRAP-PCR
2	E0520-R	CATGAAAGCATGATGCAAAATGG		
3	GAG-F	GGATCATCACATCCAGACTTGCATC	925	Klonlama (GAG)
4	GAG-R	TAACATGCCCGTCTATGTCTTCGG		
5*	PR-F	GTGATATGGGTGCTAGTGTTAGTGC	261	Klonlama (PR)
6	PR-R	TGACAGTGTTGAGAAAGGGTCTGC		
7	RT-F	GGAAGCAGGAATCATTTATCCTGTTGCTCA	702	Klonlama (RT)
8	RT-R	AGAAACCAGCATGACCTAGGAAAC		
9	RH-F	TGCGGCGCTAGTGATTATGCTGTT	322	Klonlama (RH)
10	RH-R	GGTTATCAGCACCCCTTCGGTCAA		
11	INT-F	AAGCCTACAGAGGACACCATGCTA	960	Klonlama (INT)
12	INT-R	CACCGGAACGATATACTTCCTCGACA		
13	ENV-F	CCAAGGTCTATGGGACTTGAACC	385	Klonlama (ENV)
14	ENV-R	CAAGGGGATTGCCCATACCAATGC		
15	GAG2-F	TCGGCTTTCTCATGAAGATCGTACC	100	qPCR (GAG)
16	GAG2-R	GATTCTTTCCAATAAATTCCACTTGTGGTC		
17	PR2-R	GCGTAATAGTGACATCAATGGGTTT	105	qPCR (PR)
18	RT2-F	CCGTTTACGGTTCTTCCTTTGACG	102	qPCR (RT)
19	RT2-R	AGTGGCACTTCTCCCAGTTCAGGA		
20	RH2-F	GAAACTATGCCACTACGGAGAAGG	109	qPCR (RH)
21	RH2-R	GCAGCATGATCAGAGTGAATAATGACC		
22	INT2-F	TGGCGGTTACACTTCATTCATGG	108	qPCR (INT)
23	INT2-R	TCCACTTGACCACTAGACTGAGGA		
24	Actin-F	GGCACACTGGTGTCATGGT	90	qPCR (Actin)
25	Actin-R	GCGCCTCATCACCAACATA		
26	pJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Değişken	Koloni PCR
27	pJET1.2-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG		

*Hem klonlama hem de pPCR analizlerinde kullanılmıştır.

IRAP-PCR birbirinden bağımsız üç grup doku kültürü örneği ile yapıldı. Her grup tek bir embriyodan köken alan 45 ve 90 günlük kalluslardan ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünlerden oluşmaktadır. Bununla birlikte bireyler arasında doğal olarak meydana gelen *BAGY2* polimorfizmi olup olmadığını belirlemek için 3 farklı kontrol grubu kullanıldı. Her bir kontrol 4 farklı bireyden oluşmaktadır. PCR, SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Takara, RR350A) ile firmanın önerdiği protokol değiştirilerek kuruldu. Tablo 3.2’de verilen PCR bileşenleri 200 µl’lik ince cidarlı PCR tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyon Tablo 3.3’te verilen koşullarda gerçekleştirildi. PCR sonrasında ürünler, %8’lik (v/v) poliakrilamit jelde (29:1/Akrilamit:Bisakrilamit) ayrılarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. IRAP-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşen adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyon
2X Sapphire enzim karışımı	10	1 X/µl
dNTP karışımı (10 mM/µl)	0.5	0.25 mM/µl
Primer F (10 nmol/µl)	2	1 nmol/µl
Primer R (10 nmol/µl)	2	1 nmol/µl
Kalıp (10 ng/µl)	2	1 ng/µl
dH ₂ O	3.5	-
Toplam	20	-

Tablo 3.3. IRAP-PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	3 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	
Bağlanma	52	20 sn.	30
Uzama	72	2 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

3.5. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ

IRAP-PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde poliakrilamit jel elektroforezi (“Polyacrylamide Gel Electrophoresis” - PAGE) tekniği kullanıldı. Jelde kullanılan solüsyon ve tamponların hazırlanışı Ek 2’de verilmiştir. %8’lik (v/v) poliakrilamit jel hazırlamak için Tablo 3.4’te verilen bileşenler karıştırılarak ultrasonik su banyosunda 1 dakika bekletildi. Ardından sıvı haldeki jel karışımı 16x16x0.1 cm (genişlik x yükseklik x kalınlık) boyutlarındaki dikey elektroforez kasetine döküldü. Uygun bir tarak yerleştirildi ve jelin polimerize olması için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi.

Tablo 3.4. Poliakrilamit jel bileşenleri

Bileşenin adı	Miktarı
Akrilamit:bisakrilamit 29:1 (%40)	10 ml
5X Tris-Borikasıit-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 1X TBE tamponu ile yıkandı. Jel kaseti dikey elektroforez tankına (Bio-Rad, 165-1802) yerleştirildi ve tank 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuğa 15 µl PCR ürünü yüklendi. Jelde marker olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0322) kullanıldı. Jel 200 voltta 5 saat yürütüldükten sonra 3X GelRed solüsyonu (Biotium, 41003) içinde 30 dakika süre ile boyandı ve UV ışıktaki görüntülenerek fotoğrafı çekildi. Elde edilen bant profili değerlendirilerek örnekler arasındaki polimorfizm hesaplandı.

3.6. POLİMORFİZMİN HESAPLANMASI

IRAP-PCR sonucuna göre örnekler arasındaki polimorfizmi hesaplamak için Jaccard Benzerlik Katsayısı kullanıldı. Bu amaçla jelde belirgin olarak görülen monomorfik ve polimorfik bantlar sayıldı. Elde edilen sonuçlara Jaccard Benzerlik Katsayısı formülü uygulanarak (Formül no: 3.1) örnekler arasındaki % benzerlik oranları hesaplandı.

(3.1)

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

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

3.7. BAGY2 ARA DOMENLERİNİN ANALİZİ

Bu tez çalışmasında BAGY2 retrotranspozonunun doku kültürü koşullarında sebep olduğu polimorfizme ek olarak ara domenlerin dizi analizleri de gerçekleştirildi. Bu amaçla her domene özgü primerler tasarlandı ve domenler PCR ile çoğaltıldı. Bununla birlikte qPCR ile tüm örneklerdeki domenlerin kopya sayıları belirlendi.

3.7.1. BAGY2 Ara Domenleri İçin Primer Tasarımı

BAGY2 retrotranspozonuna ait ara domenlerin PCR ile çoğaltılması için her domene özgün primerler tasarlandı. Primer tasarımında kullanılacak olan referans nükleotit dizisinin elde edilmesi amacı ile “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) ve “Triticeae Repeat Sequence” (TREP) veri tabanlarında BAGY2 retrotranspozonuna ait diziler tarandı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats>). Bulunan diziler LTRharvester programı ile analiz edilerek retrotranspozon özellikleri belirlendi.

Veri tabanlarından elde edilen iki dizi (TREP3162 ve NCBI AF254799.1) ve BAGY2 domenlerinin protein dizileri tblastn ile karşılaştırılarak dizilerdeki domenlerin yerleri belirlendi. BAGY2 domenlerinin protein dizileri Gypsy veri tabanından (GyDB) elde edildi. Seçilen diziler arasından protein dizileri ile en yüksek benzerliği gösteren dizi primer tasarımı için kullanıldı. Primer tasarımı “IDT primer quest” ile yapıldı (Tablo 3.1).

3.7.2. BAGY2 Ara Domenlerinin PCR İle Çoğaltılması

BAGY2 retrotranspozonuna ait ara domenlerin dizi analizi gerçekleştirileceği için PCR sırasında “proof reading” aktivitesi olan Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F-530S) enzimi kullanıldı. Her domen için kullanılan primerlerin dizisi Tablo 3.1’de verilmiştir. PCR bileşenleri Tablo 3.5’te verildiği oranlarda 200 µl’lik tüplerde karıştırıldı ve reaksiyon Tablo 3.6’da verilen koşullarda gerçekleştirildi. Reaksiyonun ardından PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde analiz edildi.

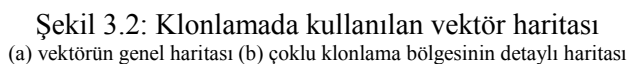
Tablo 3.5. Ara domenlerin çoğaltılması için kullanılan PCR bileşenleri

Bileşen adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyon
5X reaksiyon tamponu	4	1 X/µl
MgCl ₂ (15 mM)	2	1.5 mM
dNTP karışımı (10 mM/µl)	0.5	0.25 mM/µl
Primer F (10 nmol/µl)	1	0.5 nmol/µl
Primer R (10 nmol/µl)	1	0.5 nmol/µl
Kalıp (10 ng/µl)	2	1 ng/µl
Enzim (2U/ µl)	0.2	0.01 U/ µl
dH ₂ O	9.3	-
Toplam	20	-

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	30 sn.	1
Denatürasyon	98	10 sn.	
Bağlanma	53	20 sn.	30
Uzama	72	20 sn.	
Son uzama	72	5 dk.	1

BAGY2'ye ait tüm ara domenler (GAG, PR, RT, RH, INT ve ENV) dizileme çalışması için klonlandı. Dizi analizi her domen için sadece embriyodan (Kontrol 1) yapıldı. Bu amaçla embriyodan izole edilen DNA ile çoğaltılan domenlere ait PCR ürünleri agaroz jelden geri kazanıldı. PCR ürünlerinin jelden saflaştırılması agaroz jel izolasyon kiti (Roche, 11696505001) ile firmanın önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Jelden geri kazanılan PCR ürünlerinin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Ardından ürünler klonlama işlemi için kullanıldı. Klonlama, CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, K1231) ile yapıldı. Transformasyon için *Escherichia coli* (*E. coli*) JM 107 bakteri ırkı kullanıldı. Çalışmada kullanılan bakteri ırkı İstanbul Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'ndan temin edildi.

BAGY2'ye ait her domenin pJET1.2/blunt vektorune (ekil 3.2) ayrı ayrı ligasyonu gerçekleştirildi. Bununla birlikte reaksiyon sırasında kontaminasyon olup olmadığını test etmek için insert içermeyen vektor ile bir negatif kontrol reaksiyonu kuruldu.



Klonlama çalışmasında kullanılan vektör küt uçlu DNA parçalarının ligasyonu için uygundur. Bu nedenle klonlama öncesinde PCR ürünlerine küt uç oluşturma “blunting” reaksiyonu uygulandı. Reaksiyon, Tablo 3.7’de verilen oranlarda 200 µl’lik PCR tüplerinde kuruldu. Tüpler 70°C’de 5 dakika inkübe edildi ve ardından 2 dakika buz üzerinde soğutulularak reaksiyon durduruldu.

Tablo 3.7: Blunting reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı	Son konsantrasyon
2X reaksiyon tamponu	10 µl	1X
PCR ürünü (75 ng/µl)	2 µl	7.5 (ng/µl)
dH ₂ O	5 µl	-
Blunting Enzim	1 µl	-
Toplam	18 µl	-

Blunting reaksiyonunun ardından tüplere 1 µl pJET1.2/blunt vektör (50 ng/µl) ve 1 µl T4 DNA ligaz (5 U/µl) eklendi. Ligasyon, 22°C’de 30 dakika süre ile gerçekleştirildi. Ligasyonun ardından plazmidlerin *E. coli* JM107 bakteri ırkına transformasyonu gerçekleştirildi.

3.7.3.2. Kompetan (yeterli) hücrelerin hazırlanması

Transformasyon işlemi öncesinde *E. coli* JM107 bakteri ırkı CaCl₂ yöntemi değiştirilerek kompetan hale getirildi (Cohen ve diğ., 1972). Kompetan hücrelerin hazırlanması ve transformasyonu sırasında kullanılan tüm besi yeri ve tamponların içerikleri Ek 3’de verilmiştir. -80°C’de saklanan bakteri stoğundan tek koloni elde etmek için SOB agar besi yerine ekim yapıldı ve petriler 16 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tek bir koloni steril bir öze yardımı ile alındı ve 100 ml SOB broth besi yerine ekildi. Kültür 37°C sıcaklıkta 150 rpm’de inkübe edildi ve kültürdeki hücre yoğunluğu her saat 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Hücre yoğunluğu 0.5 optik densiteye (OD) ulaştığında inkübasyon sonlandırıldı ve hücreler aşağıdaki işlemler uygulanarak kompetan hale getirildi.

- Kültürden 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüplerine alındı ve hücreler 9000 g’de +4°C’de 5 dak. santifüj edilerek çöktürüldü.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 1 dak. kurutuldu.
- Bakteri çökeltisi üzerine 500 µl soğuk MgCl₂ (100 mM) eklenerek karıştırıldı ve tüpler buzda 10 dak. bekletildi.

- d) Tüpler, 9000 g'de +4°C'de 5 dak. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- e) Bakteri çökeltisi üzerine 500 µl soğuk CaCl₂ (100 mM) eklenerek karıştırıldı ve tüpler 30 dak. buzda inkübe edildi.
- f) Süre sonunda tüpler 9000 g'de +4°C'de 5 dak. santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- g) Ardından hücre çökeltileri üzerine 50 µl soğuk CaCl₂ (100 mM) eklendi ve hücreler hemen transformasyon için kullanıldı.

3.7.3.3. Transformasyon

Kompetan hale getirilen *E. coli* JM107 hücre ırkı BAGY2 ara domenlerinin transformasyonu için kullanıldı. Bununla birlikte kontaminasyon olup olmadığını test etmek için herhangi bir insert içermeyen plazmit ile bir negatif kontrol reaksiyonu kuruldu. Transformasyon aşağıdaki işlemler takip edilerek gerçekleştirildi.

- a) 50 µl kompetan *E. coli* hücreleri üzerine 5 µl soğuk ligasyon ürünü eklendi ve tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 30 dakika süre ile inkübe edildi.
- b) Süre sonunda tüpler 42°C'deki su banyosunda 90 sn. bekletildi ve ardından hemen buz üzerine alınarak ve 2 dakika süre ile soğutuldu.
- c) Tüplere antibiyotik içermeyen SOC broth besi yerinden 1 ml eklendi ve yatık şekilde 37°C'de 150 rpm'de 45 dakika inkübe edildi.
- d) İnkübasyonun ardından tüpler 5 dakika 10000 g'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri çökeltisi 200 µl SOC broth içinde süspanse edildi.
- e) Hücre süspansiyonunun tamamı ampicilin (100 µg/ml) içeren SOB agar besi yerine steril L baget ile yayıldı.
- f) Petriler oda sıcaklığında 20 dakika düz olarak bekletildi ve daha sonra ters çevrilerek 37°C'de 16 saat inkübe edildi.
- g) Süre bitiminde üreyen kolonilerin rekombinant olup olmadıkları koloni PCR ile belirlendi.

3.7.3.4. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi

Transformasyonun ardından üreyen kolonilerin rekombinant olup olmadıkları koloni PCR uygulanarak belirlendi. Her bir farklı insert (GAG, PR, RT, RH, INT ve ENV) ile yapılan transformasyon için rastgele 5'er tane koloni seçilerek numaralandırıldı. Bu koloniler PCR için kalıp olarak kullanıldı. PCR'da enzim olarak Phusion High-Fidelity

DNA Polymerase (Thermo, F-530S) kullanıldı. Reaksiyonda primer olarak klonlama kiti ile birlikte sağlanan primerler kullanıldı (Tablo 3.1; 26 ve 27 nolu primerler). Koloni PCR kurulurken Tablo 3.5'te verilen bileşenler 200 µl'lik PCR tüplerinde bir araya getirildi ve seçilen koloniler steril bir kürdan yardımı ile alınarak tüplerde süspanse edildi. Ardından reaksiyon Tablo 3.6'da verilen koşullarda gerçekleştirildi. Koloni PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Beklenen büyüklükte bant veren koloniler 100 µg/ml ampisilin içeren SOB broth besi yerine ekildi ve kültür 37°C'de 150 rpm'de 16 saat inkübe edilerek üretildi. Süre sonunda kültür çöktürülerek plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmitler restriksiyon enzimi ile kesilerek analiz edildi.

3.7.3.5. Plazmit izolasyonu ve restriksiyon enzimi kesimi

Bakteri kültürlerinden plazmit izolasyonu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, 27104) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde yapıldı. İzolasyon sonrasında plazmitlerin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve restriksiyon enzimi ile kesimi yapıldı. Kesim için plazmidin çoklu klonlama bölgesini iki noktadan kesen *Bgl*III (Thermo Scientific, FD0083) enzimi kullanıldı. Kesim için Tablo 3.8'de verilen bileşenler 200 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve tüpler 37°C'de 20 dakikada inkübe edildi. Reaksiyonun ardından restriksiyon kesimi ürünleri, %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Hem koloni PCR hem de restriksiyon analizleri ile ilgili DNA parçalarını taşıdığı belirlenen plazmitlerin dizi analizi için İontek firmasından hizmet alımı yapıldı.

Tablo 3.8: Restriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler

Bileşenin adı	Miktarı (µl)
10X reaksiyon tamponu	2
Plazmit	2
<i>Bgl</i> III restriksiyon enzimi	1
dH ₂ O	15
Toplam	20

3.7.4. BAGY2 Ara Domenlerinin Dizi Analizi

BAGY2 ara domenlerinin dizi analizi Tablo 3.1'de verilen her domenin özgün primerleri (Primer no; 3-14) kullanılarak çift yönlü olarak gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları NCBI veri tabanında bulunan VecScreen taraması ile analiz edilerek vektöre ait olan diziler çıkarıldı. Ardından aynı domene ait olan “forward” ve “reverse” yöndeki diziler

ChromasPro (Version 1.7.4) programı kullanılarak üst üste karşılaştırıldı. Elde edilen diziler NCBI veri tabanında hem blastn hem de tblastn ile analiz edildi.

3.7.5. BAGY2 Ara Domenlerinin Kopya Sayısının Belirlenmesi

BAGY2 retrotranspozonunun farklı kültür sürelerine sahip (45 ve 90) arpa kallus ve sürgünlerindeki kopya sayısında bir değişiklik olup olmadığı qPCR tekniği ile araştırıldı. Bu amaçla her domenin hem kontrol hem de doku kültürü örneklerindeki kopya sayıları bilinen standart örneklerle kıyaslanarak belirlendi. IDT primer quest ile AF254799.1 dizisi referans alınarak qPCR için yaklaşık 100 bp'lik DNA parçası çoğaltan primerler tasarlandı (Tablo 3.1, Primer no; 5, 15-23). qPCR analizlerinden önce tasarlanan primerlerin özgün olmayan bantlar oluşturup oluşturmadığı hem genomik DNA'da hem de domenleri taşıyan plazmitlerde PCR ile kontrol edildi. PCR için Tablo 3.5'te verilen bileşenler ve Tablo 3.6'da verilen koşullar kullanıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 7 voltta 30 dakika yürütülerek kontrol edildi.

qPCR'da standart bir eğri oluşturmak için klonlama çalışmalarından elde edilen plazmitler kullanıldı. Plazmitlerin konsantrasyonları ve içerdikleri baz çifti sayılarından yararlanılarak bir mikrolitredeki kopya sayıları hesaplandı. Plazmitlerin kopya sayısı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı (Formül no: 3.2). Ardından plazmitler 1 µl'deki kopya sayısı 10^5 - 10^9 olacak şekilde gerekli oranlarda sulandırıldı. Elde edilen bu farklı kopya sayılarına sahip plazmit serileri standart eğri oluşturmak için kullanıldı.

(3.2)

- 1) Plazmidin Dalton cinsinden ağırlığı (**g/mol**) = (plazmit+insert baz çifti)(330 Dax2)
- 2) Plazmidin kopya sayısı (**g/molekül**) = Plazmidin Dalton cinsinden ağırlığı (g/mol)/Avagadro sayısı ($6.02214199 \times 10^{23}$)
- 3) Plazmidin mikrolitredeki kopya sayısı (**molekül/µl**) = Plazmidin konsantrasyonu (g/µl)/ plazmidin kopya sayısı (g/molekül)

Reaksiyonda 10 ng DNA kalıbı kullanıldı. Domenlerin qPCR analizlerinden önce kalıp konsantrasyonlarının eşit olup olmadığını doğrulamak için kopya sayısı örnekler arasında değişiklik göstermeyecek bir referans gen (*Actin*) için qPCR yapıldı. *Actin* geni qPCR'ı için Albayrak ve diğ., (2012) tarafından tasarlanan primerler kullanıldı (Tablo 3.1, Primer no; 24, 25).

Tüm örneklerin ve standartların qPCR'ı, hata oranını azaltmak için iki tekrarlı olarak yapıldı. Reaksiyon SYBR kanalında okuma yapan SsoFast™ EvaGreen® Enzyme Mix (Bio-Rad, 172-5201) ile Tablo 3.9'da verilen oranlarda ve Tablo 3.10'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Primerlerin özgünlüğünü test etmek için qPCR'ın döngüleri tamamlandıktan sonra "Melt curve" analizi yapıldı.

Tablo 3.9: Real-Time PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyon
2X EvaGreen enzim karışımı	5	1X/µl
Primer F (10 nmol/µl)	0.4	0.4 nmol/µl
Primer R (10 nmol/µl)	0.4	0.4 nmol/µl
Kalıp DNA (10 ng/µl)	1	1 ng/µl
dH ₂ O	3.2	-
Toplam	10	-

Tablo 3.10: Real-Time PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	3 dk.	1
Denatürasyon	98	5 sn.	40
Bağlanma ve uzama (veri alımı)	55	5 sn.	

3.7.6. İstatistiksel Analizleri

10 ng genomik DNA'da bulunan BAGY2 domenlerinin kopya sayıları, qPCR sonucunda standart eğri referans alınarak bulundu. Ardından örneklerdeki domenlerin kopya sayıları arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı SPSS (Version 15.0) programında One-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) testi ile analiz edilerek belirlendi. Bu amaçla örnekler; 45 günlük kalluslar (Grup 1), 90 günlük kalluslar (Grup 2), 45 günlük kalluslardan rejenere olan sürgünler (Grup 3), 90 günlük kalluslardan rejenere olan sürgünler (Grup 4), Kontrol 1 (Grup 5), Kontrol 2 (Grup 6) ve Kontrol 3 (Grup 7) olarak gruplandırıldı. Gruplar oluşturulurken doku kültürü süresi temel alındı ve varyasyonun önemlilik derecesi için H1 ve H0 (Null) hipotezleri şu şekilde kuruldu;

H1: Doku kültürü süresi, arpa kalluslarında ve kalluslardan rejenere olan sürgünlerde BAGY2 ara domenlerinin kopya sayısında istatistiksel açıdan önemli bir artışa sebep olmuştur.

H0: Doku kültürü süresinin arpa kalluslarında ve kalluslardan rejenere olan sürgünlerde *BAGY2* ara domenlerinin kopya sayısındaki artışa bir etkisi yoktur. Gözlemlenen farklılıklar tesadüften ileri gelmektedir.

One-Way ANOVA testi sonucunda, gruplar arasında domenlerin kopya sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendiği durumda varyansın homojenitesine bakıldı. Ardından hangi gruplar arasındaki farklılığın anlamlı olduğu, Tukey (homojen varyasyon gösterenlerde) ya da Games Howell (homojen olmayan varyasyon gösterenlerde) testleri ile belirlendi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında tek bir arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyosundan köken alan 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünlerde, *BAGY2* retrotranspozonunun neden olduğu insersiyonel polimorfizm araştırıldı. Bu amaçla IRAP marker tekniği kullanıldı. Bununla birlikte, *BAGY2*'ye ait ara domenler genomik DNA'lerden çoğaltıldı ve dizi analizi yapıldı. Elde edilen diziler, AF254799.1 (NCBI) ve TREP3162 referans dizileri ile karşılaştırıldı. Ayrıca farklı yaşlardaki kallus ve sürgünlerde *BAGY2*'ye ait ara domenlerin kopya sayısı arasındaki farklılık qPCR ile belirlendi.

4.1. DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

Çalışmada kallus kültürü için 4 mg/L Dicamba içeren MS besi yeri kullanıldı. Kültür her biri numaralandırılmış 180 embriyo ile başlatıldı ve bu numaralandırma doku kültürü işlemleri süresince devam ettirildi. İlk 45 günlük inkübasyonun ardından kallus gelişiminin yaklaşık %95 olduğu görüldü. Buna karşın oluşan kallusların bir kısmı üç parçaya ayrılacak büyüklükte olmadığı için alt kültüre alınmadı. Yeterli büyüklükteki kalluslar (103 adet) üç parçaya kesildi ve parçaların herbiri farklı işlemler (DNA izolasyonu, 90 günlük kallus eldesi ve 45 günlük kallustan rejenere olan sürgün eldesi) için kullanıldı. Sürgün gelişimi için 0.5 mg/L zeatin içeren MS besi yeri kullanıldı. Sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan 45 günlük 116 kallustan 32 tanesinde sürgün gelişimi görüldü. Sürgün elde edilen bu 32 örnek ile aynı numaraya sahip (aynı embriyodan köken alan) 90 günlük kalluslar 2 parçaya kesildi ve bir parça DNA izolasyonu için; diğer parça sürgün rejenerasyonu için kullanıldı. Süre sonunda 32 kallustan sadece 5 tanesinin sürgün oluşturduğu görüldü. Bu 5 sürgün ile aynı numaraya sahip olan kalluslar (45 ve 90 günlük) ve sürgünler (45 günlük kalluslardan rejenere olan) bir grup olarak kabul edildi. Tüm moleküler çalışmalar bu 5 grup içinden rastgele seçilen 3 grup ile tekrarlandı (Şekil 4.1). Bazı kalluslarda birden fazla sürgün oluşumu

görüldü. Sürgünler arasında da *BAGY2* polimorfizmi olma ihtimali göz önünde bulundurularak analizler için her kallustan sadece bir tane sürgün kullanıldı.



Şekil 4.1: Çalışmada kullanılan doku kültürü örnekleri

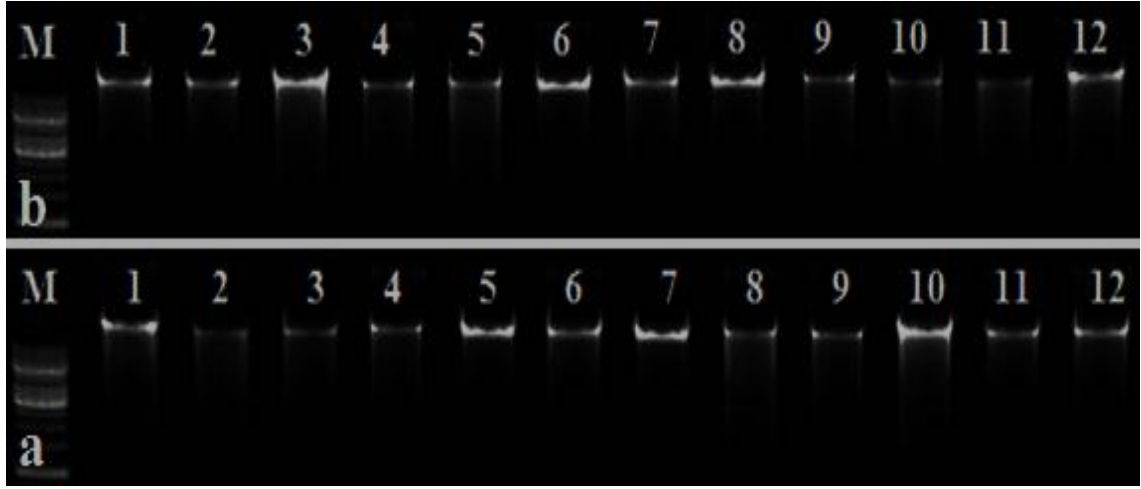
(a) 45 günlük kallus (b) 90 günlük kallus (c) 45 günlük kallustan sürgün gelişimi (d) 90 günlük kallustan sürgün gelişimi. Bar: 1mm.

Çalışmada doku kültürü örneklerinin yanı sıra 3 farklı kontrol grubu kullanıldı. Kontrol 1 (embriyo); doku kültürünün kurulmasında kullanılan başlangıç materyali olduğu için polimorfizm değerlendirmesinde referans olarak alındı. Bununla birlikte 4 farklı embriyo ile çalışmalar tekrarlanarak bireyler arasında meydana gelebilecek doğal polimorfizm de kontrol edildi. Kontrol 2 (nemli filtre kağıdında çimlendirilen fidelerin yaprakları) kallustan rejenere olan sürgünlerin polimorfizminde referans olarak alındı. Kontrol 3 (MS0 besi yerinde çimlendirilen fidelerin yaprakları) besi yeri bileşenlerinin kallus gelişimi olmadan da polimorfizme neden olup olmadığını belirlemek için kullanıldı.

4.2. DNA İZOLASYONU SONUÇLARI

Çalışmada *BAGY2* retrotranspozonunun yol açtığı polimorfizmi belirlemek için IRAP tekniği kullanıldı. IRAP iki retrotranspozon arasında kalan bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayalı bir tekniktir. Böylece örnekler arasında farklı bant profilleri elde edilmesi, retrotranspozon hareketi ile yorumlanır. Buna karşın izolasyon sırasında DNA'nın kırılması sonucunda da farklı bant profilleri elde edilme riski vardır. Bu sebeple IRAP-PCR için kalıp olarak kullan genomik DNA'ların bütünlüğünün bozulmamış olması gerekmektedir. İzolasyon tek bir örnekten DNA ve RNA izolasyonunu aynı anda gerçekleştirebilme olanağı sağlayan Tri Reagent® ile yapıldı. İzole edilen DNA'lar tez çalışması kapsamında kullanıldı; RNA'lar ise ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı. İzolasyon sonrasında DNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi ve kırık olmadığı, IRAP için kalıp olabilecek kalitede

olduğu görüldü (Şekil 4.2). DNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldükten sonra tüm örneklerin konsantrasyonu 10 ng/μl'ye ayarlandı.

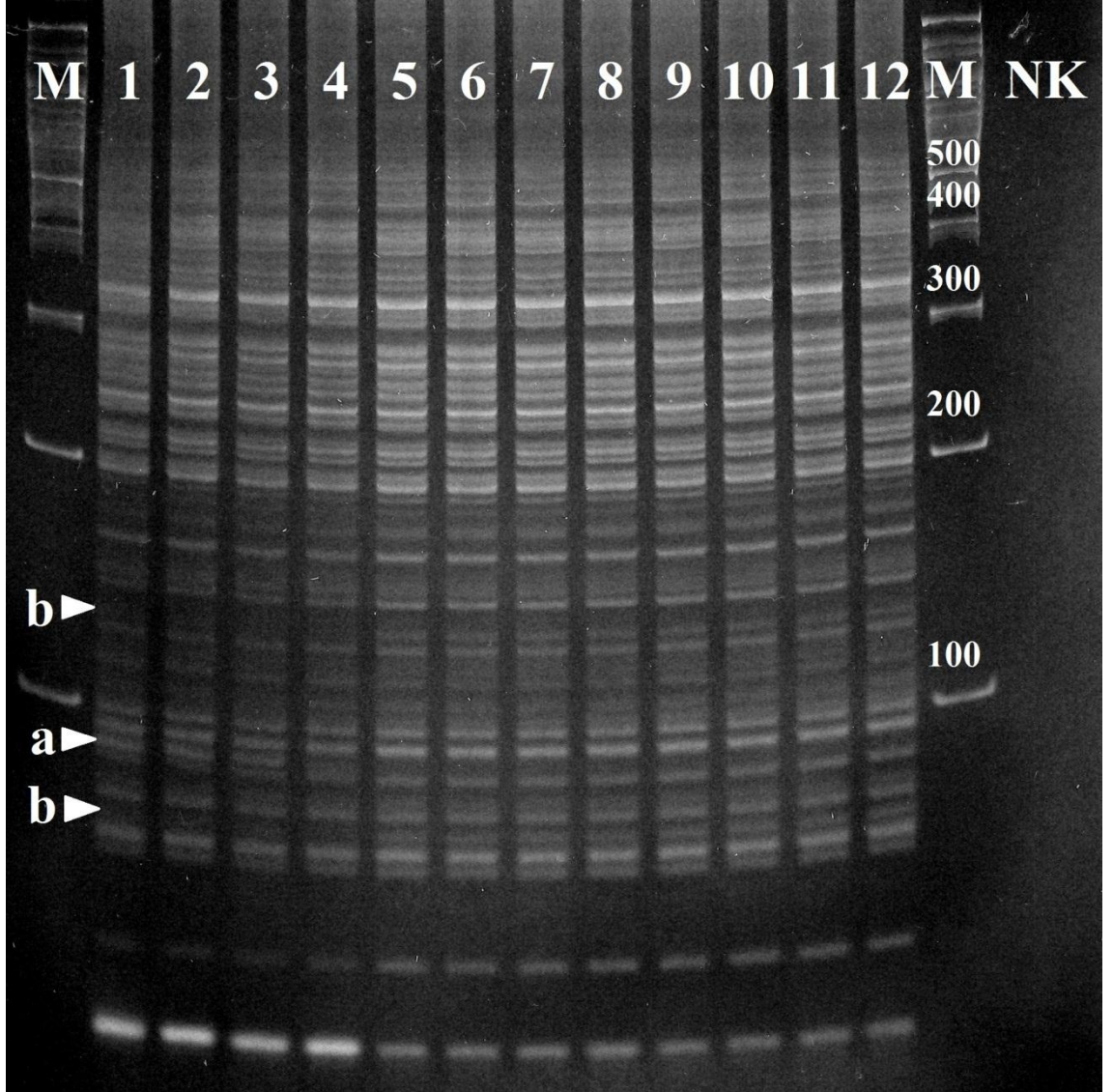


Şekil 4.2: İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü
(a) kontrol örnekleri (1-4, kontrol 1; 5-8, kontrol 2; 9-12, kontrol 3); (b) doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13); M, DNA marker (Thermo Scientific, SM0311)

4.3. IRAP-PCR SONUÇLARI

IRAP-PCR ürünleri %8'lik poliakrilamit jelde 5 saat yürütüldü ve analiz edildi (Şekil 4.3 ve 4.4). Elde edilen bant profili Jaccard Benzerlik Katsayısı formülü (Formül no: 3.1) ile değerlendirilerek örnekler arasındaki yüzde polimorfizm oranı hesaplandı (Tablo 4.1).

Kontrol 1 örneklerinin IRAP-PCR sonuçlarında, 1000 bç altında 36 bant görüldü. Daha büyük bantlar jelde iyi bir şekilde ayıramadığı için değerlendirmeye alınmadı. Grup içinde karşılaştırıldığında (Şekil 4.3, 1-4 nolu örnekler) Kontrol 1 içinde yer alan dört örneğin aynı bant profiline sahip olduğu görüldü. Kontrol 2 örnekleri (Şekil 4.3, 5-8 nolu örnekler) de grup içinde homomorfik olmasına karşın Kontrol 1 ile karşılaştırıldığında, iki grup arasında 3 polimorfik bant olduğu tespit edildi ve polimorfizm oranı %8 olarak hesaplandı. Kontrol 1'de mevcut olan bir bandın (a ile gösterilen ok) Kontrol 2'de olmadığı ve Kontrol 2'de bulunan iki bandın (b ile gösterilen oklar) da Kontrol 1 örneklerinde bulunmadığı görüldü. Kontrol 3 örneklerinin (Şekil 4.3, 9-12 nolu örnekler) IRAP-PCR sonuçlarının Kontrol 2 ile aynı olduğu bulundu.



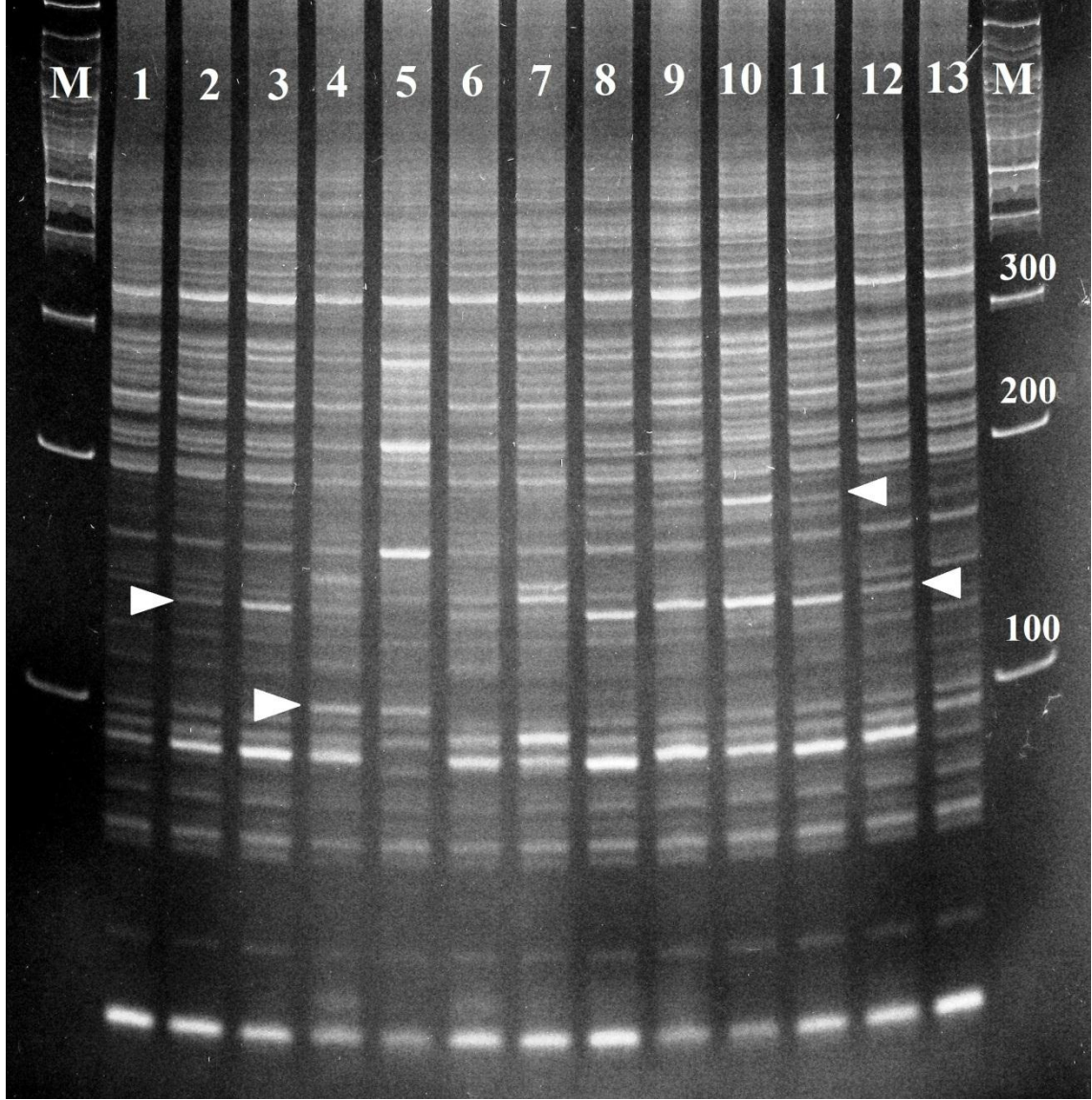
Şekil 4.3: Kontrol örneklerinin IRAP-PCR sonuçları

1-4, kontrol 1; 5-8, kontrol 2; 9-12, kontrol 3; NK, PCR negatif kontrol; M, DNA marker (Thermo Scientific, SM0322). Polimorfik bantlar ok ile gösterilmiştir.

Doku kültürü örneklerinin IRAP-PCR sonuçları değerlendirilirken farklı embriyolardan köken alan örnekler gruplara ayrıldı (Şekil 4.4; 1. Grup, 2-5 no'lu örnekler; 1. Grup 6-9 no'lu örnekler; 3. Grup, 10-13 no'lu örnekler). Örnekler jele yüklenirken aynı embriyodan köken alan 45 ve 90 günlük kalluslar ile bu kalluslardan rejenera olan sürgünler yan yana yüklendi.

Doku kültürü örneklerinin IRAP-PCR sonuçlarında, birbirinden farklı pek çok polimorfik bant görüldü. Polimorfik bantların bazıları gruplar arasında (farklı

embriyodan köken alan) bazıları da aynı grubun (aynı embriyodan köken alan) örnekleri arasında gözlendi.



Şekil 4.4: Doku kültürü örneklerinin IRAP-PCR sonuçları

1, Kontrol 1; 2-5, 1. Grup (sırasıyla 45 günlük kallus (2) ve sürgünü (3), 90 günlük kallus (4) ve sürgünü (5)); 6-9, 2. Grup; 10-13, 3. Grup; M, DNA marker (Thermo Scientific, SM0322). Bazı polimorfik bantlar ok ile gösterilmiştir.

Tüm örneklerin IRAP-PCR sonuçları kullanılarak hesaplanan polimorfizm yüzdeleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Elde edilen değerlere göre örnekler arasındaki polimorfizmin %0 ile %20 arasında olduğu saptandı. En yüksek polimorfizm yüzdesinin 1. Grup’ta yer alan 90 günlük kallus (K90.1) ile Kontrol 1 ve 3. Grup’ta yer alan 45 günlük kallus (K45.3) arasında olduğu görüldü (%20). Bununla birlikte pek çok örnek arasında herhangi bir polimorfik bant görülmedi.

Tablo 4.1: IRAP-PCR sonuçlarına göre hesaplanan polimorfizm yüzdeleri

ÖRNEK	Kont.2	Kont.3	K45.1	S45.1	K90.1	S90.1	K45.2	S45.2	K90.2	S90.2	K45.3	S45.3	K90.3	S90.3
Kont.1	8	8	5	5	20	11	15	10	5	5	8	5	5	5
Kont.2	-	0	3	3	19	10	15	8	3	3	5	3	3	3
Kont.3		-	3	3	19	10	15	8	3	3	5	3	3	3
K45.1			-	0	11	13	13	5	0	0	3	0	0	0
S45.1				-	11	13	13	5	0	0	3	0	0	0
K90.1					-	19	11	14	11	11	20	11	11	11
S90.1						-	18	11	13	13	8	13	13	13
K45.2							-	16	13	13	6	13	13	13
S45.2								-	5	5	3	5	5	5
K90.2									-	0	3	0	0	0
S90.2										-	5	0	0	0
K45.3											-	3	3	3
S45.3												-	0	0
K90.3													-	0

*Kont, Kontrol; K45, 45 günlük kallus; K90, 90 günlük kallus; S45, 45 günlük kallustan rejenere olan sürgün; S90, 90 günlük kallustan rejenere olan sürgün; en sondaki numaralar grupları belirtmektedir.

4.4. BAGY2 ARA DOMENLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Bu tez çalışması kapsamında *BAGY2* retrotranspozonuna ait tüm ara domenler (GAG, PR, RT, RH, INT ve ENV) özgün primerler ile genomik DNA'lardan çoğaltıldı. Bununla birlikte Kontrol 1 (embriyo) örneklerinde çoğaltılan domenler klonlandı ve dizi analizleri gerçekleştirildi. IRAP ile elde edilen polimorfizmin *BAGY2* kopya sayısındaki artıştan veya başka faktörlerden (genomda bulunan diğer retrotranspozon hareketleri ya da deneysel hatalar) kaynaklandığını belirlemek için tüm örneklerde, domenlerin kopya sayıları qPCR ile belirlendi.

4.4.1. BAGY2 Ara Domenlerinin PCR Sonuçları

BAGY2 ara domenlerinin PCR ile çoğaltılabilmesi için her domene özgün primerler tasarlandı. Primer tasarımında kullanılacak olan referans diziyi belirlemek için TREP ve NCBI veri tabanlarından *BAGY2* nükleotit dizileri için genel bir tarama yapıldı. *BAGY2* arpa genomunda çok kopya olarak bulunduğu için (%5.15) veri tabanlarında bulunan klonlarda pek çok *BAGY2* dizisine rastlandı. Buna karşın bu dizilerin çoğunun *BAGY2*'nin tam kopyasını içermediği görüldü.

Bulunan aday dizilerden *BAGY2*'ye ait en büyük diziyi içeren iki tanesi (TREP3162 ve NCBI-AF254799.1) retrotranspozon karakteristik özelliklerini belirlemek için LTRharvester programı ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre TREP3162 dizisinin

BAGY2 LTR dizilerini eksiksiz olarak içerdiği buna karşın AF254799.1 klonunda yer alan *BAGY2* LTR dizilerinin başka transpozonlar tarafından bölünmüş olduğu bulundu (TREP3162 tam dizisi Ek 4'te verilmiştir).

LTR analizlerinin ardından her iki dizideki ara domenlerin (GAG, PR, RT, RH ve INT) yerleri belirlendi. Bu amaçla GyDB'den elde edilen *BAGY2* protein dizileri tblastn kullanılarak her iki referans dizi ile de kıyaslandı. Veri tabanlarında *BAGY2* ENV domenine ait protein dizisi mevcut olmadığı için analizlere diğer 5 domen üzerinden devam edildi. Elde edilen tblastn sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm tblastn sonuçlarında, E değerleri (E-value) sıfıra eşit ya da küçük, eşleşme oranları (Query cover) ise %100 bulundu. tblastn sonuçlarına göre, NCBI'dan elde edilen AF254799.1 klonu tüm domenlerin protein dizileri ile daha büyük bir benzerlik gösterdi ve primer tasarımı için referans dizi olarak kullanıldı.

Tablo 4.2: AF254799.1 ve TREP3162 dizilerinin tblastn analizi sonuçları

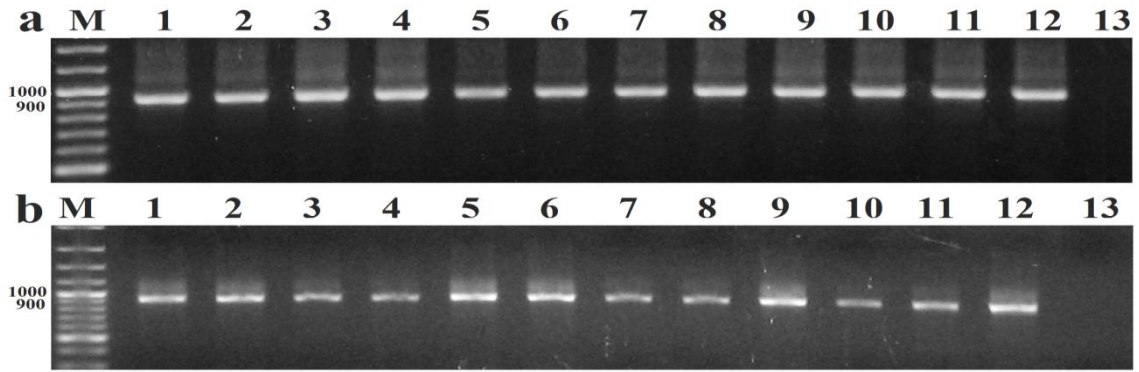
Domen adı		GAG	PR	RT	RH	INT
Büyükklüğü	Aminoasit (aa)	318	92	243	118	329
	Nükleotit (bç)	954	279	730	354	987
AF254799.1	Dizi içindeki konumu	142-1095	1204-1482	2076-2805	2950-3303	3589-4575
	tblastn sonucu (%)	99	99	92-99-100*	100	100
	Delesyon	+	-	+	-	-
	İnserisyon	+	+	+	-	-
	Yer değiştirme	-	-	-	-	-
	Çerçeve kayması	-	-	+	-	-
TREP3162	Dizi içindeki konumu	1768-2721	2830-3108	3703-4434	4579-4932	5218-6204
	tblastn sonucu (%)	86	91	93	96	92
	Delesyon	+	+	+	-	-
	İnserisyon	+	-	-	-	-
	Yer değiştirme	+	+	+	+	+
	Çerçeve kayması	-	-	-	-	-

* üç farklı çerçevede eşleşmiştir.

tblastn analizleri sonucunda *BAGY2* poliprotein nükleotit dizisinin AF254799.1 klonunda 3'-5' yönünde olduğu belirlendi ve primer tasarlamadan önce dizinin revers komplementeri alındı. Ardından tasarlanacak olan primerlerin dizide bulunan delesyon ve inserisyon bölgelerine denk gelmemesi için referans dizi detaylı olarak incelendi. Elde edilen sonuçlara göre GAG domeninin 643-645 nükleotit pozisyonunda, 3 timin (TTT/Fenilalanin) bazından oluşan bir triplet inserisyonu ve 832-834 nükleotit pozisyonunda valin kodlayan bir triplet delesyonu olduğu bulundu. GAG domeninde görülen delesyon ve inserisyonlar üçlü bazlar halinde olduğu için çerçeve kayması gözlenmedi. PR domeninde 136-138 nükleotit pozisyonunda stop kodonu olan bir triplet

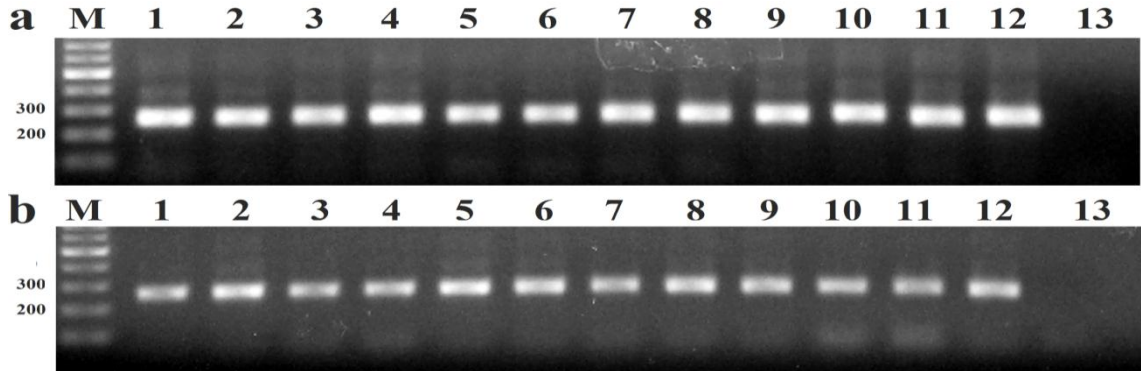
insersiyonu görüldü. Bunun dışında dizide herhangi bir delesyon, yer değiştirme ya da çerçeve kayması görülmedi. RT domeninde 232-233 nükleotit pozisyonunda taşıdığı dinükleotit (AA) insersiyonu ve 353 pozisyonunda taşıdığı bir nükleotit (G) delesyonu nedeni ile çerçeve kayması olduğu görüldü. RH ve INT domenleri ise protein dizileri ile %100 eşleşme gösterdi. Elde edilen bu sonuçlar göz önüne alınarak her domen için “IDT primer quest” ile özgün primerler tasarlandı. ENV domeni için daha önce Vicient ve diğ., (2001a) tarafından tasarlanan primerler kullanıldı.

Domenler için tasarlanan primerler ile hem kontrol örnekleri hem de doku kültürü örneklerinden PCR yapıldı. PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve UV tablasında görüntülendi. PCR’lar sonucunda tüm örneklerden istenilen büyüklükteki bantlar çoğaltıldı (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



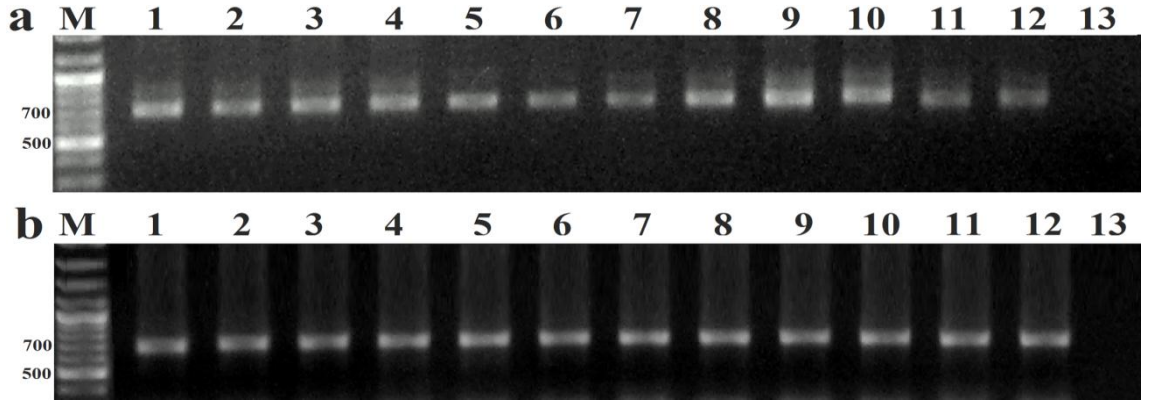
Şekil 4.5: BAGY2 GAG domeninin PCR sonuçları

(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 925 bp)



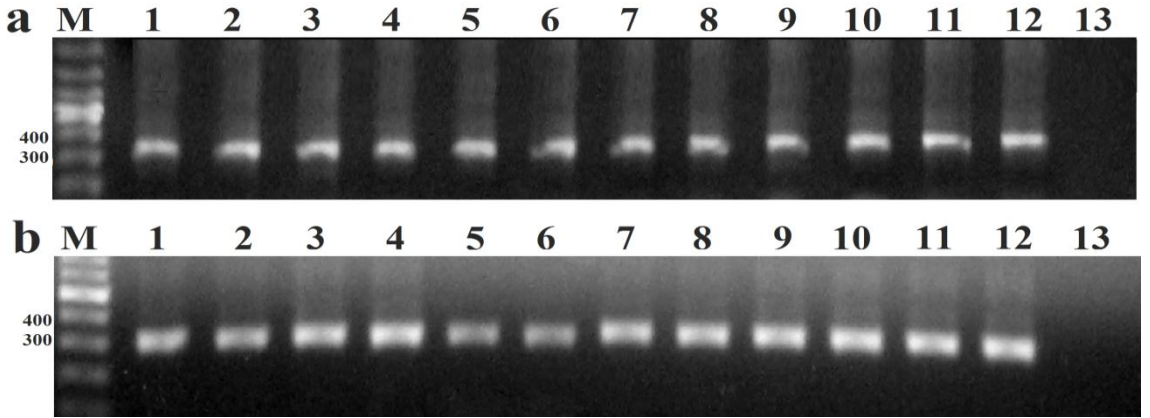
Şekil 4.6: BAGY2 PR domeninin PCR sonuçları

(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 261 bp)



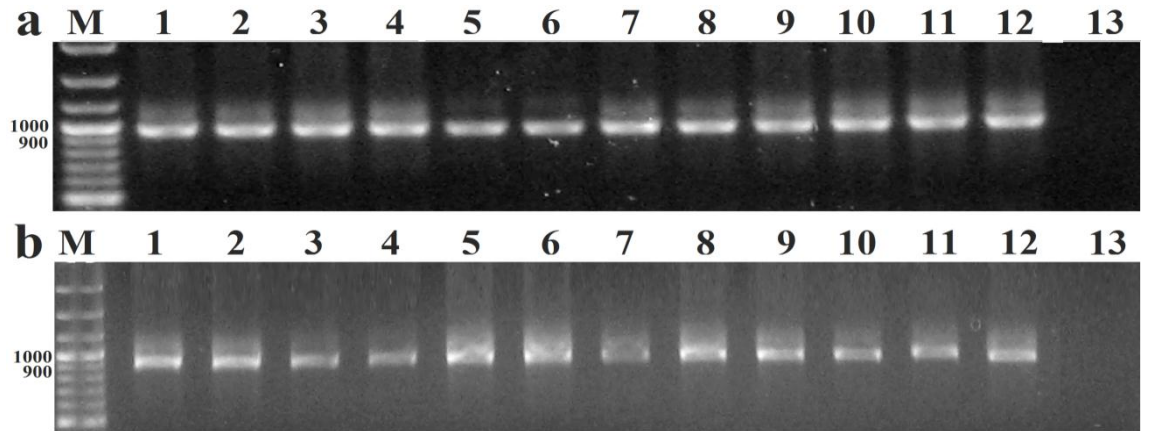
Şekil 4.7: *BAGY2* RT domeninin PCR sonuçları

(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 702 bp)



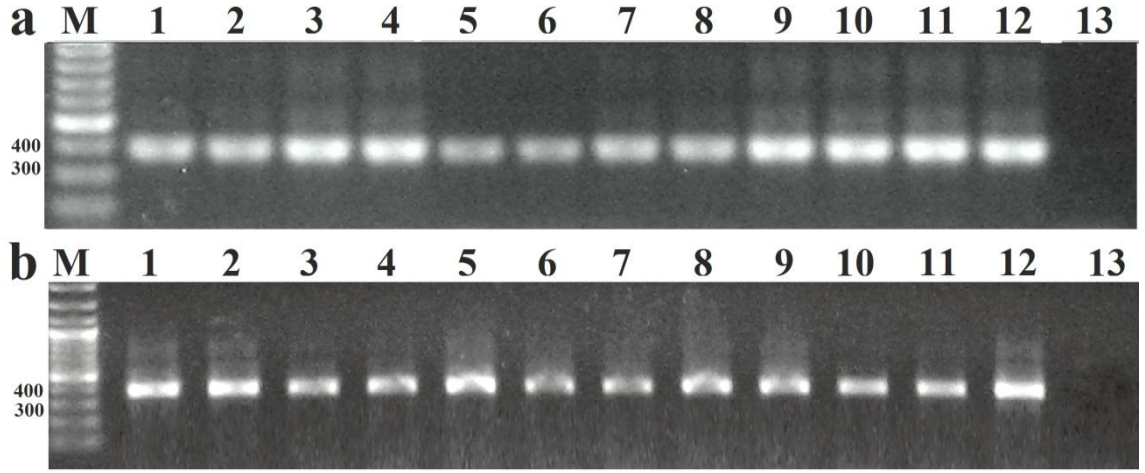
Şekil 4.8: *BAGY2* RH domeninin PCR sonuçları

(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 322 bp)



Şekil 4.9: *BAGY2* INT domeninin PCR sonuçları

(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 960 bp)



Şekil 4.10: *BAGY2* ENV domeninin PCR sonuçları

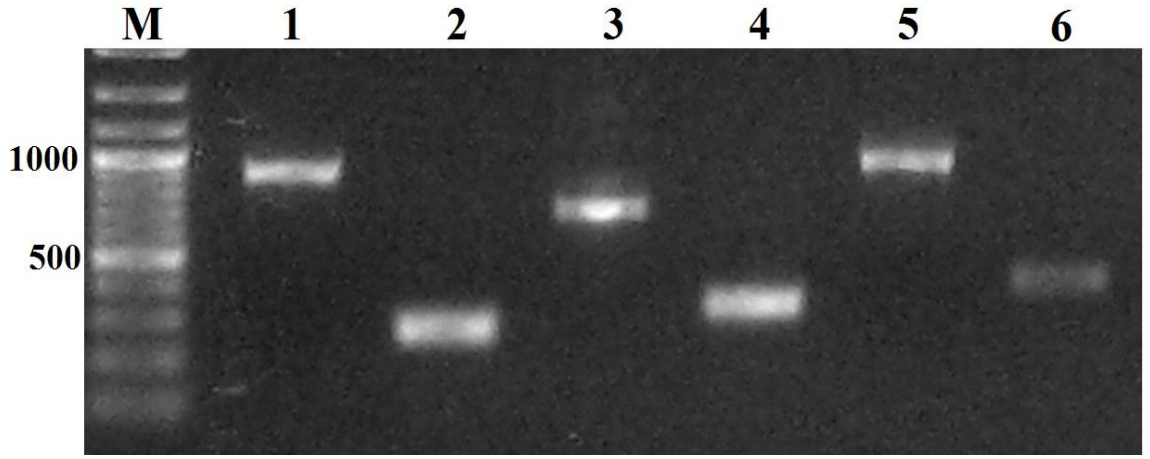
(a) Kontrol örnekleri (1-4, Kontrol 1; 5-8, Kontrol 2; 9-12, Kontrol 3; 13, negatif kontrol); (b) Doku kültürü örnekleri (1-4, 1. Grup; 5-8, 2. Grup; 9-12, 3. Grup; 13, negatif kontrol), M; marker (Thermo Scientific, SM0322).
(Beklenen büyüklük; 385 bp)

Ara domenler için yapılan tüm PCR'lar istenilen büyüklükteki bantlar çoğaltıldıktan sonra ilgili bantlar jelden geri kazanıldı ve dizi analizi için klonlandı.

4.4.2. *BAGY2* Ara Domenlerinin Klonlanma ve Dizi Analizi Sonuçları

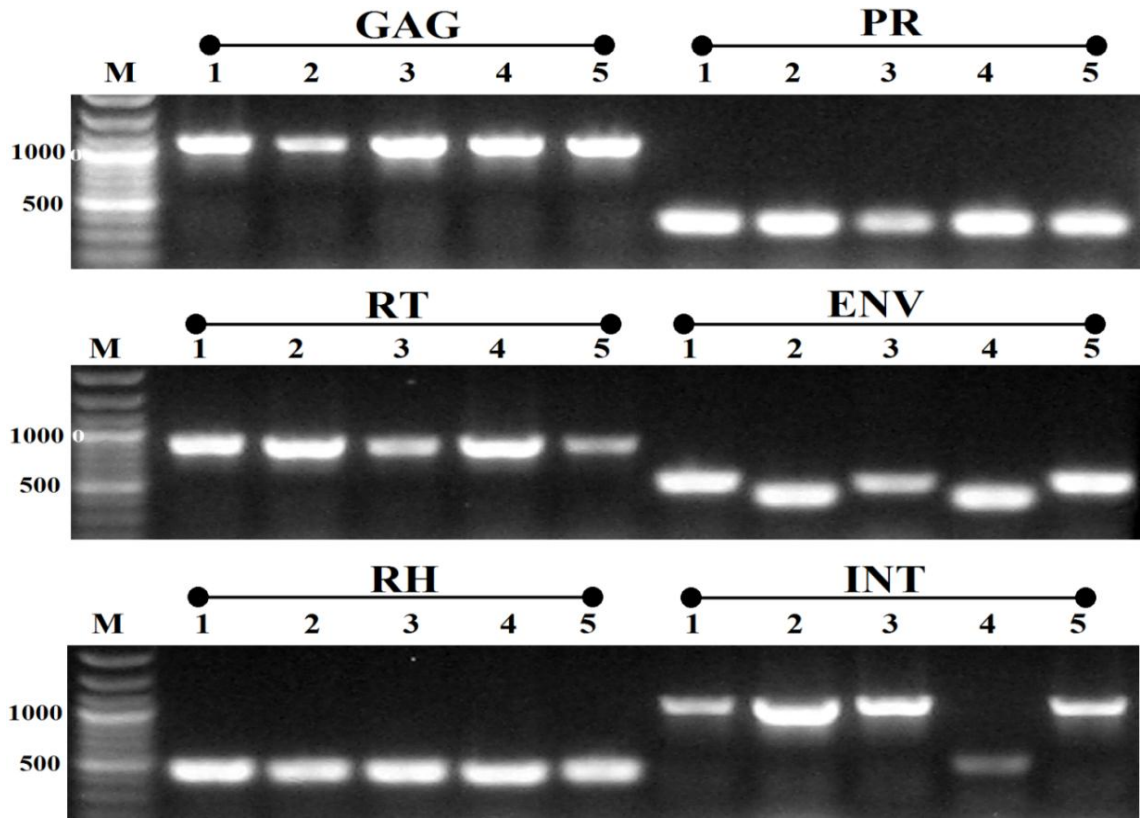
Bugüne kadar arpa genomunda çok sayıda (~250) transpozon ailesi tanımlanmıştır ve bunların 14 tanesi genomun yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bu 14 transpozon ailesinden 10 tanesi Ty3/gypsy LTR-retrotranspozonları grubuna dahildir. Bu ailelerde yer alan retrotranspozonların domenleri arasında evrimsel süreçte korunmuş bölgeler olması mümkündür. Bu nedenle *BAGY2*'ye ait domenlere özgü tasarlanan primerlerin ilgili domenleri çoğaltıp çoğaltmadığı dizi analizleri ile doğrulandı.

Domenlerin dizileme analizleri sadece Kontrol 1 (embriyo) örneğinden yapıldı. Bu amaçla ilgili bantlar jelden geri kazanıldı ve izolasyon ürünlerinin kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 4.11). Jelden geri kazanılan PCR ürünlerinin pJET1.2/blunt vektörüne (Thermo Scientific, K1231) ligasyonu gerçekleştirildi ve ardından plazmitler laboratuvarda kompetan hale getirilen *E. coli* JM107 hücre hattına aktarıldı. Rekombinant koloniler, koloni PCR yöntemi ile belirlendi.



Şekil 4.11: Jelden geri kazanılan PCR ürünleri
1, GAG (925 bç); 2, PR (261 bç); 3, RT (702 bç); 4, RH (322 bç); 5, INT (960 bç); 6, ENV (385 bç).
M, marker (Thermo Scientific, SM0322).

Koloni PCR yapılırken her domen için rastgele 5 koloni seçildi ve klonlama kitinden temin edilen primerler kullanılarak (Tablo 3.1, Primer no; 26, 27) PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edildi (Şekil 4.12).

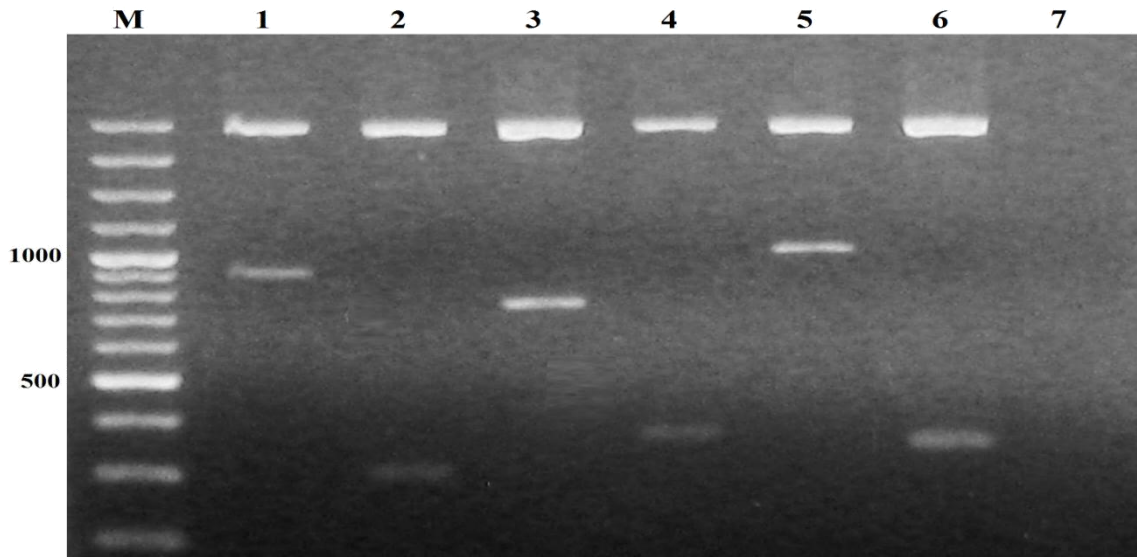


Şekil 4.12: Koloni PCR sonuçları
Beklenen büyüklükler (bç); GAG, 1045; PR, 381; RT, 822; RH, 442; INT, 1080; ENV, 505.
M, marker (Thermo Scientific, SM0322).

Koloni PCR için kullanılan primerler klonlama vektörü üzerinde bir bölgeye bağlandığı için PCR sırasında 120 bç'lik vektör bölgesini de içine alarak çoğaltım yapmaktadır. Bu nedenle beklenen bantların büyüklükleri 120 bç artış göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre GAG, PR, RT ve RH domenleri için seçilen tüm kolonilerin beklenen büyüklükteki inserti taşıdığı belirlendi. Buna karşın ENV ve INT domenleri için seçilen kolonilerden bazılarının (Şekil 4.12, ENV; 2, 4 ve INT; 4) beklenilenden daha küçük bantlar taşıdığı görüldü. Bu nedenle koloniler sıvı besi yerine ekilirken negatif sonuç veren bu koloniler kullanılmadı.

İlgili domenleri taşıyan koloniler bir gece seçici sıvı besi yerinde üretildikten sonra plazmit izolasyonu için kullanıldı. Plazmitler dizilemeye gönderilmeden önce restriksiyon enzimi kesimi ile analiz edildi. Bu amaçla plazmidi iki bölgeden kesen *Bgl*III enzimi kullanıldı. Enzim vektörden de 51 bç'lik bir bölgeyi kapsayarak kesim yaptığından dolayı kesim ürünlerinin PCR ürünlerinden daha büyük olması beklendi. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edildi (Şekil 4.13). *BAGY2* domenlerini taşıyan plazmitlerin *Bgl*III kesimi sonrasında beklenen büyüklüklere yakın 2 bant (pJET1/2 blunt vektör, 2974 bç ve ilgili insert) gözlemlendi ve plazmitlerin dizi analizi gerçekleştirildi.



Şekil 4.13: Restriksiyon enzimi kesimi sonuçları
1, GAG; 2, PR; 3, RT; 4, RH; 5, INT; 6, ENV; 7, negatif kontrol; M, marker (Thermo Scientific, SM0322).

Domenlerin dizilenmesi için her domenin özgün primerleri (Tablo 3.1, Primer no; 3-14) kullanıldı ve dizileme çift yönlü olarak gerçekleştirildi. Elde edilen diziler NCBI veri tabanındaki VecScreen uygulaması kullanılarak analiz edildi ve dizilerdeki pJET1.2/blunt vektörüne ait olan bölgeler temizlendi. Ardından her domene ait olan iki dizi (F ve R yönlerinde) Chromaspro (Versiyon 1.7.4) programı ile analiz edilerek birleştirildi (Ara domenlerin birleştirilmiş dizileri Ek 5’te verilmiştir). Elde edilen bütünleştirilmiş diziler *BAGY2* domenlerinin hem protein (tblastn) hem de nükleotit (blastn) dizileri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3). Tüm BLAST analizlerinde, E değerleri sıfıra eşit ya da küçük, eşleşme oranları ise %90-100 olarak bulundu.

Tablo 4.3: *BAGY2* ara domenlerinin dizi analizi sonuçları.

Domen adı	Primerlerin hedef büyüklüğü	Dizilenen baz sayısı	tblastn sonucu (%)	blastn sonucu (%)	
				AF254799.1	TREP3162
GAG	925	925	90	95	91
PR	261	260	86	87	93
RT	702	703	92	93	91
RH	322	318	94	93	95
INT	960	934	92	88	94
*ENV	385	253	-	-	-

*Protein dizisi bilinmediği için analiz edilemedi. Her iki referans dizi ile de benzerlik göstermediği için tüm nükleotit koleksiyonlarına karşı genel bir BLAST ile analiz edildi.

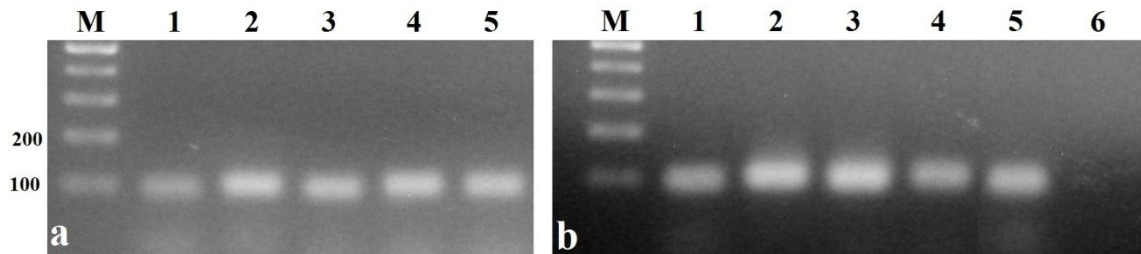
blastn ve tblastn analizleri sonucu tüm domenlerin, veri tabanlarında bulunan *BAGY2* protein ve nükleotit dizileri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. Buna karşın ENV domenine ait nükleotit dizisi her iki referans dizi ile de önemli bir benzerlik göstermedi. NCBI veri tabanında tüm nükleotit koleksiyonlarına karşı yapılan genel bir BLAST analizi ile ENV dizisinin, *BAGY2* ENV domenine ait kısmi dizi (AJ298030.1) ile %92 benzerlik gösterdiği belirlendi. Elde edilen bu sonuçlarla tasarlanan primerlerin *BAGY2* ara domenleri için özgün olduğu kanıtlandı.

4.4.3. *BAGY2* Ara Domenlerinin Kopya Sayısı Değişimi Sonuçları

IRAP analizleri ile gözlemlenen polimorfizmin *BAGY2* retrotranspozonunun kopya sayısındaki artıştan mı yoksa başka faktörlerden mi (diğer transpozon hareketleri, genomik DNA kırıkları vb.) kaynaklandığını belirlemek için qPCR analizleri yapıldı. *BAGY2*’nin arpa genomunda kaç kopya olduğunun tam olarak bilinmemesine karşın genomun yaklaşık %5.15’ini oluşturduğu düşünülmektedir (Wicker ve diğ., 2009). Bununla birlikte evrimsel süreçte *BAGY2*’nin pek çok kopyası ara domenlerinin bazılarını ya da hepsini kaybetmiş olabilir. Bu nedenle qPCR analizleri her domen için

ayrı ayrı araştırıldı. Veri tabanlarında ENV domeni ile ilgili kesin dizi bilgilerine ulaşılamadığı için qPCR analizleri diğer 5 domen üzerinden yürütüldü.

qPCR’da kullanılmak üzere her domen için yaklaşık 100 bç hedef bölgesi olan ara primerler tasarlandı (Tablo 3.1, Primer no; 5, 15-23). Primerler tasarlanırken dizi analizleri göz önünde bulundurularak delesyon ya da insersiyon içeren bölgelere gelmemesine dikkat edildi. qPCR’da kullanılmadan önce primerlerin genomda başka bölgelere bağlanarak özgün olmayan bantlar oluşturmadığı PCR ile gösterildi. PCR’da kalıp olarak hem genomik DNA’lar hem de domenlerin klonlandığı plazmitler kullanıldı ve PCR ürünleri %1’lik aragoz jelde kontrol edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: qPCR primerlerinin özgünlük kontrolü sonuçları

(a) Kontrol 1 örneğinin genomik DNA ile yapılan PCR sonuçları (b) plazmitler ile yapılan PCR sonuçları; 1-5, GAG, PR, RT, RH, INT; 6, negatif kontrol; M, marker (Thermo Scientific, SM0322).

Elde edilen sonuçlara göre tasarlanan primerlerin beklenen büyüklerde (~100 bç) tek bant verdiği için genomda başka bölgeleri çoğaltmadığı görüldü. Bu nedenle primerlerin qPCR analizleri için uygun olduğu kabul edildi.

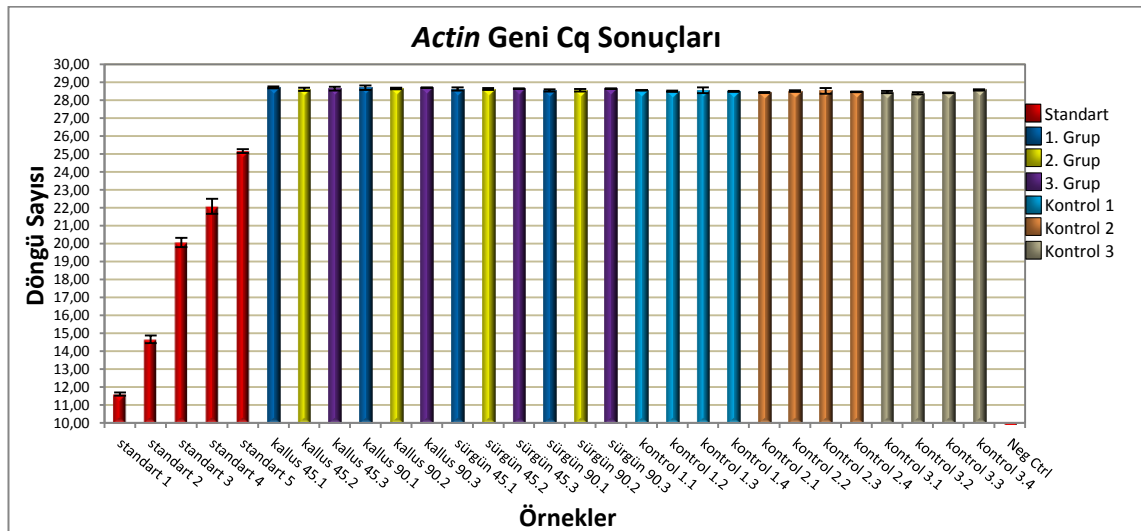
BAGY2 ara domenlerinin kopya sayılarını belirlemek için standart bir plazmit serileri oluşturuldu. Bu amaçla klonlama çalışmalarından elde edilen plazmitler kullanıldı. Her plazmidin konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü ve içerdikleri toplam baz sayısı (plazmit + insert) hesaplandı. Bu değerlerden yararlanılarak plazmitlerin 1 µl’deki kopya sayıları hesaplandı (Formül no: 3.2). Ardından plazmitlerin kopya sayıları 1 µl’de 10^5 - 10^9 olacak şekilde sulandırılarak standart seriler elde edildi. Analizlerde kullanılan tüm standart serilerinin qPCR sonuçları Tablo 4.4’te verilmiştir (Standart eğrilerin grafikleri Ek 6’da verilmiştir).

Tablo 4.4: qPCR standart eğrilerinin sonuçları

Domen Adı	E Değerleri	R ² Değerleri	Eğim (Slope) Değerleri
GAG	%102.8	0.984	-3.257
PR	%103.9	0.984	-3.233
RT	%101.9	0.990	-3.276
RH	%95.10	0.994	-3.528
INT	%95.70	0.990	-3.428
Actin	%95.00	0.979	-3.449

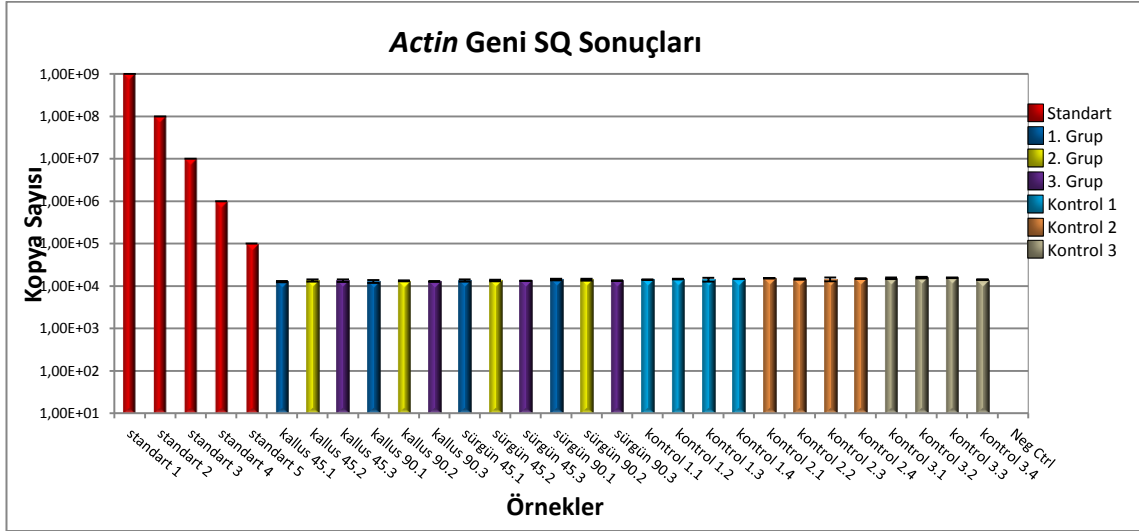
Standartların qPCR’da kullanılabilecek kalitede olduğuna E (“efficiency”), R² ve Eğim (Slope) değerlerine bakılarak karar verildi. qPCR’da, etkinlik derecesini gösteren E değerinin %95-105 arasında, eğim (Slope) değerinin, -3.32’ye yakın ve R² değerinin 0-1 arasında 1’e yakın olması beklenir. Elde edilen sonuçlar tüm plazmit serilerinin qPCR standart eğrisi oluşturmak için uygunu gösterdi.

qPCR için kullanılacak tüm DNA kalıplarının konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve 10 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı. Buna karşın spektrofotometrik ölçümlerden kaynaklanabilecek hatalardan dolayı tüm örneklerin eşit konsantrasyonda olduğunu doğrulamak için kopya sayısı değişiklik göstermeyen bir referans gen (*Actin*) için qPCR yapıldı. *Actin* geni için yapılan qPCR’da tüm örneklerin kantifikasyon döngüsü (“quantification cycle” - Cq) değerlerinin 28-29. reaksiyon döngüleri arasında olduğu görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: *Actin* geni qPCR Cq değerleri
qPCR her örnek için iki tekrarlı yapılmıştır. Şekilde ortalama Cq değerleri verilmiştir.

Elde edilen Cq değerleri ile kopya sayısı bilinen standart plazmitler karşılaştırılarak, *Actin* geninin 10 ng genomik DNA'daki kopya sayısının ("Starting Quantity" - SQ) tüm örneklerde $1.27-1.59 \times 10^4$ arasında değişiklik gösterdiği bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: *Actin* geni qPCR SQ değerleri
qPCR her örnek için iki tekrarlı yapılmıştır. Şekilde ortalama SQ değerleri verilmiştir.

Örneklerde görülen *Actin* geni kopya sayıları arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı SPSS (Version 15.0) programında One-Way ANOVA testi ile analiz edildi. Bu amaçla H1 ve H0 (Null) hipotezleri aşağıdaki şekilde kuruldu.

H1: Örnekler arasında görülen *Actin* geni kopya sayısındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

H0: Örnekler arasında görülen *Actin* geni kopya sayısındaki farklılıklar tesadüften ileri gelmektedir.

Analiz sonucunda "probability" (p) değeri 0.456 olarak bulundu. $p > 0.05$ olduğu için H1 hipotezi reddedildi ve *Actin* geninin kopya sayısındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu kabul edildi. Elde edilen bu sonuç qPCR'da kullanılan tüm DNA kalıplarının eşit konsantrasyonda olduğunu kanıtladı.

DNA kalıbı konsantrasyonlarının eşit olduğunun doğrulanmasının ardından *BAGY2* ara domenlerinin qPCR'ı gerçekleştirildi. Tüm reaksiyonlar deneysel hata oranını azaltmak

için iki tekrarlı olarak yapıldı. Her domen için elde edilen Cq ve SQ değerlerinin ortalamaları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: BAGY2 domenlerinin Cq ve SQ sonuçları ortalamaları

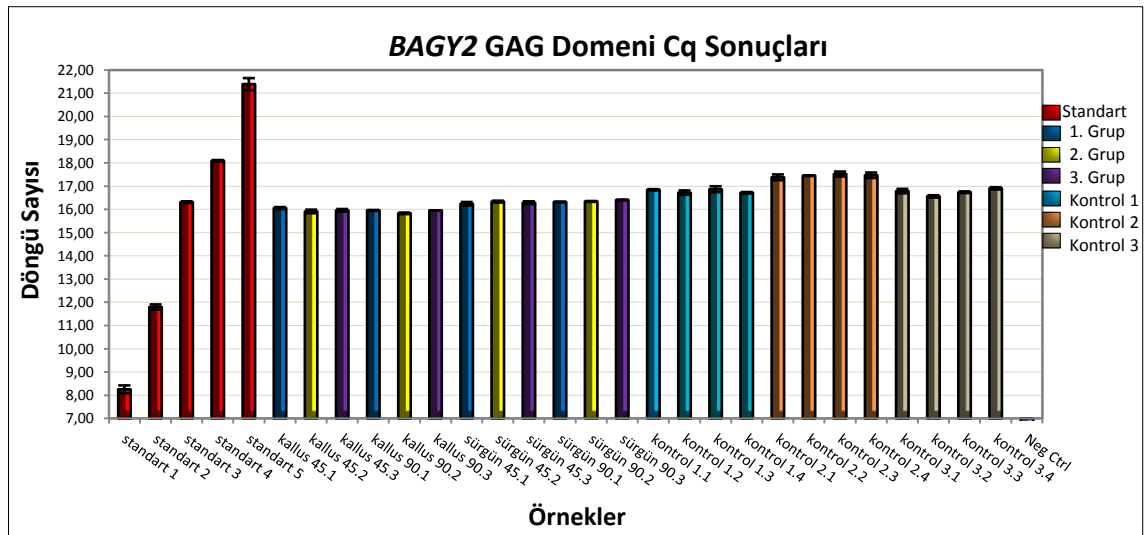
	GAG		PR		RT		RH		INT	
	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ
Std 1	8,26	1,00x10 ⁹	8,73	1,00x10 ⁹	9,96	1,00x10 ⁹	10,10	1,00x10 ⁹	11,53	1,00x10 ⁹
Std 2	11,80	1,00x10 ⁸	12,29	1,00x10 ⁸	13,15	1,00x10 ⁸	13,38	1,00x10 ⁸	14,56	1,00x10 ⁸
Std 3	16,31	1,00x10 ⁷	16,65	1,00x10 ⁷	17,23	1,00x10 ⁷	17,90	1,00x10 ⁷	19,34	1,00x10 ⁷
Std 4	18,09	1,00x10 ⁶	18,36	1,00x10 ⁶	19,38	1,00x10 ⁶	20,79	1,00x10 ⁶	21,82	1,00x10 ⁶
Std 5	21,39	1,00x10 ⁵	21,86	1,00x10 ⁵	23,22	1,00x10 ⁵	24,03	1,00x10 ⁵	25,04	1,00x10 ⁵
K45.1	16,06	5,34x10 ⁶	14,25	2,58x10 ⁷	16,74	8,97x10 ⁶	21,01	8,57x10 ⁵	12,76	4,59x10 ⁸
K45.2	15,91	5,93x10 ⁶	14,17	2,73x10 ⁷	16,95	7,77x10 ⁶	20,92	9,11x10 ⁵	12,70	4,78x10 ⁸
K45.3	15,96	5,74x10 ⁶	14,02	3,04x10 ⁷	16,79	8,64x10 ⁶	20,85	9,46x10 ⁵	12,75	4,63x10 ⁸
K90.1	15,96	5,73x10 ⁶	14,42	2,29x10 ⁷	16,77	8,81x10 ⁶	20,85	9,47x10 ⁵	12,75	4,61x10 ⁸
K90.2	15,83	6,27x10 ⁶	14,24	2,60x10 ⁷	17,22	6,41x10 ⁶	20,91	9,12x10 ⁵	12,75	4,61x10 ⁸
K90.3	15,95	5,74x10 ⁶	14,70	1,92x10 ⁷	17,20	6,50x10 ⁶	20,81	9,73x10 ⁵	12,77	4,57x10 ⁸
S45.1	16,24	4,69x10 ⁶	15,00	1,51x10 ⁷	17,60	4,92x10 ⁶	20,95	8,90x10 ⁵	16,12	4,82x10 ⁷
S45.2	16,34	4,38x10 ⁶	14,94	1,59x10 ⁷	17,26	6,24x10 ⁶	20,99	8,64x10 ⁵	15,93	5,49x10 ⁷
S45.3	16,29	4,54x10 ⁶	14,80	1,75x10 ⁷	17,23	6,38x10 ⁶	20,90	9,15x10 ⁵	15,83	5,83x10 ⁷
S90.1	16,32	4,44x10 ⁶	14,62	1,98x10 ⁷	17,27	6,20x10 ⁶	21,09	8,14x10 ⁵	15,85	5,74x10 ⁷
S90.2	16,34	4,37x10 ⁶	14,73	1,83x10 ⁷	17,23	6,38x10 ⁶	20,92	9,07x10 ⁵	16,15	4,70x10 ⁷
S90.3	16,40	4,18x10 ⁶	14,45	2,25x10 ⁷	17,41	5,59x10 ⁶	20,99	8,63x10 ⁵	16,56	3,56x10 ⁷
K1.1	16,84	3,06x10 ⁶	15,24	1,27x10 ⁷	17,17	6,66x10 ⁶	21,96	4,62x10 ⁵	17,94	1,42x10 ⁷
K1.2	16,72	3,35x10 ⁶	15,18	1,33x10 ⁷	17,17	6,65x10 ⁶	21,90	4,77x10 ⁵	17,90	1,45x10 ⁷
K1.3	16,86	3,02x10 ⁶	15,23	1,29x10 ⁷	17,19	6,54x10 ⁶	21,88	4,85x10 ⁵	17,94	1,41x10 ⁷
K1.4	16,71	3,35x10 ⁶	15,23	1,29x10 ⁷	17,19	6,56x10 ⁶	21,86	4,91x10 ⁵	17,86	1,49x10 ⁷
K2.1	17,38	2,10x10 ⁶	15,81	8,47x10 ⁶	18,35	2,90x10 ⁶	22,85	2,57x10 ⁵	18,83	7,78x10 ⁶
K2.2	17,45	1,99x10 ⁶	15,87	8,16x10 ⁶	18,36	2,88x10 ⁶	22,91	2,47x10 ⁵	18,95	7,18x10 ⁶
K2.3	17,52	1,90x10 ⁶	15,89	8,03x10 ⁶	18,33	2,94x10 ⁶	22,97	2,38x10 ⁵	18,95	7,20x10 ⁶
K2.4	17,47	1,97x10 ⁶	15,87	8,16x10 ⁶	18,20	3,24x10 ⁶	22,95	2,41x10 ⁵	18,85	7,67x10 ⁶
K3.1	16,79	3,19x10 ⁶	15,12	1,39x10 ⁷	17,19	6,54x10 ⁶	21,80	5,11x10 ⁵	17,76	1,59x10 ⁷
K3.2	16,56	3,74x10 ⁶	15,14	1,37x10 ⁷	17,22	6,39x10 ⁶	21,78	5,17x10 ⁵	17,78	1,57x10 ⁷
K3.3	16,74	3,30x10 ⁶	15,24	1,28x10 ⁷	17,18	6,59x10 ⁶	21,82	5,02x10 ⁵	17,85	1,50x10 ⁷
K3.4	16,91	2,93x10 ⁶	15,24	1,28x10 ⁷	17,26	6,21x10 ⁶	21,97	4,56x10 ⁵	17,94	1,41x10 ⁷
N. K.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

qPCR analizleri sonucunda hem kontrol grupları ve doku kültürü örnekleri arasında hem de doku kültürü örneklerinin kendi arasında tüm domenlerin kopya sayılarında farklılık olduğu tespit edildi. Gözlemlenen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One-Way ANOVA testi ile analiz edildi. Bu amaçla tüm örnekler; 45 günlük kalluslar (1. Grup), 90 günlük kalluslar (2. Grup), 45 günlük kallusların sürgünleri (3. Grup), 90 günlük kallusların sürgünleri (4. Grup), Kontrol 1 (5. Grup), Kontrol 2 (6. Grup) ve Kontrol 3 (7. Grup) olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Gruplar arasındaki farklılığın testi için H1 ve H0 hipotezleri kuruldu.

H1: Doku kültürü süresi, arpa kalluslarında ve kalluslardan rejenere olan sürgünlerde BAGY2 ara domenlerinin kopya sayısında istatistiksel açıdan önemli bir artışa sebep olmuştur.

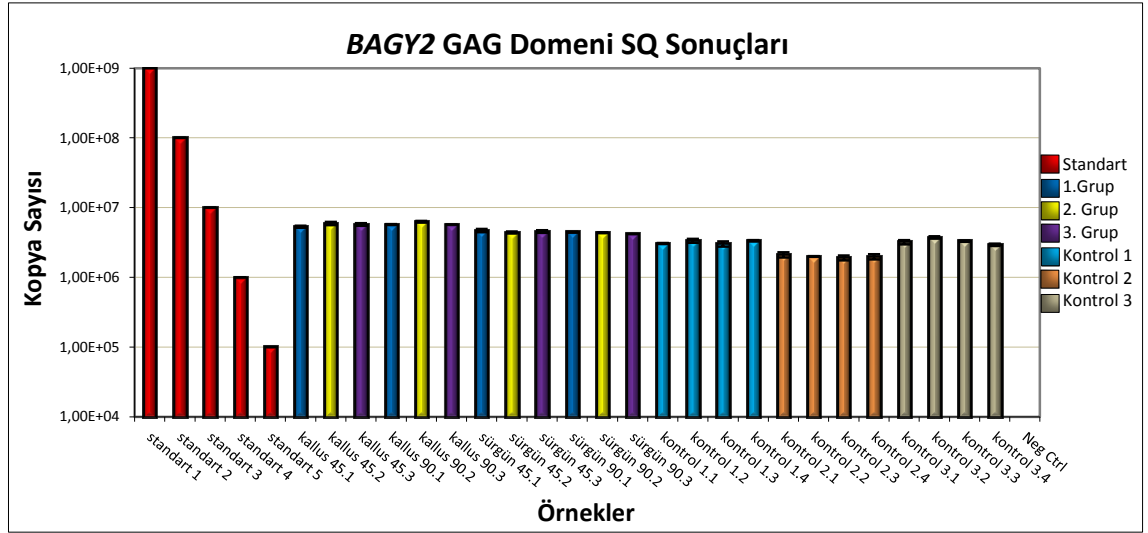
H0: Doku kültürü süresinin arpa kalluslarında ve kalluslardan rejenere olan sürgünlerde BAGY2 ara domenlerinin kopya sayısındaki artışa bir etkisi yoktur. Gözlemlenen farklılıklar tesadüften ileri gelmektedir.

BAGY2 GAG domeni için yapılan qPCR sonucunda örneklerin Cq değerlerinin 15.83 ile 17.52 reaksiyon döngüleri arasında olduğu görüldü (Şekil 4.16). Elde edilen Cq değerleri ile GAG domeni kopya sayısının örneklerde, 1.90×10^6 ve 6.27×10^6 arasında değişiklik gösterdiği bulundu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: BAGY2 GAG domeni qPCR Cq değerleri

GAG domeni qPCR-SQ değerleri kullanılarak yapılan One-Way ANOVA testi sonucunda gruplar arasında görülen varyasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Bununla birlikte görülen varyasyonun homojenitesine bakıldı ve $p = 0.251$ olarak bulundu. Homojenite testi sonucuna göre $p > 0.05$ olduğu için grupların homojen bir varyasyon gösterdiği kabul edildi ve hangi gruplar arasındaki varyasyonların anlamlı olduğunu belirlemek için Tukey testi ile çoklu karşılaştırma yapıldı (Tablo 4.6).



Şekil 4.18: BAGY2 GAG domeni qPCR SQ değerleri

Tablo 4.6: GAG domeni için yapılan Tukey testi p değerleri

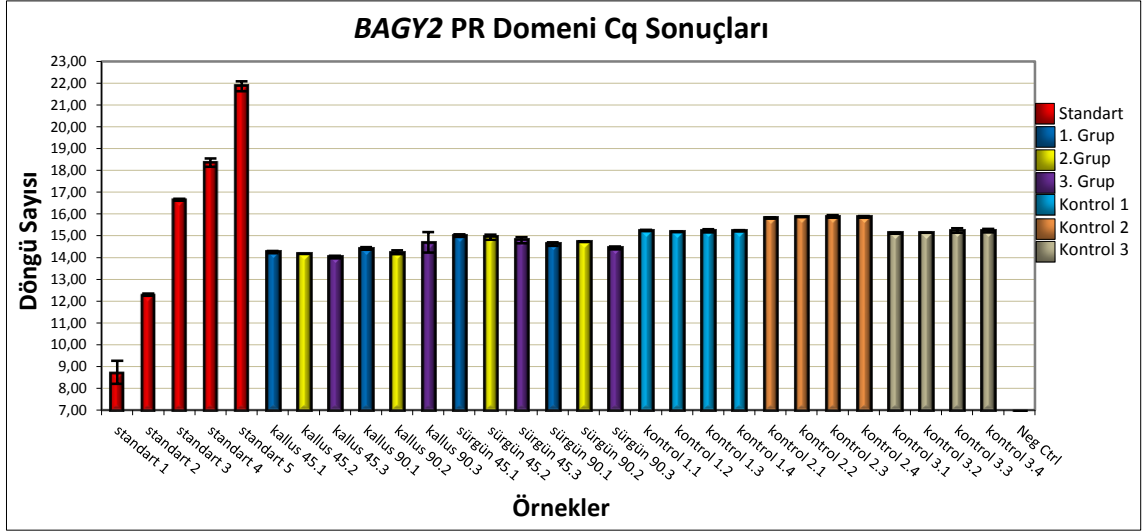
	Kallus 90	Sürgün 45	Sürgün 90	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3
Kallus 45	0.847*	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Kallus 90	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sürgün 45		-	0.922*	0.001	0.001	0.001
Sürgün 90			-	0.001	0.001	0.001
Kontrol 1				-	0.001	0.997*
Kontrol 2					-	0.001

*p>0.05

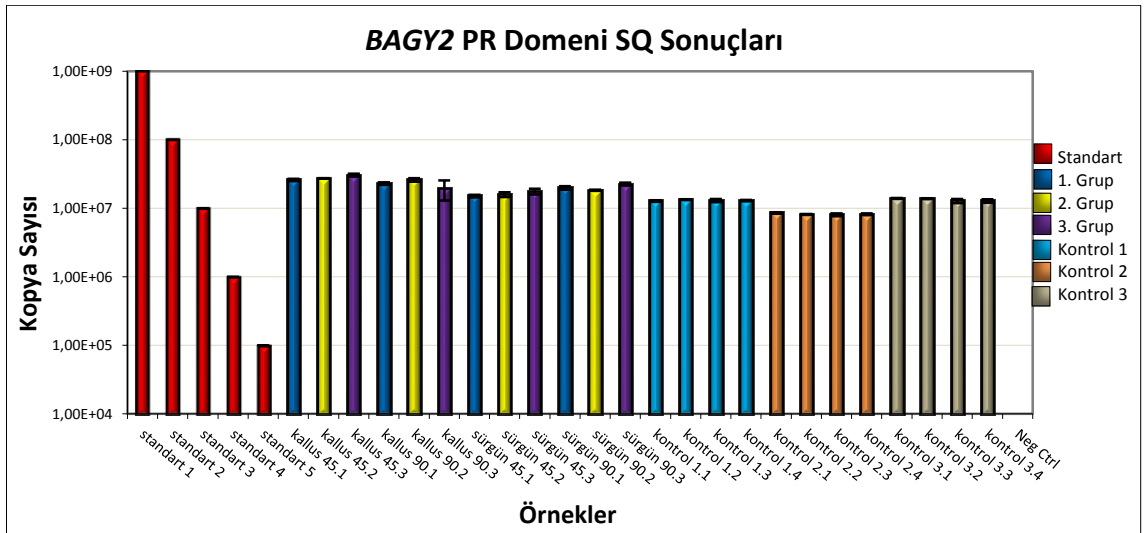
Tukey testi sonucunda; Kallus 45/Kallus 90, Sürgün 45/Sürgün 90 ve Kontrol 1/Kontrol 3 grupları arasında GAG domeni kopya sayısı bakımında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$). Diğer örneklerin karşılaştırmalarında varyasyonun önemli olduğu görüldü ($p<0.05$)

BAGY2 PR domeninin örneklerdeki kopya sayılarını belirlemek için yapılan qPCR sonucunda, Cq değerlerinin 14.02 ve 15.89 reaksiyon döngüleri arasında olduğu bulundu (Şekil 4.18). Elde edilen Cq değerlerine göre PR domeni kopya sayısının tüm örneklerde 8.03×10^6 ile 3.04×10^7 arasında değişiklik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.19).

PR domeni için yapılan One-Way ANOVA testi sonucunda gruplar arasındaki varyasyonun istatistiksel açıdan önemli olduğu görüldü ($p<0.05$). Bununla birlikte grupların homojen bir varyasyon göstermediği bulundu ($p=0.020$). Hangi gruplar arasındaki varyasyonların anlamlı olduğunu belirlemek için Games Howell testi ile çoklu karşılaştırma yapıldı (Tablo 4.7).



Şekil 4.19: BAGY2 PR domeni qPCR Cq değerleri



Şekil 4.20: BAGY2 PR domeni qPCR SQ değerleri

Tablo 4.7: PR domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri

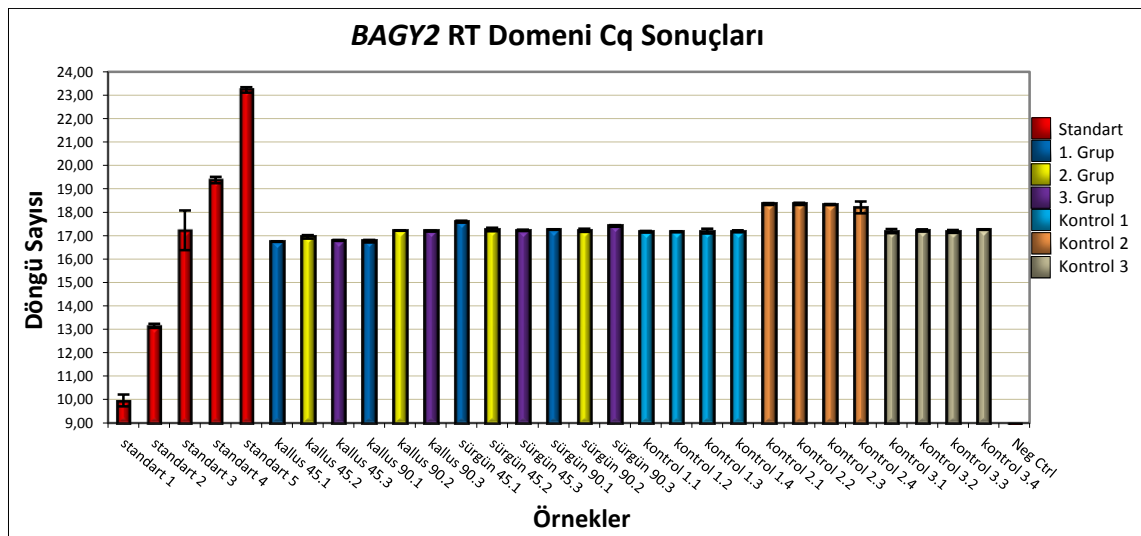
	Kallus 90	Sürgün 45	Sürgün 90	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3
Kallus 45	0.468*	0.025	0.090*	0.032	0.019	0.028
Kallus 90	-	0.268*	0.900*	0.142*	0.068*	0.147*
Sürgün 45		-	0.279*	0.169*	0.030	0.188*
Sürgün 90			-	0.101*	0.039	0.100*
Kontrol 1				-	0.001	0.923*
Kontrol 2					-	0.001

*p>0.05

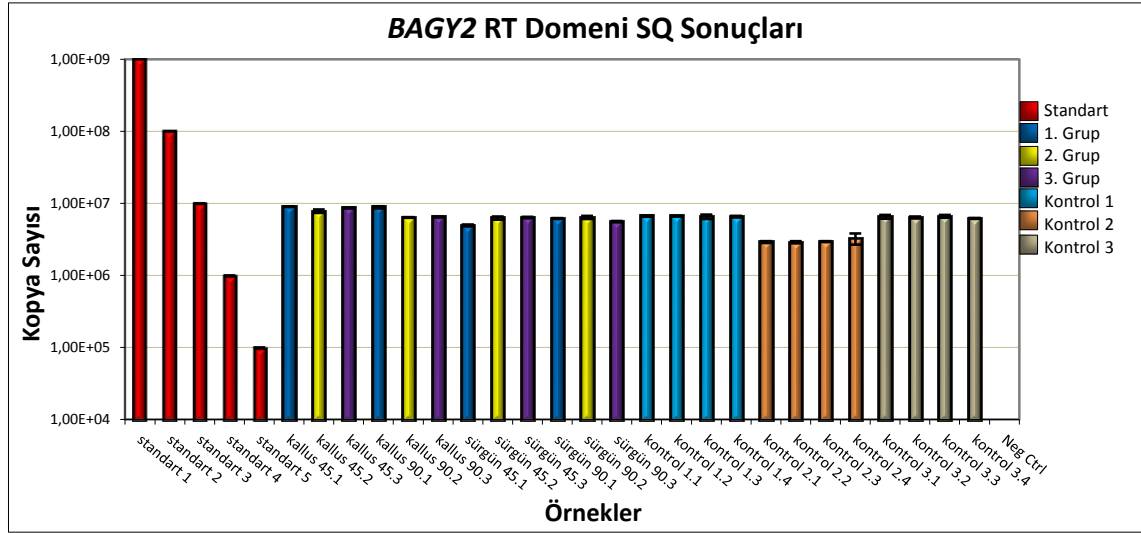
Grupların çoklu karşılaştırması sonucunda; Kallus 45/Sürgün 45, Kallus 45/Kontrol 1, 2, 3, Sürgün 45/Kontrol 2, Sürgün 90/Kontrol 2, Kontrol 1/Kontrol 2, Kontrol 3/Kontrol 2 grupları arasında görülen PR domeni kopya sayısı farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$).

BAGY2 RT domeninin qPCR sonucunda, en düşük Cq değerinin 16.74 ve en yüksek Cq değerinin 18.36 olduğu görüldü (Şekil 4.20). Elde edilen bu Cq değerlerine göre RT domeninin en düşük kopya sayısının Kontrol 2 örneğinde (2.88×10^6), en yüksek kopya sayısının ise 45 günlük kallusta (8.97×10^6) olduğu tespit edildi (Şekil 4.21).

One-Way ANOVA testi ile analiz edilen RT domeni qPCR-SQ değerleri, gruplar arasında görülen RT domeni kopya sayısı değişikliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu kanıtladı ($p<0.05$). Anlamlı olarak bulunan bu varyasyonun homojenitesine bakıldığında $p<0.05$ olduğu ve bu nedenle grupların varyasyonunun homojen olmadığı görüldü. Gruplar homojen olmayan bir varyasyon gösterdiğinden dolayı çoklu karşılaştırma analizi için Games Howell testi kullanıldı (Tablo 4.8). Grupların RT domeni kopya sayısı farklılıkları bakımında çoklu karşılaştırması sonucunda, sadece 5 grup (Kallus 45/Sürgün 90, Kallus 45/Kontrol 2, Sürgün 90/Kontrol 2, Kontrol 2/Kontrol 1, 3) arasındaki varyasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$).



Şekil 4.21: BAGY2 RT domeni qPCR Cq değerleri



Şekil 4.22: BAGY2 RT domeni qPCR SQ değerleri

Tablo 4.8: RT domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri

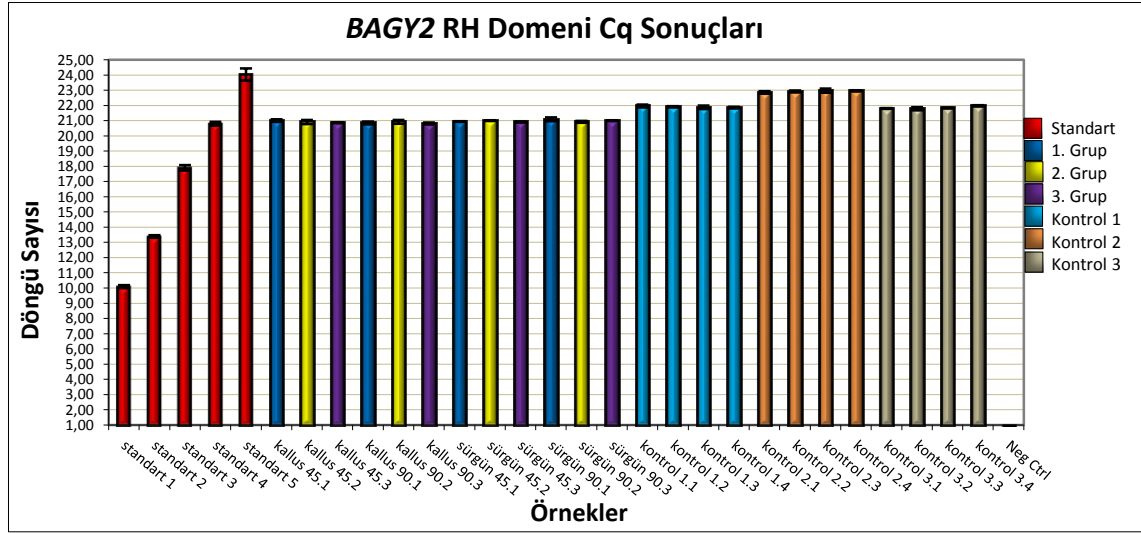
	Kallus 90	Sürgün 45	Sürgün 90	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3
Kallus 45	0.777*	0.079*	0.046	0.134*	0.013	0.104*
Kallus 90	-	0.730*	0.769*	0.961*	0.123*	0.912*
Sürgün 45		-	0.999*	0.700*	0.092*	0.838*
Sürgün 90			-	0.498*	0.014	0.753*
Kontrol 1				-	0.001	0.582*
Kontrol 2					-	0.001

*p>0.05

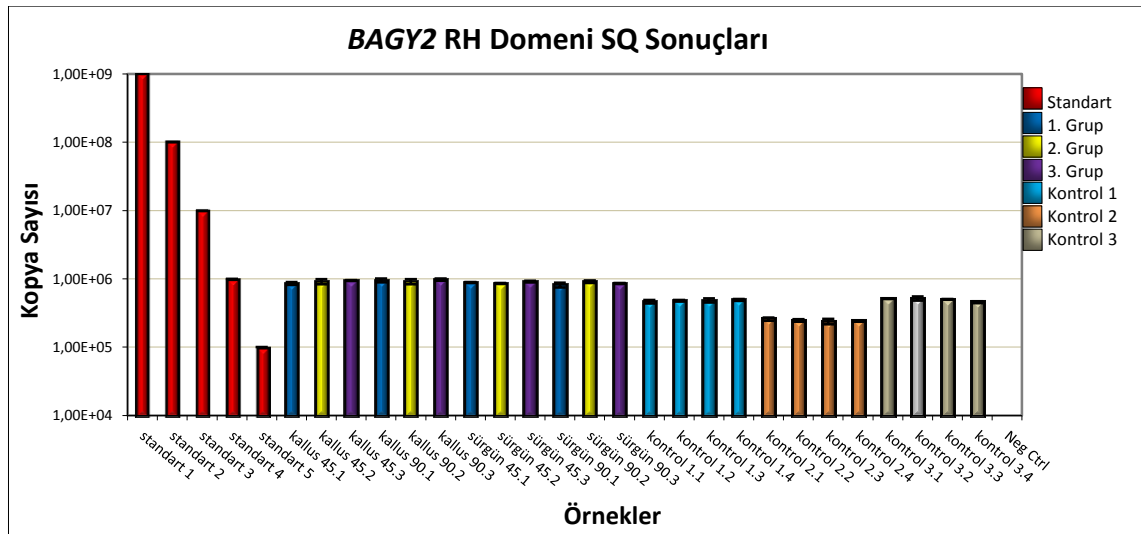
BAGY2 RH domeni qPCR analizi sonucunda, örneklerin Cq değerlerinin 20.81 ile 22.97 reaksiyon döngüleri arasında olduğu (Şekil 4.22) ve RH domeni kopya sayısının ise örneklerde 2.38×10^5 ile 9.73×10^5 arasında değişiklik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.23). RH domeni qPCR-SQ değerleri One-Way ANOVA testi ile analiz edildi ve gruplar arasında görülen RH domeni kopya sayısı farklılığının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Bununla birlikte varyasyonun homojenitesi test edildiğinde $p > 0.05$ olarak bulundu ve homojen bir dağılım görüldüğü için Tukey testi ile gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldı (Tablo 4.9).

Elde edilen sonuçlara göre; doku kültürü örnekleri arasında sadece Kallus 90/Sürgün 90 grupları arasındaki RH domeni kopya sayısı farklılığının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p < 0.05$). Bununla birlikte her 3 Kontrol grubunun diğer örneklerle karşılaştırılması sonucunda da anlamlı farklılıklar elde edildi. Kontrol grupları arasında

sadece Kontrol 1/Kontrol 3 karşılaştırmasından anlamlı bir farklılık elde edilemedi ($p>0.05$).



Şekil 4.23: BAGY2 RH domeni qPCR Cq değerleri



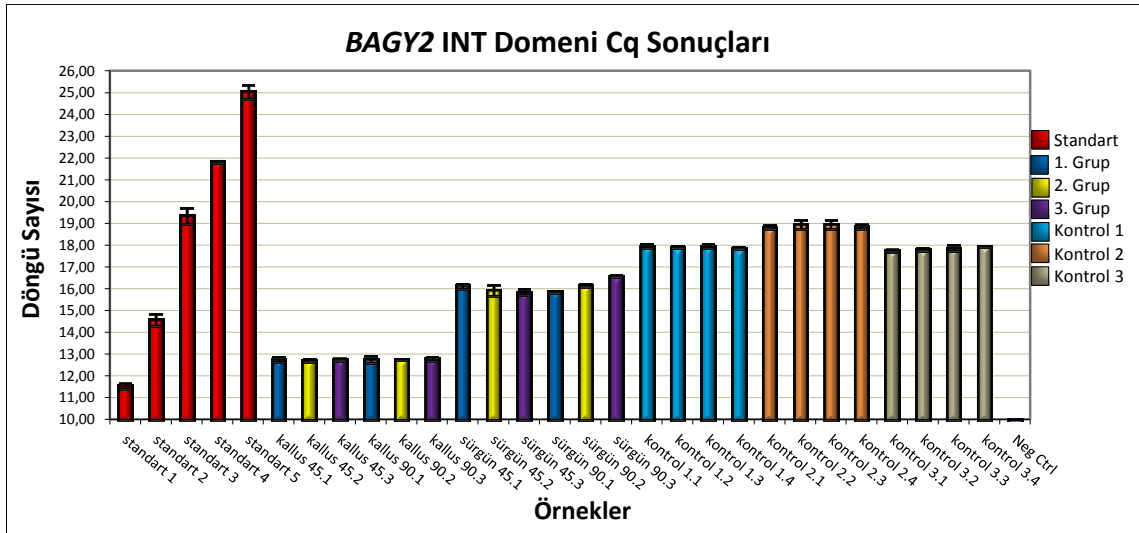
Şekil 4.24: BAGY2 RH domeni qPCR SQ değerleri

Tablo 4.9: RH domeni için yapılan Tukey testi p değerleri

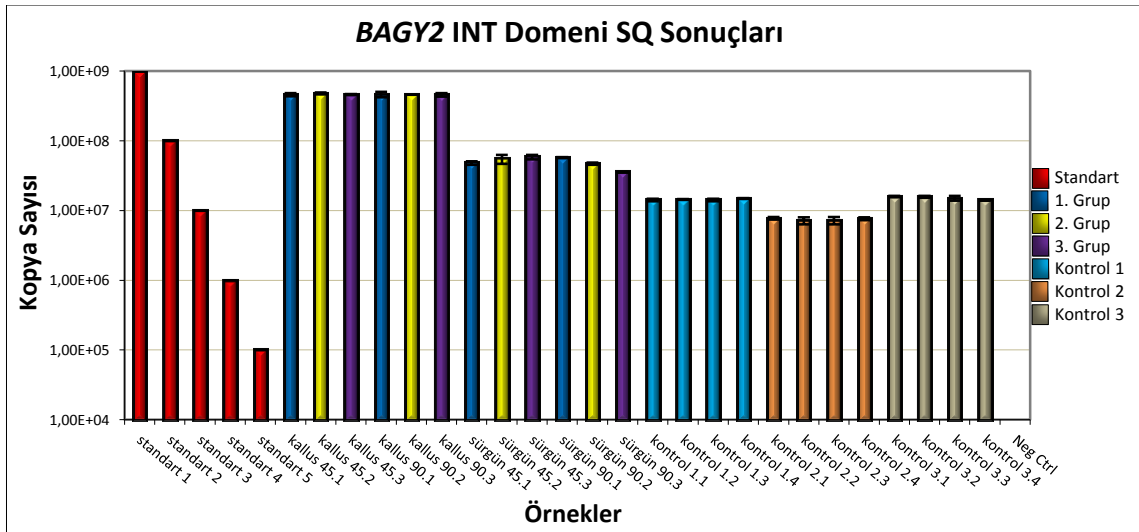
	Kallus 90	Sürgün 45	Sürgün 90	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3
Kallus 45	0.648*	0.995*	0.562*	0.001	0.001	0.001
Kallus 90	-	0.308*	0.038	0.001	0.001	0.001
Sürgün 45		-	0.889*	0.001	0.001	0.001
Sürgün 90			-	0.001	0.001	0.001
Kontrol 1				-	0.001	0.973*
Kontrol 2					-	0.001

* $p>0.05$

BAGY2 INT ara domeninin örneklerdeki kopya sayısını belirlemek için yapılan qPCR analizinde Cq değerlerinin 12.70 ile 18.95 gibi geniş bir aralıkta olduğu görüldü (Şekil 4.24). Örneklerin Cq değerleri arasındaki bu büyük farklılık INT domeninin kopya sayısındaki değişikliğin diğer domenlere oranla daha yüksek olduğunu gösterdi. En yüksek kopya sayısına sahip olan grubun 45 günlük kallus (4.78×10^8) ve en düşük kopya sayısına (7.18×10^6) sahip olan grubun ise Kontrol 2 olduğu belirlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: BAGY2 INT domeni qPCR Cq değerleri



Şekil 4.26: BAGY2 INT domeni qPCR SQ değerleri

INT domeni qPCR-SQ değerleri One-Way ANOVA testi ile analiz edildi ve gruplar arasında görülen INT domeni kopya sayısı farklılığının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$). Varyasyonun homojenitesi test edildiğinde ise $p<0.05$ olarak bulundu ve homojen bir varyasyon dağılımı olmadığı için örneklerin çoklu karşılaştırması Games Howell testi ile yapıldı (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: INT domeni için yapılan Games Howell testi p değerleri

	Kallus 90	Sürgün 45	Sürgün 90	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3
Kallus 45	0.860*	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Kallus 90	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sürgün 45		-	0.918*	0.022	0.016	0.021
Sürgün 90			-	0.137*	0.096*	0.143*
Kontrol 1				-	0.001	0.628*
Kontrol 2					-	0.001

* $p>0.05$

Elde edilen sonuçlara göre; Kallus 45/Kallus 90, Sürgün 45/Sürgün 90, Sürgün 90/Kontrol 1, 2, 3 ve Kontrol 1/Kontrol 3 grupları arasındaki INT domeni kopya sayısı farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, doku kültürü süresine bağlı olarak meydana gelen *BAGY2* retrotranspozon hareketleri, kalluslarda ve sürgünlerde IRAP marker tekniği kullanılarak araştırıldı. *BAGY2* ara domenlerinin dizi analizleri de yapıldı ve qPCR ile kopya sayıları belirlendi.

5.1. KONTROL ÖRNEKLERİNİN IRAP DEĞERLENDİRMELERİ

Kontrol 1 (embriyo) ile yapılan IRAP-PCR sonuçlarına göre; bu grupta yer alan 4 örneğin grup içinde homomorfik bir bant profili oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.3, 1-4 no'lu örnekler). Daha önce farklı retrotranspozonlar için yapılan IRAP-PCR sonuçlarında da embriyolar arasında polimorfizm tespit edilememiştir (Bayram ve diğ., 2012; Hamat-Mecbur ve diğ., 2012). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumludur ve bireyler arasında *BAGY2* retrotranspozon hareketlerine bağlı bir polimorfizm olmadığının göstergesi olabilir.

BAGY2, Leigh ve diğ., (2003) tarafından arpada bulunan en aktif ikinci retrotranspozon olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte *BAGY2* transkripti, daha önce embriyo, yaprak, kök, kallus, çiçek ve diğer üreme organlarında tespit edilmiştir (Vicient ve diğ., 2001a; Maraklı ve diğ., 2012). Aktivitesi bu kadar yüksek olmasına karşın IRAP-PCR sonuçlarına göre polimorfizm tespit edilememesi iki şekilde yorumlanabilir. Bunlardan ilki; *BAGY2*'nin hayat döngüsü aynı varyetenin bireyleri arasında evrimsel süreçte korunmuş olabilir. Embriyoda aktif olarak transkribe olması insersiyonel olarak da aktif olduğunun bir göstergesi olmayabilir. Polimorfizm görülmemesinin diğer bir nedeni; IRAP marker tekniğinin aynı varyetenin bireyleri arasındaki polimorfizmi tespit etmekte yetersiz kalması olabilir. IRAP sonucunda oluşan PCR ürünlerinden sadece 1000 bp'den küçük olanlar değerlendirilebilmiştir. Eğer embriyolar arasında *BAGY2* hareketi sonucunda oluşan insersiyonel polimorfizm 1000 bp'den büyük DNA bantları oluşturuyorsa, bu IRAP ile tespit edilememiş olabilir.

Kontrol 2 (filtre kağıdında çimlendirilen fidelerin yaprakları) örnekleri de IRAP-PCR sonuçlarında grup içinde polimorfizm göstermedi. Bu durum; çimlenme sonrasında da *BAGY2* retrotranspozonunun insersiyonel aktivitesinin bireyler arasında korunmuş olduğunun göstergesi olabilir. Buna karşın Kontrol 1 ve 2 örneklerine ait IRAP-PCR sonuçları karşılaştırıldığına, iki grup arasında %8 polimorfizm görüldü. Polimorfizm oranı yüksek olmamasına karşın bu durum, *BAGY2*'nin farklı organlardaki insersiyonel aktivitesinin farklı olabileceğini gösterir. Kontrol 2'de bulunan ve Kontrol 1'de bulunmayan iki bant (Şekil 4.3, b ile gösterilen oklar) yaprak gelişiminin sonraki aşamalarında meydana gelen *BAGY2* hareketlerinden kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte, Kontrol 1 örneklerinde bulunan bir bandın (Şekil 4.3, a ile gösterilen ok) Kontrol 2'de bulunmaması, *BAGY2*'nin embriyoda bulunan diğer organlardaki insersiyon profilinin yapraktakinden farklı olduğunu göstermektedir. *BAGY2*'nin farklı organlarda insersiyonel polimorfizm göstermesi, organların gelişimi sırasında bir işlevi olduğunun göstergesi olabilir. Bununla birlikte, *BAGY2*'nin hayat döngüsünün dokuya özgü olduğunun da kanıtı olabilir.

Benzer bir çalışmada, arpa yaprak ve embriyolarının IRAP marker tekniği ile karşılaştırılması sonucunda, *BARE1*'in %44 polimorfizm gösterirken *BAGY2*'nin polimorfizm göstermediği bulunmuştur (Maraklı ve diğ., 2012). Bu çalışmada embriyo ve yaprak arasında görülen %8'lik polimorfizm oranı, kullanılan arpa varyetelerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca *BARE1*'de görülen polimorfizm oranının (%44) *BAGY2*'den yüksek olması, daha önce literatürde de belirtildiği gibi, *BAGY2*'nin daha düşük aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Leigh ve diğ., 2003).

Kontrol 3 (MS0 besi yerinde çimlendirilmiş fidelerin yaprakları) örneklerinin IRAP-PCR sonuçları da Kontrol 2 ile aynıdır. Her iki grubun da yaprak materyali olmasına karşın çimlenme sırasında Kontrol 2 grubu endosperm dokusunu besin kaynağı olarak kullanırken, Kontrol 3 grubu yapay besi yeri kullanmıştır. İki grup arasında polimorfizm görülmemesi, besi yeri bileşenlerinin çimlenme sırasında yapraktaki *BAGY2* hareketlerini etkilememiş olduğunu gösterebilir.

5.2. DOKU KÜLTÜRÜ ÖRNEKLERİNİN IRAP DEĞERLENDİRMELERİ

Doku kültürü süresinin *BAGY2* insersiyonel aktivitesine bir etkisi olup olmadığını araştırmak için aynı embriyodan köken alan 45 ve 90 günlük kalluslar ve bu kalluslardan rejenere olan sürgünler kullanıldı. Bu şekilde tek bir embriyodan elde edilen 4 örnek (45, 90 günlük kalluslar ve rejenerantları) bir grup olarak kabul edildi. Farklı embriyolardan gelişen aynı kültür süresine sahip kallus ve sürgünlerdeki polimorfizmi belirlemek için çalışmalar 3 grup üzerinden yürütüldü.

Doku kültürü örneklerinin IRAP-PCR sonuçlarında birbirinden farklı pek çok polimorfik bant elde edildi (Şekil 4.4). Tüm örnekler karşılaştırıldığında polimorfizm oranının %0-20 (Tablo 4.1) arasında değişiklik gösterdiği bulundu.

1. Grupta yer alan örnekler kendi içinde değerlendirildiklerinde (Şekil 4.4, 2-5 nolu örnekler), polimorfizm oranının %0-19 arasında değiştiği görüldü. 45 günlük kallus ile Kontrol 1 örneklerinin karşılaştırılması sonucunda polimorfizm oranının %5 olduğu görüldü. Kontrol 1 örneklerinin (Şekil 4.3, 1-4 nolu örnekler) kendi içinde homomorfik olduğunun bulunması sonucuna dayanarak, bireyler arasında *BAGY2* insersiyonlarına bağlı doğal bir polimorfizm olmadığı gözlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, görülen bu %5'lik polimorfizm oranı, 45 günlük doku kültürü süresinin *BAGY2* aktivitesini etkilediğinin göstergesi olabilir. Yine bu grupta yer alan 90 günlük kallus ile Kontrol 1 örnekleri karşılaştırıldığında polimorfizm oranının %20 olduğu görüldü. Aynı embriyodan köken almalarına karşın 90 günlük kallusun 45 günlüğe oranla daha yüksek bir polimorfizm göstermesi, uzatılan doku kültürü süresinin *BAGY2* aktivitesi üzerine daha yüksek bir etkiye bulunduğu kanıtı olabilir. Buna karşın bu grupta yer alan 45 günlük kallustan rejenere olan sürgün, Kontrol 2 ve 3 örnekleri ile karşılaştırıldığında düşük bir polimorfizm oranı bulundu (%3). Bununla birlikte yaprak dokusuna özgün olan bantların (Şekil 4.3, b ile gösterilen oklar) bu sürgünde de bulunması rejenerasyon için *BAGY2* aktivitesine gerek olabileceğini göstermektedir. Kallus dokusunda görülen genetik ve epigenetik değişiklikler daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Gözükırmızı ve diğ., 1990; Müller ve diğ., 1990; Temel ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2010). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak kallus dokusunda, genetik olarak

birbirinden farklı hücrelerin bulunabileceği söylenebilir. Bu durum somaklonal varyasyon olarak açıklanır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda 45 günlük kallusta görülen *BAGY2* insersiyonel polimorfizm oranının sürgüne oranla yüksek olması, genomu daha kararlı olan hücrelerin rejenerasyon için uygun olduğunun göstergesi olabilir. Benzer bir çalışmada Campbel ve diğ. (2011), IRAP marker tekniğini kullanarak 30 günlük arpa kalluslarından rejenere olan sürgünlerdeki *BARE1* polimorfizmini incelemişlerdir. Bu çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre, 147 sürgünün farklı oranlarda polimorfizm gösterdiğini ve ortalama polimorfizmin %16 olduğunu bildirmişlerdir. *BARE1*'de görülen %16'lık polimorfizm oranının *BAGY2*'ye (%3) oranla yüksek olması bu iki retrotranspozonun doku kültürü koşullarından farklı derecelerde etkilendiğini göstermektedir.

Diğer doku kültürü grupları (2. Grup ve 3. Grup) ile kontrol örneklerinin IRAP-PCR profili bakımından karşılaştırılmasında da benzer sonuçlar elde edildi. Buna karşın gruplar arasında görülen bant profillerinin farklı olması, doku kültürü süresi ve koşullarının, bireyler arasında farklı etkiler yapabileceğini 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.

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 düzenlemesinde DNA metilasyonunun önemli olduğu bildirilmiştir (Bennetzen ve diğ., 1994; Hirochika ve diğ., 2000; Liu ve diğ., 2004; Ngezahayo ve diğ., 2009). *BAGY2* transkripsiyonunun metilasyon mekanizması ile kontrol edildiği üzerine kesin kanıtlar bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında *BAGY2*'nin özellikle kallus kültürlerinde yüksek oranda polimorfizm göstermesi, kallusta meydana gelen metilasyon profili değişikliklerinden kaynaklanmış

olabilir. Bu durum DNA metilasyonunun, diğer retrotranspozonlarda olduğu gibi *BAGY2*'nin aktivitesinin düzenlenmesinde bir rolü olabileceğini göstermektedir.

5.3. *BAGY2* ARA DOMENLERİNİN KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİ

BAGY2 için yapılan IRAP çalışmasında görülen polimorfizmin, *BAGY2*'nin insersiyonel aktivitesinden kaynaklanmış olabileceğini kanıtlamak için qPCR ile ara domenlerin kopya sayıları belirlendi. Bu amaçla örnekler; 45 günlük kalluslar, 90 günlük kalluslar, 45 günlük kalluslardan rejenere olan sürgünler ve 90 günlük kalluslardan rejenere olan sürgünler olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu sınıflandırmanın amacı kültür yaşına ve doku tipine bağlı olarak *BAGY2* kopya sayısı değişimlerini değerlendirmektir.

GAG domeni için yapılan qPCR sonuçlarından elde edilen SQ değerleri One-Way ANOVA ile test edildi. Elde edilen sonuçlara göre örnekler arasındaki GAG domeni kopya sayısı değişikliğinin anlamlı olduğu bulundu ($p < 0.05$). Gruplar homojen bir varyans gösterdikleri için Tukey testi ile hangi grupların önemli farklılıklara sahip oldukları belirlendi. Tukey testinin sonuçlarına göre, sadece üç karşılaştırmanın (Kallus 45/Kallus 90, Sürgün 45/Sürgün 90, Kontrol 1/Kontrol3) önemli bir farklılık göstermediği bulundu ($p > 0.05$). Elde edilen bu sonuçlar, *BAGY2*'nin insersiyonel olarak aktif olduğunun istatistiksel kanıtıdır.

IRAP-PCR sonuçlarında 45 ve 90 günlük kalluslar, bant profilleri bakımından karşılaştırıldığında %0-20 arasında değişen bir polimorfizm tespit edilmiştir. Bu durumda, iki grup arasında istatistiksel bir farklılık olması beklenir. Tukey testinin sonuçlarına göre GAG domeni kopya sayısındaki değişim bu iki grup için anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). İki deney sonucunun çelişkili olması IRAP'ta gözlemlenen polimorfik bantların, kültürde görülen başka değişikliklerden (kromozom kırıkları ve başka transpozonların hareketleri) kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu duruma benzer şekilde, IRAP sonuçlarına göre Kontrol 2 ve 3 grupları arasında polimorfizm tespit edilememiş olmasına karşın, qPCR sonuçlarında Kontrol 3'te GAG domeninin daha fazla kopyası bulunduğu ve bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmesi, *BAGY2*'nin insersiyonel olarak aktif olduğunu göstermektedir. Bu farklılıkların IRAP ile tespit

edilememesi; *BAGY2* aktivitesi sonucunda oluşan polimorfik bantların 1000 bç'den büyük ya da bant profilinde bulunan diğer bantlarla aynı uzunlukta olmasından kaynaklanabilir.

Diğer domenlerin qPCR verilerinden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. qPCR sonuçlarının, IRAP-PCR ile belirlenen polimorfizm oranları ile benzerlik göstermemesi, bu marker sisteminin doku kültüründeki retrotranspozon temelli varyasyonları belirlemede tek başına yetersiz olabileceğini göstermektedir. Arpa genomunun yaklaşık olarak %80 oranında transpozonlardan oluştuğu ve bunların %38 kadarının henüz tanımlanamadığı bilinmektedir (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Arpa genomunun bu karmaşık yapısı nedeni ile IRAP gibi marker tekniklerinin retrotranspozon insersiyonlarına bağlı olan polimorfizmleri belirlemede yetersiz kalması olası bir durumdur. Li ve diğ. (2007) üç farklı marker sistemi (AFLP, SSAP, MSAP) kullanarak arpa rejenerantlarındaki genetik değişiklikleri araştırmışlardır. Elde ettikleri SSAP sonuçlarında *BARE1* retrotranspozonu için yaklaşık %20 varyasyon gözlemlemişlerdir. Buna karşın diziye özgü PCR yapıldığında bu polimorfik bantların *BARE1* insersiyonel polimorfizminden kaynaklanmadığını bulmuşlardır. Benzer şekilde Smykal ve diğ. (2007) arpa sürgünlerinde uyguladıkları IRAP marker tekniğinde bir polimorfizm gözlemezken, AFLP tekniğinde %18 MSAP tekniğinde ise %11 oranında varyasyon gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin literatür bilgileri ile benzer olması sonuçlarımızın doğruluğunu kuvvetlendirmektedir.

IRAP marker tekniği, uygulamasının kolay olması ve hızlı sonuç vermesi nedeni ile retrotranspozon hareketlerinden kaynaklanan polimorfizmlerin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir. Buna karşın elde edilen veriler sadece temel düzeydedir ve mutlaka başka uygulamalarla desteklenmesi gerekmektedir. Marker tekniklerinin insersiyonel polimorfizmleri belirlemede yetersiz kalması sorunu, birden fazla marker tekniğinin aynı çalışma için uygulanması ile giderilebilir. Böylece farklı marker tekniklerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak polimorfizm oranlarının güvenilirliği artırılabilir. Bununla birlikte birden fazla retrotranspozon çeşidinin IRAP-PCR sonuçları birlikte değerlendirilerek marker tekniğinin güvenilirliği artırılabilir. Bu tez çalışmasında

IRAP-PCR sonuçları qPCR analizleri ile birlikte değerlendirildiği için ikinci bir marker tekniği uygulanmamıştır.

qPCR ile tüm *BAGY2* domenlerinin kopya sayılarında artış olduğu belirlenmesine karşın her domende aynı oranda artış gözlenmemiştir. Domenler tek bir retrotranspozonda bir arada yer almaktadır. Bu nedenle retrotranspozonun her hareketi sırasında eşit oranda kopya sayısı artışı olması beklenir. Domenlerin kopya sayısındaki artışların birbirlerinden farklı olması, homolog rekombinasyonlar sonucunda ara domenlerin genomdan atılması ile açıklanabilir.

Wicker ve diğ. (2009) *BAGY2*'nin arpa genomunun yaklaşık olarak %5.15'ini oluşturduğu bildirmişlerdir. Bununla birlikte gemonda bulunan tüm *BAGY2* retrotranspozonları tam kopya halinde olmayabilir. Evrimsel süreçte pek çok *BAGY2* kopyası homolog rekombinasyonlar sonucunda domenlerinin hepsini ya da birkaçını kaybetmiş olabilir. Bu nedenle bir bitkinin genomunda, aynı retrotranspozona ait domenlerin sayıları farklılık gösterebilir.

Vicient ve diğ. (1999) arpada, *BARE1* RT ve INT domenlerinin kopya sayılarının farklı olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte Kalendar ve diğ. (2000) homolog rekombinasyonlarla ara domenlerin genomdan uzaklaştırılmasının, retrotranspozon aktiviteleri ile meydana gelen genom büyümesini azaltmak için evrimsel süreçte bitki genomu tarafından geliştirilen bir mekanizma olabileceğini savunmuşlardır.

Bir retrotranspozon ara domenlerin hepsine sahip olmasa bile diğer retrotranspozonların enzimlerini kullanarak hareket edebilir. Bu tez çalışmasında *BAGY2* domenlerinin farklı oranlarda artış göstermesi, tam kopya halinde olmayan *BAGY2* retrotranspozonlarının da hareket etmiş olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte genoma entegre olan *BAGY2*, tam kopya halinde olsa bile doku kültürü sürecinde ara domenlerinin bazılarını kaybetmiş olabilir. Böyle bir durumda domenlerin kopya sayılarının artışında bir paralellik beklenemez.

qPCR sonuçlarından elde edilen verilere dayanarak, *BAGY2*'nin insersiyonel aktivitesinin doku kültürü koşullarında arttığı ve bu artışın daha çok ilk 45 gün içinde

gerçekleştđđđ, ilerleyen kültür süresiyle sabitlendiđđđ görülmüştür. Bununla birlikte kallus örneklerine oranla sürgünlerde, domenlerin kopya sayılarının daha az olması rejenerasyon sırasında *BAGY2* aktivitesinin azaldıđđđın göstergesi olabilir.

Bugüne kadar doku kültürü koşullarında retrotranspozon aktivite deđđđikliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar genellikle tütün bitkisi ile yapılmıştır. Arpa ile yapılan benzer çalışmalarda ise *BARE1* retrotranspozonu incelenmiştir. *BAGY2* arpa genomunun yaklaşık %5.15'lik kısmını oluşturan aktif bir retrotranspozondur. Buna karşın literatürde *BAGY2*'nin stres koşullarındaki aktivite deđđđikliklerinin incelenmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ileride yapılacak olan çalışmalar için kaynak olacaktır.

KAYNAKLAR

<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/Seqfiles.total/TREP3162>, Ziyaret Tarihi: 15.03.2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/af254799.1>, Ziyaret Tarihi: 15.03.2012.

AALAMI, A., SAFIYAR, S., MANDOULAKANI, B.A., 2012, R-RAP: a retrotransposon-based DNA fingerprinting technique in plants, *Plantomics*, 5 (4), 359-364.

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*, 22 (3), 795-800.

ALBAYRAK, G., YORUK, E., DIKEN, O., 2012, Quantitative gene expression analysis of WRKY38 and DREB2 transcription factors responsible for drought and salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.), *New Biotechnology*, 29, 22.

ARGOUT, X., SALSE, J., AURY, J.M., GUILTINAN, M.J., DROC, G., ve diğ., 2011, The genome of *Theobroma cacao*, *Nature Genetics*, 43 (2), 101-109.

BADR, A., MULLER, K., SCHAFER-PREGL, R., EL RABEY, H., EFFGEN, S., IBRAHIM, H.H., POZZI, C., ROHDE, W., SALAMINI, F., 2000, On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.

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.

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., 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., 2000, Transposable elements contributions to plant gene and genom evolution, *Plant Molecular Biology*, 42 (1), 251-269.
- BENTO, M., PEREIRA, H.S., ROCHETA, M., GUSTAFSON, P., VIEGAS, W., SILVA, M., 2008, Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in *Triticale*, *Plos One*, 1402 (1), 1-11.
- BOEKE, J.D., EICHINGER, D., CASTRILLON, D., FINK, G.R., 1988, The *Saccharomyces cerevisiae* genome contains functional and nonfunctional copies of transposon Tyl, *Molecular and Cellular Biology*, 8 (4), 1432-1442.
- BONCHEV, G., GEORGIEV, S., PEARCE, S., 2010, Retrotransposons and ethyl methanesulfonate-induced diversity in hexaploid wheat and *Triticale*, *Central European Journal of Biology*, 5 (6), 765-776.
- BOTHMER, R., JACOBSEN, N., BADEN, C., JORGENSEN, R.B., LINDE-LAURSEN, I., 1995, An ecogeographical study of the genus *Hordeum*, 2nd ed., systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 929-0432-292.
- BOWEN, N.J., JORDAN, K.I., 2002, Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity, *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 65-76.
- BRATTHAUER, G.L., FANNING T.G., 1992, Active *LINE-1* retrotransposons in human testicular cancer, *Oncogene*, 7 (3), 507-517.
- CAI, Z., GUISINGER, M., KIM, H.G., RUCK, E., BLAZIER, J.C., MCMURTRY, V., KUEHL, J.V., BOORE, J., JANSEN, R.K., 2008, Extensive reorganization of the plastid genome of *Trifolium subterraneum* (Fabaceae) is associated with numerous repeated sequences and novel DNA insertions, *Journal of Molecular Evolution*, 67 (6), 696-704.
- 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*, 156, 337-345.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y., HSU, L., 1972, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69 (8), 2110-2114.
- COPELAND, C.S., MANN, V.H., MORALES, M.E., KALINNA, B.H., BRINDLEY, P.J., 2005, The *Sinbad* retrotransposon from the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*, and the distribution of related *Pao*-like elements, *BioMed Central Evolutionary Biology*, 5 (20), 1-18.

- CORDAUX, R., BATZER, M.A., 2009, The impact of retrotransposons on human genome evolution, *Nature Reviews Genetics*, 10 (10), 691-703.
- DANILEVSKAYA, O.N., TRAVERSE, K.L., HOGAN, N.C., DEBARYSHE, P.G., PARDUE, M.L., 1999, The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription, *Molecular and Cellular Biology*, 19 (1), 873-881.
- DEININGER, P.L., BATZER, M.A., 2002, Mammalian retroelements, *Genome Research*, 12, 1455-1465.
- DURAND-DUBIEF, M., SINHA, I., FAGERSTROM-BILLAI, F., BONILLA, C., WRIGHT, A., GRUNSTEIN, M., EKWALL, K., 2007, Specific functions for the fission yeast Sirtuins Hst2 and Hst4 in gene regulation and retrotransposon silencing, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 26, 2477-2488.
- EICKBUSH, T.H., JAMBURUTHUGODA, V.K., 2008, The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases, *Virus Research*, 134 (1-2), 221-234.
- 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.
- EVRENSSEL, 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., 2000, Transposons and genome evolution in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (13), 7002-7007.
- FESCHOTTE, C., PRITHAM, E.J., 2007, DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes, *Annual Review of Genetics*, 41, 331-368.
- FINNEGAN, D.J., 1989, Eukaryotic transposable elements and genome evolution, *Trends in Genetics*, 5, 103-107.
- FLAVELL, A.J., 1995, Retroelements reverse transcriptase and evolution, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110 (1), 3-15.
- FLAVELL, A.J., KNOX, M.R., PEARCE, S.R., ELLIS, T.H.N., 1998, Retrotransposon based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis, *The Plant Journal*, 16, 643-650.

- FORSTER, B.P., ELLIS, R.P., THOMAS, W.T.B., NEWTON, A.C., TUBEROSA, R., THIS, D., EL-ENEIN, R.A., BAHRI, M.H., SALEM, M.B., 2000, The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 19-27.
- 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.
- GIFFORD, R., TRISTEM, M., 2003, The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses, *Virus Genes*, 26 (3), 291-315.
- GOZUKIRMIZI, N., ARI, Ş., ORALER, G., OKATAN, Y., PALAVAN, N., 1990, Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley, *Acta Botanica Neerlandica*, 39 (4), 379-387.
- GRANDBASTIEN, M.A., 1998, Activation of plant retrotransposons under stress conditions, *Trends in Plant Science*, 3 (5), 181-187.
- 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.
- GRZEBELUS, D., 2006, Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (1), 21-29.
- HAMAD- MECBUR, H., YILMAZ, S., TEMEL, A., SAHIN K., GOZUKIRMIZI, N., 2012, Effects of epirubicin on barley seedlings, *Toxicology and Industrial Health*, DOI: 10.1177/0748233712451768.
- HAVECKER, E.R., GAO, X., VOYTAS, D.F., 2004, The diversity of LTR retrotransposons, *Genome Biology*, 5, 225.
- HAWKINS, J.S., KIM, H.R., NASON, J.D., WING, R.A., WENDEL, J.F., 2006, Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium*, *Genome Research*, 16, 1252-1261.
- HIROCHIKA, H., 1993, Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 12 (6), 2521-2528.
- 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 Science of The United States of America, 93, 7783-7788.

- HIROCHIKA, H., OKAMOTO, H., KAKUTANI, T., 2000, Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation, *The Plant Cell*, 12, 357-368.
- HOLLIGAN, D., ZHANG, X., JIANG, N., PRITHAM, E.J., WESSLER, S.R., 2006, The transposable element landscape of the model legume *Lotus japonicus*, *Genetics*, 174, 2215-2228.
- HUANG, S., LI, R., ZHANG, Z., LI, L., GU, X., ve diğ., 2009, The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L., *Nature Genetics*, 41 (12), 1273-1283.
- HUANG, C.R.L., BURNS, K.H., BOEKE, J.D., 2012, Active transposition in genomes, *The Annual Review of Genetics*, 46, 651-75.
- IKEDA, K., NAKAYASHIKI, H., TAKAGI, M., TOSA, Y., MAYAMA, S., 2001, Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon *MAGGY* resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*, *Molecular Genetics and Genomics*, 266 (2), 318-25.
- JAASKELAINEN, M., 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*, 20 (4), 413-422.
- JAIN, S.M., 2001, Tissue culture-derived variation in crop improvement, *Euphytica*, 118 (2), 153-166.
- 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.
- JORDAN, I.K., MATYUNINA, L.V., MCDONALD, J.F., 1999, Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon, *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America*, 96 (22), 12621-12625.
- KAEPPLER, S.M., KAEPPLER, H.F., RHEE, Y., 2000, Epigenetic aspects of somaclonal variations in plants, *Plant Molecular Biology*, 43, 179-188.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A.H., 1999, IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques, *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (5), 704-711.
- KALENDAR, R., TANSKANEN, J., IMMONEN, S., NEVO, E., SCHULMAN, A.H., 2000, Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1*

retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (12), 6603-6607.

KALENDAR, R., VICIENT, C.M., PELEG, O., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., BOLSHOY, A., SCHULMAN, A.H., 2004, Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes, *Genetics*, 166, 1437-1450.

KALENDAR, R., 2011, The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity, *Field and Vegetable Crops Research*, 48, 261-274.

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., 2003, Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat, *Nature Genetics*, 33, 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., WONG, C., YOUSSEF, H., SCOTT, A.F., PHILLIPS, D.G., ANTONARAKIS, E.S., 1988, Haemophilia a resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man, *Nature*, 332, 164-166.

KAZAZIAN, H.H., 2004, Mobile elements: drivers of genome evolution, *Science*, 303 (5664), 1626-1632.

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.

KOVACH, A., WEGRZYN, J.L., PARRA, G., HOLT, C., BRUENING, E.G., LOOPSTRA, C.A., HARTIGAN, J., YANDELL, M., LANGLEY, C.H., KORF, I., NEALE, D.B., 2010, The *Pinus taeda* genome is characterized by diverse and highly diverged repetitive sequences, *BioMed Central Genomics*, 11 (420), 1-14.

- KRIZOVA, K., FOJTOVA, M., DEPICKER, A., KOVARIK, A., 2009, Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles^{1[w]}, *Plant Physiology*, 149, 1493-1504.
- KUMAR, A., PEARCE, S.R., McLEAN, K., HARRISON, G., HESLOP-HARRISON, J.S., WAUGH, R., FLAVELL, A.J., 1997, The ty1-copia group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers, *Genetica*, 100(1-3), 205-217.
- KUMAR, A. and BENNETZEN, J.L., 1999, Plant retrotransposons, *Annual Review of Genetics*, 33, 479-532.
- LABRADOR, M., CORCES, V.G., 1997, Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision, *Annual Review of Genetics*, 31, 381-404.
- LANKENAU, S., CORCES, V.G., LANKENAU, D.H., 1994, The Drosophila micropia retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (3), 1764-1775.
- LARGAESPADA, D.A., 2009, Transposon mutagenesis in mice, *Methods in Molecular Biology*, 530, 379-390.
- LARKIN, P.L., SCOWCROFT, W.R., 1981, Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theoretical and Applied Genetics*, 60 (4), 197-214.
- 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.
- LEE, M., PHILLIPS, R.L., 1988, The chromosomal basis of somaclonal variation, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 413-437.
- LEIGH, F., KALENDAR, R., LEA, V., LEE, D., DONINI, P., SCHULMAN, A.H., 2003, Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques, *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 464-474.
- LI, X., 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*, 90 (2), 153-168.
- LI, R., BRUNEAU, A.H., QU, R., 2010, Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze], *Plant Breeding*, 129, 96-99.

- LIU, Z.L., HAN, F.P., TAN, M., SHAN, X.H., DONG, Y.Z., WANG, X.Z., FEDAK, G., HAO, S., LIU, B., 2004, Activation of a rice endogenous retrotransposon *TOS17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions, *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (1), 200-209.
- LLORENS, C., MUNOZ-POMER, A., BERNAD, L., BOTELLA, H., MOYA, A., 2009, Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees, *Biology Direct*, 4 (41), 1-31.
- 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.
- MA, J., JACKSON, S.A., 2006, Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice, *Genome Research*, 16, 251-259.
- MAK, J., KLEIMAN, L., 1997, Primer tRNAs for reverse transcription, *Journal of Virology*, 71 (11), 8087-8095.
- 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*, 11, 1187-1197.
- MANNINEN, I., SCHULMAN, A.H., 1993, *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Molecular Biology*, 22 (5), 829-846.
- MARAKLI, S., YILMAZ, S., GOZUKIRMIZI, N., 2012, *BARE1* and *BAGY2* retrotransposon movements and expression analyses in developing barley seedlings, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26 (6), 3451-3456.
- MATSUDA, E., GARFINKEL, D.J., 2009, Posttranslational interference of Ty1 retrotransposition by antisense RNAs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (37), 15657-15662.
- 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*, 36 (6), 344-355.

- MING, R., HOU, S., FENG, Y., YU, Q., DIONNE-LAPORTE, A., ve diğ., 2008, The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus), *Nature*, 452, 991-997.
- MONTGOMERY, E.A., LANGLEY, C.H., 1983, Transposable elements in mendelian populations. 11. distribution of three copia-like elements in a natural population of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 104, 473-483.
- MUHAMMAD, A.J., OTHMAN, F.Y., 2005, Characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (*Musa* AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers, *Plant Molecular Biology Reporter*, 23 (3), 241-249.
- MULLER, E., BROWN, P.T.H., HARTKE, S., LORZ, H., 1990, DNA variation in tissue-culture-derived rice plants, *Theoretical and Applied Genetics*, 80 (5), 673-679.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- NEFEDOVA, L.N., MANNANOVA, M.M., KIM, A.I., 2011, Integration specificity of LTR-Retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome, *Virus Genes*, 42 (2), 297-306.
- NELLAKER, 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-Retrotransposon, *Molecular Genetics and Genomics*, 273 (1), 43-53.
- NGEZAHAYO, F., XU, C., WANG, H., JIANG, L., PANG, J., LIU, B., 2009, Tissue culture-induced transpositional activity of *mPing* is correlated with cytosine methylation in rice, *BioMed Central Plant Biology*, 9 (91), 1-15.
- 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.
- PARDUE, M.L., DEBARYSHE, P.G., 2003, Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annual Review of Genetics*, 37, 485-511.

- PEARL, L.H., 1987, The catalytic mechanism of aspartic proteinases, *Federation of European Biochemical Societies*, 214 (1), 8-12.
- POURKHEIRANDISH, M., KOMATSUDA, T., 2007, The importance of barley genetics and domestication in a global perspective, *Annals of Botany*, 100, 999-1008.
- 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.
- 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.
- QIU, D., GAO, M., LI, G., QUIROS, C., 1999, Comparative sequence analysis for *Brassica oleracea* with similar sequences in *B. rapa* and *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Reports*, 28 (4), 649-661.
- QUEEN, R.A., GRIBBON, B.M., JAMES, C., JACK, P., FLAVELL, A.J., 2004, Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat, *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 91-97.
- REBOLLO, R., ROMANISH, M.T., MAGER, D.L., 2012, Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes, *The Annual Review of Genetic*, 46, 21-42.
- RODRIGUEZ, M., O'SULLIVAN, D., DONINI, P., PAPA, R., CHIAPPARINO, E., LEIGH, F., ATTENE, G., 2006, Integration of retrotransposons-based markers in a linkage map of barley, *Molecular Breeding*, 17, 173-184.
- SABOT, F., SCHULMAN, A.H., 2006, Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome, *Heredity*, 97, 381-388.
- SAEIDI, H., RAHIMINEJAD, M.R., HESLOP-HARRISON, J.S., 2008, Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran, *Annals of Botany*, 101, 855-861.
- SALAMINI, F., OZKAN, H., BRANDOLINI, A., SCHAFER-PREGL, R., MARTIN, W., 2002, Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east, *Nature Reviews Genetics*, 3, 429-441.
- 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*, 274, 765-768.

- 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.
- SCHMUTZ, J., CANNON, S.B., SCHLUETER, J., MA, J., MITROS, T., ve diğ., 2010, Genome sequence of the palaeopolyploid Soybean, *Nature*, 463, 178-183.
- SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, S., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P., STEIN, N., 2009, The international barley sequencing consortium - at the threshold of efficient access to the barley genome^{1[W]}, *Plant Physiology*, 149, 142-147.
- SCHUSTER, W., BRENNICKE, A., 1987, Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA?, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 6 (10), 2857-2863.
- SEITZ, H., YOUNGSON, N., LIN, S.P., DALBERT, S., PAULSEN, M., BACHELLERIE, J.P., FERGUSON-SMITH, A.C., CAVAILLE, J., 2003, Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene, *Nature Genetics*, 34, 261-262.
- SERVANT, G., PINSON, B., 2,3, TCHALIKIAN-COSSON, A., COULPIER, F., LEMOINE, S., PENNETIER, C., BRIDIER-NAHMIAS, A., TODESCHINI, A.L., FAYOL, H., DAIGNAN-FORNIER, B., LESAGE, P., 2012, Tye7 regulates yeast Ty1 retrotransposon sense and antisense transcription in response to adenylic nucleotides stress, *Nucleic Acids Research*, 40 (12), 5271-5282.
- 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.
- SHARMA, A., SCHNEIDER, K.L., PRESTING, G.G., 2008, Sustained retrotransposition is mediated by nucleotide deletions and interelement recombinations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 105 (40), 15470-15474.
- SHIRASU, K., SCHULMAN, A.H., LAHAYE, T., SCHULZE-LEFERT, P., 2000, A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion, *Genome Research*, 10, 908-915.
- SHULAEV, V., SARGENT D.J., CROWHURST, R.N., MOCKLER, T.C., FOLKERTS, O., ve diğ., 2011, The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*), *Nature Genetics*, 43, 109-116.

- SMYKAL, P., VALLEDOR, L., RODRIGUEZ, R., GRIGA, M., 2007, Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.), *Plant Cell Reports*, 26 (11), 1985-1998.
- SOLEIMANI, V.D., BAUM, B.R., JOHNSON, D.A., 2006, Quantification of the retrotransposon *BARE1* reveals the dynamic nature of the barley genome, *Genome*, 49 (4), 389-396.
- SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., ARNA, T., SCHULMAN, A. H., 1996a, Retrotransposon *BARE-1* is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome, *Plant Molecular Biology*, 30, 1321-1329.
- SUONIEMI, A., NARVANTO, A., SCHULMAN, A. H., 1996b, The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays, *Plant Molecular Biology*, 31 (2), 295-306.
- SUONIEMI, A., SCHMIDT, D., SCHULMAN, A.H., 1997, *BARE-1* insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites, *Genetica*, 100, 219-230.
- SUTER, C.M., MARTIN, D.I., WARD, R.L., 2004, Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue, *International Journal of Colorectal Disease*, 19 (2), 95-101.
- 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.
- 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.
- TAPIA, G., VERDUGO, I., YANEZ, M., AHUMADA, I., THEODULOZ, C., CORDERO, C., POBLETE, F., GONZALEZ, E., RUIZ-LARA, S., 2005, Involvement of ethylene in stress-induced expression of the *TLC1.1* retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun.^{1[w]}, *Plant Physiology*, 138, 2075-2086.
- TEMEL, A., KARTAL, G., GOZUKIRMIZI, N., 2008, Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 22 (4), 911-914.
- THE FRENCH-ITALIAN PUBLIC CONSORTIUM FOR GRAPEVINE GENOME CHARACTERIZATION, 2007, The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla, *Nature*, 449, 463-468.

- THE INTERNATIONAL BARLEY GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2012, A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome, *Nature*, 491, 711-717.
- 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.
- UNSELD, M., MARIENFELD, J.R., BRANDT, P., BRENNICKE, A., 1997, The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366, 924 nucleotides, *Nature*, 15, 57-61.
- VICIENT, C.M., SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., TANSKANEN, J., BEHARAV, A., NEVO, E., SCHULMAN, A.H., 1999, Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*, *The Plant Cell*, 11, 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., JAASKELAINEN, M.J., KALENDAR, R. and SCHULMAN, A.H., 2001b, Active retrotransposon are a common feature of grass genomes, *Plant Physiology*, 125, 1283-1292.
- VITTE, C., BENNETZEN, J.L., 2006, Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 103 (47), 17638-17643.
- VITTE, C., PANAUD, O., 2003, Formation of solo-LTRs through unequal homologous recombination counterbalances amplifications of LTR-Retrotransposons in rice *Oryza sativa* L., *Molecular Biology and Evolution*, 20(4), 528-540.
- VOIGT, K., GOGOL-DORING, A., MISKEY, C., CHEN, W., CATHOMEN, T., IZSVAKAND, Z., IVICS, Z., 2012, Retargeting sleeping beauty transposon insertions by engineered zinc finger DNA-binding domains, *Molecular Therapy*, 20, 1852-1862.
- WALKER, E.L., ROBBINS, T.P., BUREAU, T.E., KERMICLE, J., DELLAPORTA, S.L., 1995, Transposon-mediated chromosomal rearrangements and gene duplications in the formation of the maize R-r complex, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 14 (10), 2350-2363.
- WANG, F., TONG, Z., SUN, J., SHEN, Y., ZHOU, J., GAO, Z., ZHANG, Z., 2010, Genome-wide detection of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.), *African Journal of Biotechnology*, 9 (50), 8583-8596.

- WANG, H., LIU, J.S., 2008, LTR-Retrotransposon landscape in *Medicago truncatula*: more rapid removal than in rice, *BioMed Central Genomics*, 9 (382), 1-13.
- 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., SCHULMAN, A.H., 2007, A unified classified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nature Reviews Genetics*, 8, 973-982.
- WICKER, T., TAUDIEN, S., HOUBEN, A., KELLER, B., GRANER, A., PLATZER, M., STEIN, N., 2009, A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley, *The Plant Journal*, 59, 712-722.
- 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, K.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*, 98 (24), 13778-13783.
- WONG, L.H., CHOO, K.H.A., 2004, Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere, *Trends in Genetics*, 20 (12), 611-616.
- WRIGHT, D.A., VOYTAS, D.F., 1998, Potential retroviruses in plants: *Tat1* is related to a group of *Arabidopsis thaliana* Ty3/gypsy retrotransposons that encode envelope-like proteins, *Genetics*, 149, 703-715.
- 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.
- XU, T., BHARUCHA, N., KUMAR, A., 2011, Genome-wide transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, *Methods in Molecular Biology*, 765, 207-224.
- YODER, J.A., WALSH, C.P. and BESTOR, T.H., 1997, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites, *Trends in Genetics*, 13 (8), 335-340.

EKLER

Ek1: Doku kültürü çalışmasında kullanılan besi yerlerinin hazırlanışı

Murashige ve Skoog (MS) besi yeri; 4.3 g MS besi yeri tuz karışımı (Sigma, M5524) ve 30 g sukroz (Sigma, S7903) 800 ml dH₂O içinde çözülüp, pH'sı 1N NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Son hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanan besi yerine 8 g agar (Sigma, A7002) eklendi. Besi yeri, otoklavda 121°C'de 1.2 Atm basınçta, 15 dakika süre ile steril edildi. Besi yerinin sıcaklığı 50-55°C'ye geldiğinde steril kabinde içerisine 1 ml 1000X MS vitamin karışımı (Sigma, M3900) eklendi.

Kallus gelişimi için MS besi yeri; Sıvı haldeki (50-55°C) 1 litre steril MS besi yerine 4 ml stok Dicamba (1 mg/ml) çözeltisi eklendi. Homojen dağılana kadar karıştırılıp steril ortamda petrilere döküldü.

Sürgün gelişimi için MS besi yeri; Sıvı haldeki (50-55°C) 1 litre steril MS besi yerine 500 µl stok Zeatin (1 mg/ml) çözeltisi eklendi. Homojen dağılana kadar karıştırılıp steril ortamda petrilere döküldü.

Stok Dicamba çözeltisi (1 mg/ml); 100 mg Dicamba (Sigma, 45430) 80 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti steril kabinde 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi ve -20°C'de saklandı.

Stok Zeatin çözeltisi (1 mg/ml); 100 mg Zeatin (Sigma, Z0876) 5 ml 1 N NaOH içerisinde çözdürüldü ve son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Stok çözelti steril kabinde 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi ve -20°C'de saklandı.

1 N NaOH; 4 g NaOH 80 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü ve son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Ek 2: Elektroforezde kullanılan tamponların hazırlanışı

10X TAE tamponu; 48.4 g Tris (Sigma, 252859) 800 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. İçerisine 20 ml 0.5 M EDTA eklendi. Çözeltinin pH'sı asetik asit ile (~11.5 ml) 8.3'e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. 1X TAE hazırlamak için 100 ml 10X stok TAE tamponu, 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Tampon oda sıcaklığında saklandı.

5X TBE tamponu; 54 g Tris 800 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Ardından 27.5 g borik asit (Sigma, B7901) eklendi ve çözdürüldü. 20 ml 0.5 M EDTA eklendi ve son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. 1X TBE hazırlamak için 200 ml 5X stok TBE tamponu, 800 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Tampon oda sıcaklığında saklandı

Akrilamit:Bisakrilamit (29:1) %40; 38.7 g akrilamit (Sigma, A9099) 50 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Ardından çözeltiliye 1.3 g bisakrilamit (Sigma, M2022) eklendi ve çözdürüldü. Çözeltinin son hacmi dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanıp 0.2 µm por çaplı filtreden geçirildi ve +4°C'de karanlıkta saklandı.

%10 Amonyum persülfat (APS); 10 g APS (Sigma, A3678) 80 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve çözelti küçük hacimlerde -20 °C'de saklandı.

0.5 M EDTA; 18.61 g EDTA (Sigma, E6758) 80 ml dH₂O içinde çözdürüldü. EDTA'nın çözünmesi için pH 5 N NaOH ile 8.0'a ayarlandı. Çözeltinin hacmi dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

5 N NaOH; 20 g NaOH 80 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü ve son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Ek3: Transformasyonda kullanılan çözeltilerin ve besi yerlerinin hazırlanışı

SOB broth; 20 g tripton, 5 g maya özütü ve 0.5 g NaCl 800 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Çözeltiye 10 ml 250 mM KCl solüsyonu eklendi ve 1 N NaOH ile besi yerinin pH'sı 7.0'a ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı ve otoklavda 121°C'de 1.2 Atm basınçta, 15 dakika süre ile steril edildi. Besi yeri kullanılmadan önce içerisine 5 ml steril 2 M MgCl₂ eklendi. Ampisilinli SOB broth hazırlamak için 1 ml stok ampisilin (100 µg/ml) solüsyonu eklendi.

SOC broth; SOB broth otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Kullanılmadan hemen önce içerisine 5 ml steril 2 M MgCl₂ ve 20 ml 1 M steril glukoz solüsyonu eklendi.

SOB agar; SOB broth otoklavlanmadan önce içerisine 15 g agar eklendi. Ardından otoklavda steril edildi ve 50-55°C'ye kadar soğuduktan sonra 5 ml steril 2 M MgCl₂ eklendi. Homojen olana kadar karıştırıldı ve petrilere döküldü. Ampisilinli SOB agar hazırlamak için 1 ml stok ampisilin (100 µg/ml) solüsyonu eklendi ve homojen karıştırıldıktan sonra petrilere döküldü.

Ampisilin stok solüsyonu (100 µg/ml); 1 g ampisilin 9 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Son hacim dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon küçük hacimlerde -20°C'de saklandı.

250 mM KCl; 1.86 g KCl 90 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Ardından son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyon +4°C'de saklandı.

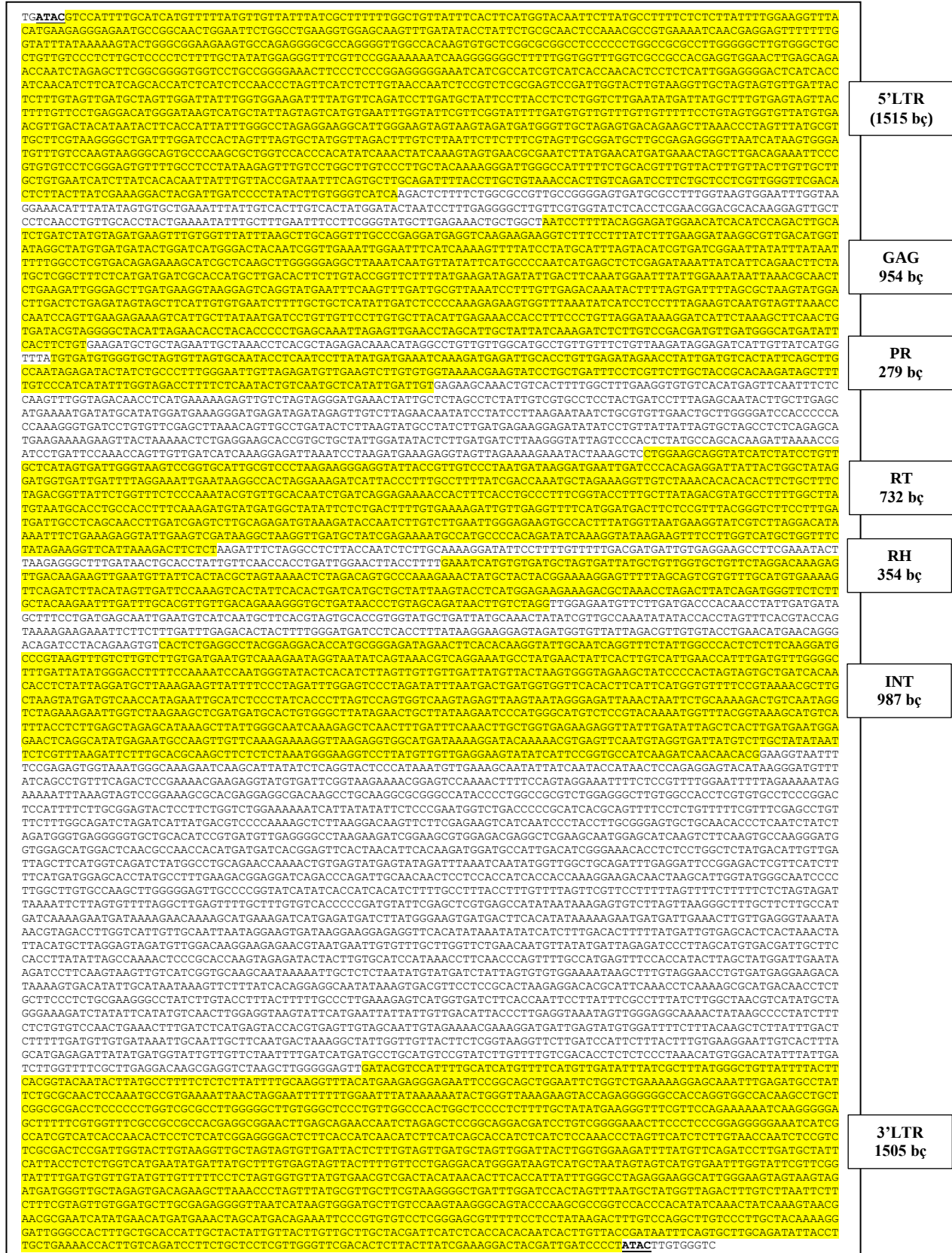
2M MgCl₂; 19 g MgCl₂ 90 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Ardından son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon +4°C'de saklandı.

1 M Glukoz solüsyonu; 18 g glukoz 90 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Ardından son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon +4°C'de saklandı.

100 mM MgCl₂ solüsyonu; 0.95 g MgCl₂ 90 ml dH₂O içerisinde çözödüröldü. Ardından son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon +4°C'de saklandı.

100 mM CaCl₂ solüsyonu; 1.1 g CaCl₂ MgCl₂ 90 ml dH₂O içerisinde çözödüröldü. Ardından son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon +4°C'de saklandı.

Ek4: TREP veri tabanından elde edilen BAGY2'ye ait TREP3162 dizisi



Ek5: Deney sonuçlarından elde edilen domenlerin dizileri

GAG domeni dizisi (925 bç)

```
GGATCATCACATCCAGACTTGCATCTAATCTATGTAGATGAAGTTTGTGGTTTATTTAAGCTTGCAGGTTTGCCCGAGGATGAGG
TAAAGAAGAAAGTATTTCTTTTATCTTTGAAGGATAAGGCGTTGACATGGTATAGGCTATGTGATGATACTGGATCATGGGGCTA
CAATCGGTTGAAATTGGAATTTTCATCAAAAGTTCTATCCTATGCATTTAGTACACCGTGATCGGAACTTTATTTATAAATTTTGG
CCTCGTGACAAGGAAAGCATAGCTCAAGCTTGGGGAAGGCTCAAATCAATGCTATATTCATGCCCAATCATGAGCTCTCGAGAT
AAATCATCACTCAAAACTTTTATGCTCGGCTTTCTCATGAAGATCGTACCATGCTTGACACTTCTTGCGCGGATCTTTTATGAA
GAAGGATATTGATCACAAGTCGAATTTATTTGGAGAGAATCAAATGCAACTCTGAAGATTGGGAGCTGGAGGAAGGTAAGGAGTCA
GGTATGAATTTCCAGTTTGATTGCGTTAAATCTTTTGTGAGACAAACACTTCTAGAGATTTAGCGCTAAGTATGGACTTGACT
CTGAGATAGTAGCATCTCTATGTGAATCTTTTGTCTCTCATGTTGATCTTCCCAAAGAGAAGTGGTTTAAATATCATCCTCCTGT
AGAAGGCAACATAGCCAAAACCAATCTAGTTGAGGAGAAAGTCATTGCTTTTAGTGATCCTGTTGTCTTGTGCTTACACTGAG
AAACCACCATAACCTGCTAGGATAAAGGATTATTCTAAAGCTCCAACGTGTATACGTAGGGGTTACATTAGATCACTTGACCCCC
GTGAGGAAATTAGAGTTGAACCTAGTGTGCTATTATCAAGATCTCTTAGCCGAAGACATAGACGGGCATGTTA
```

PR domeni dizisi (260 bç)

```
GTGATATGGGTGCTAGTGTGTAGTGCAATACCTCAATCCTTATATGATGAAATTCAAGACGAATTGCTCCTGTTGAGATGGAACCT
ATCGATGTCACTATTTCAGCTTGCCAATAGAGATACTATCTGCCATTTGGGAATTGTTAGAGATGTTGAAGTCTTGTGTGGTAAAA
CAAAGTATCATGCTGATTTTCTCGTCTTGGTACCACACAAGATAGCTTTTGTCCCATCGTATTTGGCAGACCTTTCTCAACAC
TGTC
```

RT domeni dizisi (703 bç)

```
GGAAGCAGGAATCATTTATCCTGTTGCTCATAGTGATTGGGTAAGTCCAGTACATTGCATACCTAAGAAGGGAGGTATCACTGTC
ATTCCTAATGATAAGGATGAACATAATCCCACAAAGGATTATTACTGGCTATAGGATGGTGATAGACTTCCGAAACTGAACAAGG
CAACCAGGAAAGATCATTTATCCTTTCTCGTCTATCGACCAATGTAGAAAGGCTATCAAAACACACACACTTTTGCTTTCTAGA
CGTTATTACAGTTTCTCACAAATACCCATGACAAATCTGATCAGGAGAAAACCACTTTACCTGCCCTTCGGTACCTTTGCC
TATAGACGTATGCTTTTGGCTTATGCAATGCGCCTGCCACCTTTCAAAGATGTATGATGGCTATATTTCTCTGACTTTTGTGAAA
ATATTGTCGAGGTTTTCATGGATGACTTCTCCGTTTACGGGTCTTCTCTTGACGATTGCCTCAGCAACCTTGATCGAGTCTTACAG
AGATGCGAAGATACCAACCTCGTCTTGAATTGGGAGAAAGTCCACTTTATGGTTAATGAAGGTATCGTCTTAGGACACAAAATTT
CTGAGAGAGGCATTGAAGTTGATAAGGCTAAGGTTGATGCAATTGAGAAAATGCCTTGCCCCACAGATATCAGAGGTATACGAAG
TTTCTTAGTGCATGCTGGTTCT
```

RH domeni dizisi (318 bç)

```
TGCGGCGCTAGTGATTATGCTGTTGGTGCTGTTCTAGGACAAAGAGTTGAAAAGAAGTTGAATGTCATTCACTATGCTAGTAAAA
CTCTAGACAGTGCCCAAAGAACTATGCCACTACGGAGGAGTTTTTTAGCAGTCGTGTTGTCATGTGAAAAGTTTCAGGTCTTACAT
AGTTGATTCCAAAGTCATTATCACAGTGATCATGCTGCTATTAAAGTACCTCATGGAGAAGAAGGACGCTAAACCTAGACTTATC
AGATGGTTCTCCTCCTACGGGAATTTGATTGTCATGTTGTTGACCGAAAGGGTGCTGATAACC
```

INT domeni dizisi (934 bç)

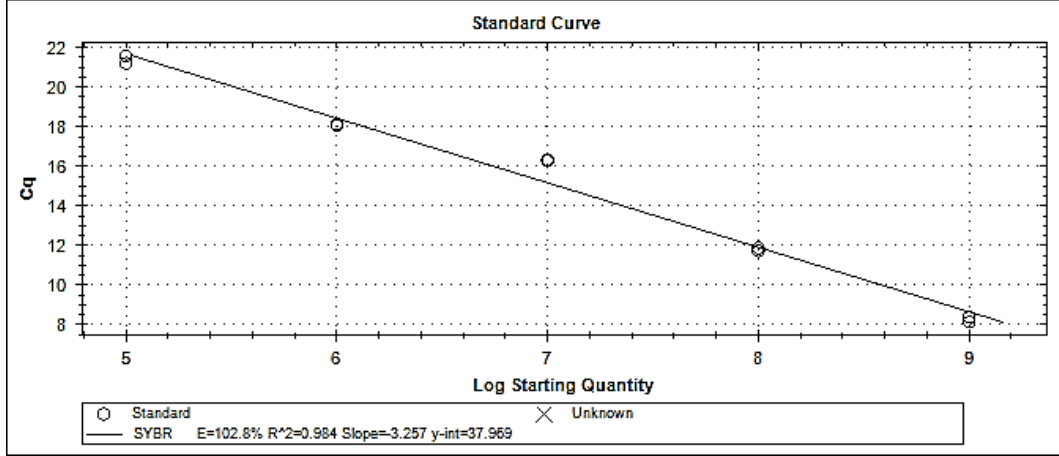
```
GGGGCCCAAAGGGGACTTCCATTTAGAGAGAGCTTGCCGCAAGAATCTTAAACGAGAGTTATATAGCAAGACATAATCACCTAC
ATTGAACTCAGCTTTTGTATCCTCTTATCATGCCACCTCTTAACCTTCTCTTTGAACAGCTTGGCATTCTCATATGCCCTGAGTT
CTCCACTCATCAAGCGAGCTAATATCAAAATAACCTCTTCTCGCCGCAAGTTGAAATCAAAGTTGAGCTCTTTGATTGCCCAAT
AAGCTTTATGTTCTAGCTCAAGAGGTAAGTGACATGCTTTCCCATACACCATTTTGTACGGAGACATGCCCATGGGATTCTTTTA
GGTAGTCCATATAAGCCACAGTGTCATCATCGAGCTTCTTAGACCAATTTCTTCTAGACCTGTTGACAGTCTTTTGCAGAATCAGT
TTAATCTCTCTATTACTTAGCTCTACTTGACCCTGAGCTGAGGGTGATAGGGAGACGCAATTCTATGGTTGACATCGTACTTAG
CAACGTTTTACGGAAAGCACCATGAATGAAGTGTGAACCACCGTCGGTCATTAGATATCTAGGGACTCCAAATCTAGGGAAGATA
ACTTCTTTTACGATCTTGATAGAGGTGTTGTGATCAGCACTACTAGTGGGATAGCTTCTACCCACTTAGTGACGTAATCAACAG
CAACTAAGATGTGAGTATACCCATTGGATTTTGGAAAAGGTCCCATATAATCAAAGCCCCAAACATCAAAAAGTTCAATGACAAG
TGAATAGTTTCATAGGCATTTCTGACGTTTGGTAATATTACCTATCCTTTGACATTCTGCACAAAGATAAGACAACTTACTGGCA
TCCTTGAAGAGAGTGGGCCAATAGAAACCTGATTGCAATACCTTGTGTGAGTTCTATCTCCCGCATGGTGTCTCTGTAGGCT
```

ENV domeni dizisi (253 bç)

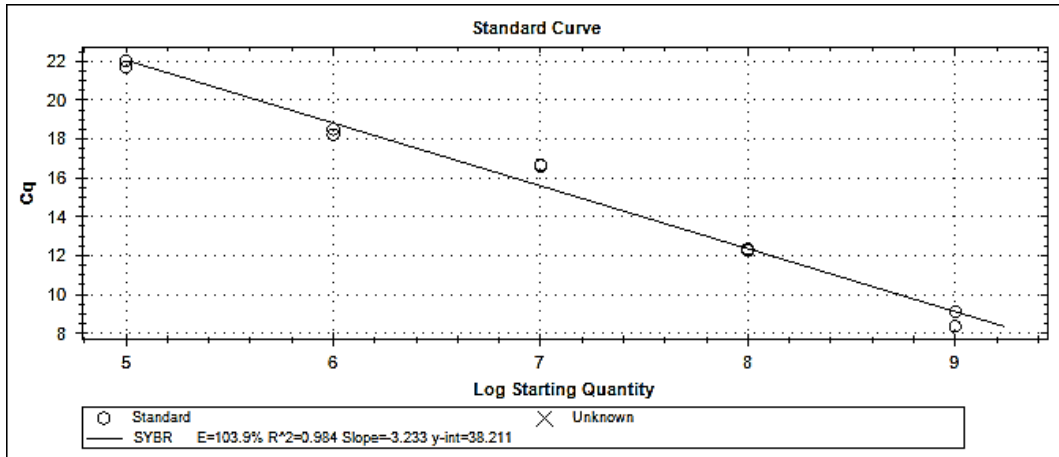
```
TCAGTGGAGTTTCAGAAAGTCAAGCCTCCCTGACCAAGGAATAAGTCTAAGACCTTGTTTATCCCTTCTCGTTTCTTGTAGGAGAGC
AAGCAGGAGCTTTGCCATAGAGTTTGAACCTTGAGGAGGAAATGACGATCTAAGGGAGCAGAACTTTTGTCTCAAGTGGACAC
TAGACAAGTTCAAGACTGCTCCAATAACACCACCATCACCACCAAGGAAGACAATAAGCATTGGTATGGGCAATCCCCTTG
```

Ek6: qPCR için standart eğri grafikleri

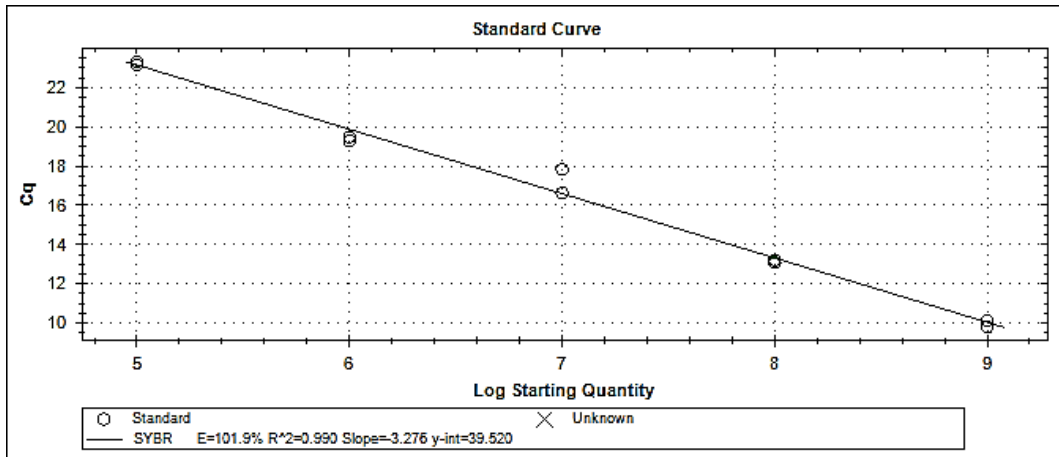
GAG plazmidi ile kurulan qPCR'in standart eğri grafiği



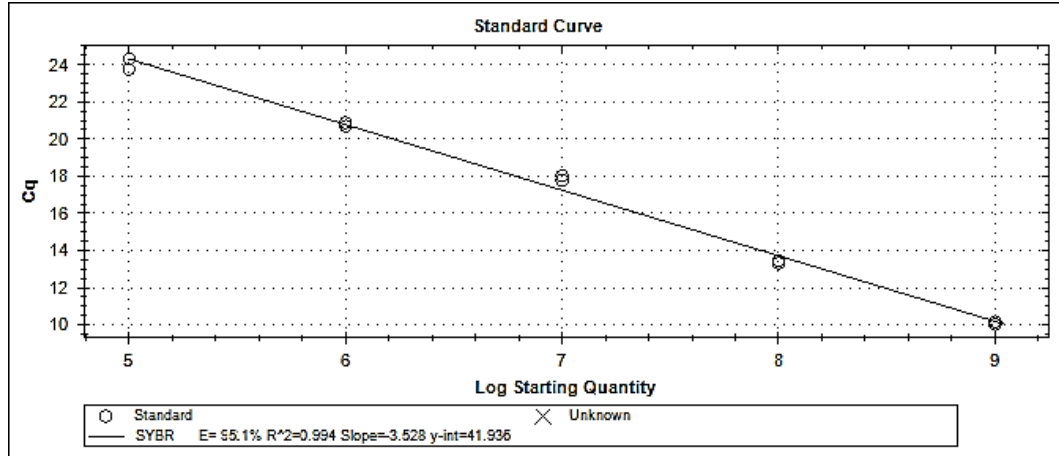
PR plazmidi ile kurulan qPCR'in standart eğri grafiği



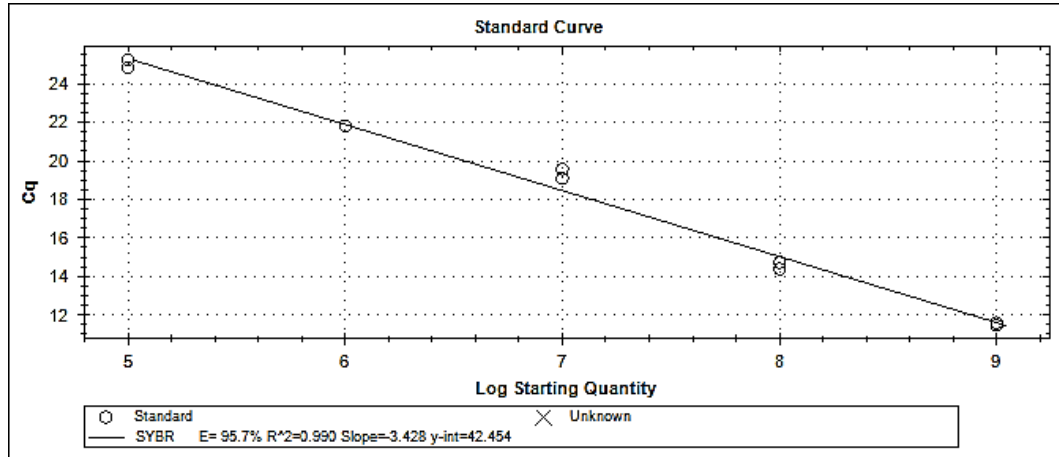
RT plazmidi ile kurulan qPCR'in standart eğri grafiği



RH plazmidi ile kurulan qPCR'in standart eğri grafiği



INT plazmidi ile kurulan qPCR'in standart eğri grafiği



ÖZGEÇMİŞ



1. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı : Sibel YILMAZ
Telefon : + 90 533 4491118
E-posta : sibelyilmaz22@gmail.com
Yazışma Adresi : Nuhkuyusu Caddesi, No:251/7, Üsküdar/İSTANBUL

2. EĞİTİM BİLGİLERİ

LİSANS

Üniversite : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Bölüm : Biyoloji (Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Opsiyonu)
Mezuniyet Derecesi : 3.58 (100'lük sistem: 92)
Mezuniyet Yılı : 2004

YÜKSEK LİSANS

Üniversite : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Anabilim Dalı : Biyoloji
Mezuniyet Derecesi : 3.86 (100'lük sistem: 98)
Mezuniyet Yılı : 2007

DOKTORA

Üniversite : İstanbul Üniversitesi
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Derecesi : -
Mezuniyet Yılı : Devam etmekte

3. AKADEMİK DENEYİM

Üniversite : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Bölüm : Biyoloji
Ünvanı : Araştırma Görevlisi
Tarih : 2005-2010

4. YAYINLAR

- GULIYEV, M., **YILMAZ, S.**, SAHIN, K., MARAKLI, S., GOZUKIRMIZI, N., 2013, Human endogenous retrovirus-H insertion screening, *Molecular Medicine Reports*, DOI: 10.3892/mmr.2013.1295
- MARAKLI, S., **YILMAZ, S.**, GOZUKIRMIZI, N., 2012, *BARE1* and *BAGY2* retrotransposon movements and expression analyses in developing barley seedlings, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(6): 3451-3456.
- HAMAT-MECBUR, H., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., SAHIN, K., GOZUKIRMIZI, N., 2012, Effects of epirubicin on barley seedlings, *Toxicology and Industrial Health*, DOI: 10.1177/0748233712451768
- BAYRAM, E., **YILMAZ, S.**, HAMAT- MECBUR, H., KARTAL-ALACAM, G., GOZUKIRMIZI, N., 2012, *Nikita* retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Omics Journal*, 5 (3): 211-215.
- SAHIN, K., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., GOZUKIRMIZI, N., 2011, DNA methylation variations between mono - and dizygotic twins, *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (4): 6460-6466.
- EVRENSEL, C., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., GOZUKIRMIZI, N., 2011, Variations in *BARE1* Insertion Patterns in Barley Callus Cultures, *Genetics and Molecular Biology Research*, 10 (2): 980-987.

5. ULUSAL ve ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİLER

- GOZUKIRMIZI, N., MARAKLI, S., **YILMAZ, S.**, *BARE1* and *BAGY2* retrotransposon movements and expression analyses in developing barley seedlings, *International Conference on Advances in Plant Sciences*, Thailand, 14-18 Nov., 2012.
- KAYA, Y., **YILMAZ, S.**, GOZUKIRMIZI, N., HUYOP, F., Transformation of tobacco with *DEHE* gene from *Rhizobium* sp., *International Conference on Advances in Plant Sciences*, Thailand, 14-18 Nov., 2012.
- SAHIN, K., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., GOZUKIRMIZI, N., DNA methylation analysis of monozygotic twins. *European Biotechnology Congress*, Turkey, 28 Sep.- 1Oct., 2011.
- GOZUKIRMIZI, N., HAMAT-MECBUR, H., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., Effects of epirubicine on barley mature embryo germination and retrotransposons. *European Biotechnology Congress*, Turkey, 28 Sep.- 1Oct., 2011.
- GOZUKIRMIZI N., EVRENSEL, C., **YILMAZ, S.**, TEMEL, A., Variations in *BARE1* insertion patterns in barley callus cultures, *XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)*, Spain, 4-9 July, 2010.

YILMAZ, S., CAM, H., DEMIRGAN, Y., TASKIN, K.M., Doğal apomikt *Boechera holboellii* türünde genetik etiketlemeye maruz kalan *FIS* geni ifadelerinin belirlenmesi. *XIX. ulusal Biyoloji Kongresi, KTÜ/TRABZON 2008* (Sözlü sunum).

YILMAZ, S., TAŞKIN, K.M., Doğal apomikt *Boechera* türlerinden *FIS2* geninin karakterizasyonu. *XV.Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, ANTALYA 2007.*

6. PROJELER

1. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Doku Kültüründe Retrotranspozon Hareketlerinin ve Ürünlerinin Belirlenmesi

Destekleyen Kurum : İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Görevi : Yürütücü
Tarih : 2011-2013

2. Arpa doku kültürü ve Regenere Bitkilerde Transposon Analizi

Destekleyen Kurum : İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Görevi : Yardımcı Araştırmacı
Tarih : 2011-2013

7. KAZANDIĞI BURSLAR ve ÖDÜLLER

1. Staj Hareketliliği Bursu

Bursu Veren Kurum : İstanbul Üniversitesi
Tarih : 2011

2. Yaz Okulu Bursu

Bursu Veren Kurum : European Training and Networking Activity
Tarih : 2010

3. Yurt İçi Doktora Bursu

Bursu Veren Kurum : TÜBİTAK - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı
Tarih : 2007 - 2013

4. Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

Bursu Veren Kurum : TÜBİTAK - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı
Tarih : 2004 – 2006

5. Başarı Ödülü

Ödülü Veren Kurum : İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.
Tarih : 2012