



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BRACHYPODIUM DISTACHYON
GENOTİPLERİNDE RETROTRANSPOZON
VARYASYONUNUN SAPTANMASI

Yüksek Lisans Tezi

PINAR GÜNER

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

İZMİR

2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

BRACHYPODIUM DISTACHYON
GENOTİPLERİNDE RETROTRANSPOZON
VARYASYONUNUN SAPTANMASI

Pınar GÜNER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

Pınar GÜNER tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “***Brachypodium distachyon* Genotiplerinde Retrotranspozon Varyasyonunun Saptanması**” başlıklı bu çalışma Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/01/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Raportör Üye : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Üye : Prof. Dr. Metin TUNA



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “***Brachypodium distachyon* Genotiplerinde Retrotranspozon Varyasyonunun Saptanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 01 / 2021

Pınar GÜNER



ÖZET

***BRACHYPODIUM DISTACHYON* GENOTİPLERİNDE RETROTRANSPOZON VARYASYONUNUN SAPTANMASI**

GÜNER, Pınar

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Ocak 2021, 74 sayfa

Brachypodium distachyon, Poaceae ailesinin sahip olduğu üç alt ailenin en büyüğü olan Pooideae'nin en küçük genoma (0.72 pg/2C) sahip üyesidir. Bu çalışmada, inter primer binding site (iPBS) markörü kullanılarak, genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısını değerlendirmek üzere Türkiye'den toplanan toplam 235 *B. distachyon* genotipi incelenmiştir. 28 adet iPBS markörü kullanılarak 184 adet polimorfik bant üretilmiştir. Ortalama polimorfizm bilgisi içeriği (PIC = 0.66) ve ortalama Shannon'ın bilgi endeksini ($I = 0.19$), Nei'nin gen çeşitliliğini ($H_e = 0.25$), etkili allel sayısını ($N_e = 0.69$) ve çözme gücünü ($R_p = 2.27$) içeren çeşitlilik parametreleri, analiz edilen genotiplerde uygun miktarda genetik çeşitliliğin varlığını göstermiştir. Heat Map ve Principle Coordinate Analysis (PCoA) ile Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) dendrogramı sonuçları, 235 *B. distachyon* genotipi arasındaki karşılaştırmalı genetik farklılıkların iki ayrı gruba ayrıldığını göstermiştir. Popülasyon yapısı, STRUCTURE yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve çalışılan genotipler arasında iki ana alt grup ($K = 2$) olduğu görülmüştür. iPBS çiftlerinin % 7.11'inin istatistiksel olarak anlamlı LD ($p < 0.01$) içinde olduğu görülmüştür ve ortalama r^2 ve D' değerleri sırasıyla 0.03 ve 0.61 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın bulguları, iPBS markörlerinin polimorfik olduğu ve *B. distachyon*'un genetik çeşitliliğini değerlendirmede oldukça etkili olduğu sonucuna varmıştır.

Anahtar sözcükler: *Brachypodium distachyon*, iPBS, retrotranspozon, genetik çeşitlilik, popülasyon yapısı, bağlantı dengesizliği.



ABSTRACT

IDENTIFICATION OF RETROTRANSPOSON VARIATION IN *BRACHYPODIUM DISTACHYON* GENOTYPES

GÜNER, Pınar

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

January 2021, 74 pages

Brachypodium distachyon is a member of Pooideae with the smallest genom (0.72 pg/2C), the largest of three subfamilies in the Poaceae family. A total of 235 accessions of *B. distachyon* collected from Turkey were studied and targeted to evaluate the genetic diversity and population structure of these accessions using inter-primer binding site (iPBS) markers in the current study. Twenty-eight iPBS markers were used, and 184 clear and sharp polymorphic bands were produced. Average polymorphism information content (PIC=0.66) and diversity parameters comprising mean Shannon's information index (I=0.19), Nei's gene diversity (He=0.25), effective number of alleles (Ne=0.69), and resolving power (Rp=2.27) indicated the existence of appropriate amount of genetic diversity in the analysed genotypes. The results of the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) dendrogram with heat map and Principal Coordinates Analysis (PCoA) analyses indicated that the comparative genetic differences between 235 *B. distachyon* accessions were grouped into two separate clusters. The population structure has been calculated using the STRUCTURE software, and two major sub-groups (K = 2) were established between the genotypes studied. A total of 7.11% of the iPBS pairs revealed significant LD (at $p < 0.01$) and the mean r^2 and D' values were 0.03 and 0.61, respectively. The findings of this study concluded that iPBS markers are highly polymorphic and have a great efficient to evaluate the genetic diversity of *B. distachyon*.

Keywords: *Brachypodium distachyon*, iPBS, retrotransposon, molecular markers, structure.

ÖNSÖZ

Bitkiler, her ekolojik piramidin temelinde bulunmasının yanı sıra, hayvanların hayatta kalması ve evrilmesi için gereken enerjinin önemli bir kaynağı olmuştur. Çeşitli bitki popülasyonları arasındaki veya popülasyonların kendi içlerindeki genetik varyasyonlar ve popülasyon yapıları hakkında elde edilen bilgiler ışığında, bu bitkilerin daha etkili bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tüm tahıl türleri için ideal bir model bitki olan *Brachypodium distachyon* türünde genetik çeşitliliğin incelendiği bu tez çalışmasının, gelecekte ekonomik olarak öneme sahip olan buğday, arpa, çavdar gibi türler ile yapılacak ıslah çalışmalarına ışık tutacağına inanıyorum. Bu tez çalışması genel olarak 3 ana kısımdan oluşmaktadır: Giriş ve Genel Bilgiler'den oluşan ilk kısım, Gereç ve Yöntem'den oluşan ikinci kısım ve Bulgular, Sonuç ve Tartışma'dan oluşan üçüncü kısım.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgisini, tecrübesini ve değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İZMİR

Pınar GÜNER

06/01/2021



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)	xvi
TABLolar DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Brachypodium distachyon</i>	4
2.2. Transpozonlar.....	8
2.2.1. Retrotranspozonlar	10
2.3. Moleküler Markörler	13
2.3.1. iPBS markör yöntemi.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Tez Çalışma Planı	17
3.2. Kullanılan Materyaller	18
3.2.1. Bitki materyali.....	18
3.2.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	25
3.2.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	26
3.3. Yöntem.....	28

3.3.1. <i>Brachypodium distachyon</i> türüne ait tohumların çimlendirilmesi ve örneklerin toplanması.....	28
3.3.2. DNA izolasyonu.....	29
3.3.3. DNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi	30
3.3.4. Primerlerin test edilmesi ve seçimi	31
3.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	32
3.3.6. Agaroz jel elektroforezi	34
3.3.7. Jel görüntülerinin skorlanması	34
3.3.8. Verilerin analizi.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. DNA Saflık Jeli Sonuçları.....	36
4.2. DNA Nanodrop Sonuçları.....	37
4.3. iPBS Markörünün Analiz Sonuçları	42
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ	62
KAYNAKLAR DİZİNİ	63
TEŞEKKÜR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>B. distachyon</i> türünün taksonomik yapısı.....	4
2.2.1 LTR retrotranspozon yapısı.....	11
2.3.1 iPBS markör tekniği.....	15
3.1 Tez çalışmasında izlenen yol.....	17
3.2 Tez çalışmasında kullanılan <i>B. distachyon</i> türüne ait genotiplerin Türkiye’deki lokasyonları.....	18
3.3.1 <i>B. distachyon</i> tohumlarının ekimi ve çimlendirilmesi.....	28
3.3.4 Test edilen bazı primerlere ait jel görüntüsü.....	31
4.1 Genomik DNA’ların agaroz jeldeki saflık görüntüsü.....	36
4.3.1 iPBS 2224 primerinin ilk 63 genotipteki görüntüsü.....	42
4.3.2 iPBS 2400 primerinin ilk 63 genotipteki görüntüsü.....	42
4.3.3 iPBS 2228 primerinin ilk 63 genotipteki görüntüsü.....	43
4.3.4 iPBS 2251 primerinin ilk 63 genotipteki görüntüsü.....	43
4.3.5 iPBS verileri kullanılarak çizilen heat map.....	47
4.3.6 iPBS verileri kullanılarak Nei metoduna göre çizilen dendrogram....	48
4.3.7 iPBS verileri kullanılarak çizilen PCoA grafiği.....	49
4.3.8 PCA grafiğine ait verilerin öz değer ve kümülatif oran grafiği.....	49
4.3.9 ΔK değeri ve K değerleri grafiği.....	50
4.3.10 <i>B. distachyon</i> popülasyon yapısı analiz sonucu.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3.11 LD heat map	52
4.3.12 LD r^2 – genetik mesafe korelasyon grafikleri ve r^2 ve D' değerlerinin dağılım grafikleri.....	53
4.3.13 Göreceli akrabalık değerleri grafiği.....	54



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	<i>Brachypodium distachyon</i> türünün kromozom sayısı ve yapısı.....	5
3.2	<i>Brachypodium distachyon</i> türüne ait 235 genotip ve lokasyonları.....	19
3.3.5	Seçilen primerlerin bağlanma sıcaklıkları.....	32
3.3.6	Bir genotip için hazırlanan PCR kokteyli.....	33
3.3.7	PCR işleminin reaksiyon basamakları.....	33
4.2	İzolasyonu yapılan DNA'ların nanodrop sonuçları.....	37
4.3	iPBS primerleri ile oluşturulan bant profilleri.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
EtBr	: Etidyum bromür
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
Na-Ac	: Sodyum asetat
NaCl	: Sodyum klorür
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pg	: Pikogram
pH	: Hidrojen potansiyeli, asitlik birimi
sn	: Saniye
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
bp	: Base pairs
BAC	: Bacterial artificial chromosome
cDNA	: Complementary DNA
CTAB	: Cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
gDNA	: Genomik DNA
iPBS	: Inter Primer Binding Sites
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
Kb	: Kilo base
LINE	: Long interspersed elements
LTR	: Long terminal repeats
Mbp	: Mega base pairs
PCR	: Polimerase c'hain reactions
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Revolution per minute
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SINE	: Short interspersed elements
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
UP	: Ultra pure
UV	: Ultraviolet



1. GİRİŞ

İklim değışikliği, dünya çapında gıda üretimini etkilemektedir (Wheeler ve Von Braun, 2013) ve geleneksel ıslah metodları ile ürün verimindeki gelişme oranı, küresel talepteki artış karşısında yetersiz kalacaktır (Ray vd., 2013). Gıda ve iklim güvenliği için bilimsel disiplinler ile tarımsal yeniliklere ihtiyaç duyulmaktadır (Rivers vd., 2015).

Brachypodium distachyon, buğday, arpa, avdar,yulaf gibi yüksek ekonomik öneme sahip tüm tahıllar ve Pooideae ailesinde yer alan diğer serin mevsim buğdaygil türleri için mükemmel bir model sistemdir (Brutnell vd., 2015; Draper vd., 2001). *B. distachyon*, aynı zamanda GWAS yaklaşımı ile de *Pooideae* türleri için bir takım avantajlara sahiptir. Adaptasyonu yüksek bir tür olduğu için geniş bir coğrafi dağılıma sahip bir türdür ve böylece çeşitli yaşama stratejileri ve abiyotik stres toleransı gibi çeşitli fenotipik özelliklere sahiptir (Wilson vd., 2019).

B.distachyon genomu hali hazırda sekanslanmış ve 272 Mbp olarak belirlenmiştir. Yaklaşık olarak 17 Gbp genom büyüklüğüne sahip olan buğday ve 5,5 Gbp genom büyüklüğüne sahip olan arpa ile kıyaslandığında oldukça küçük bir genoma sahiptir (Vogel vd., 2010). Ayrıca içerdii anlamsız tekrar dizileri oranı da %21,4'tür ve buğday (%80) ve arpa (%84) ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (Vogel vd., 2010). Böylece *B. distachyon* genomundan herhangi bir sekans okumak diğer tahıl bitkilerine kıyasla çok daha kolay olmaktadır. Buna ek olarak birbirinden farklı morfolojilere sahip sadece n=5 kromozoma sahip olması, diploid olması, küçük bir habitusa sahip olması, bol miktarda iri tohum üretmesi, vegetasyon süresinin kısa olması ve yetiştirilmesinin son derece kolay olması gibi özellikleri(Wilson vd., 2019). *B.distachyon*'u tahıllar için *Arabidopsis thaliana* ve eltikten (*Oryza sativa* 'dan) daha iyi bir model sistem haline getirmiştir.

Moleküler markörler; gen modellerine göre kodominant veya dominant markörler olarak, analiz metodlarına göre hibridizasyona dayalı ve PCR'a dayalı markörler olarak, aktarım moduna göre paternal organel kalıtımı, maternal organel kalıtımı, bi-parental çekirdek kalıtımı ve maternal çekirdek kalıtımı şeklinde sınıflandırılmaktadır (Nadeem vd., 2018).

Yaklaşık tüm ökaryotik organizmaların genomuna dağılmış halde bulunan anlamsız tekrar dizilerine transposable elementler denir. Günümüze dek bu tekrar dizilerini hedef alan birçok DNA markör tekniği geliştirilmiştir. İlk olarak, bu tekrar dizileri hedef alınan hibridizasyona dayalı bir markör tekniği olan restriction fragment length polymorphism (RFLP) problrı geliştirilmiştir ve bu teknik geçmişte oldukça kullanılmıştır (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014; Spell vd., 1988). Ancak daha sonraları Southern Blot'un çeşitli zorlukları nedeniyle yerini PCR'a dayalı markör metodlarına bırakmıştır (Ruslan Kalendar, 2011).

Transpozonlar iki ana gruba ayrılmaktadır ve ilk grupta olan transpozonlar ise retrotranspozon olarak adlandırılmaktadır. RNA ara maddesi aracılığı ile kendilerini kopyalayıp yapıştırarak genom içerisinde hareket etmektedirler ve bu şekilde genomdaki miktarları artmaktadır (Ruslan Kalendar vd., 2010). İkinci gruba dahil edilen transpozonlar McClintock tarafından keşfedilen, kendilerini çift sarmal DNA olarak kesip yapıştırarak hareket eden transpozonlardır (R. Kalendar vd., 2011).

Retrotranspozonlar da kendi içlerinde yapılarına ve transpozisyon döngülerine göre iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar uzun terminal tekrar dizileri içerip içermemelerine göre adlandırılmış olan LTR ve non-LTR retrotranspozonlardır. Bitkilerde LTR retrotranspozonları, non-LTR retrotranspozonlara kıyasla daha bol bulunmaktadır ve daha aktiflerdir (R. Kalendar vd., 2011). LTR retrotranspozonları uzun terminal tekrar dizilerinden transkribe olarak RNA üretirler ve bu uzun tekrar dizilerinin hemen iç kısmında bulunan bölge ters transkripsiyon ile ekstra kromozomal cDNA oluşturmak için korunmuş priming bölgesidir (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Retrotranspozonların entegrasyon aktivitesi, kalıcılığı, dağılımı, korunmuş yapısı, sekans motifleri ve yüksek kopya sayısı gibi özellikleri moleküler markör geliştirmek için ideal bir kaynak olduğunu göstermektedir (Ruslan Kalendar vd., 2010).

Günümüze kadar çeşitli retrotranspozon tabanlı moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir; örneğin sequence-specific amplified polymorphism (SSAP), inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP). Fakat bu markör sistemlerinin uygulanabilmesi için önceden bir sekans bilgisine sahip olmak gerekmektedir (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Ancak Kalendar ve ark.(2010)'nın DNA parmak izi analizi için geliştirdiği, PCR'a dayalı bir genetik markör yöntemi olan inter primer binding sites (iPBS) markör tekniği, bir ön sekans bilgisine ihtiyaç duymamaktadır. Ayrıca bağlanma sıcaklığı ve primer

uzunluğu sayesinde sahip olduğu yüksek tekrarlanabilirlik özelliği de diğer retrotranspozon tabanlı markör sistemlerine kıyasla avantaj sağlamaktadır (Antonius-Klemola vd., 2006; Guo vd., 2014).

Retrotranspozon tabanlı bir markör sistemi olan iPBS markör tekniğinde hedef, uzun tekrar zincirlerinin iç kısmında bulunan primer bağlanma dizileridir (PBS). Bu PBS bölgelerine özel primerler dizayn edilir ve geliştirilen primerler retrotranspozonlar üzerinde bulunan PBS bölgelerine bağlanarak iki retrotranspozon arasındaki bölgeyi çoğaltmaktadır. Oluşan farklı uzunluklardaki fragmentler ise elektroforez ile ayrımlanarak görüntülenmektedir (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Çoğaltılan fragmentler iki adet PBS sekansı, iki adet LTR ve iki retrotranspozon arasındaki iç bölgeyi içermektedir (Alzohairy vd., 2014; Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Böylece Kalendar ve ark. (2010)'nın geliştirdiği iPBS markör metodu, ökaryotik canlıların genomlarındaki polimorfizmin hızlı ve kolay bir şekilde görüntülenmesini sağlamaktadır.

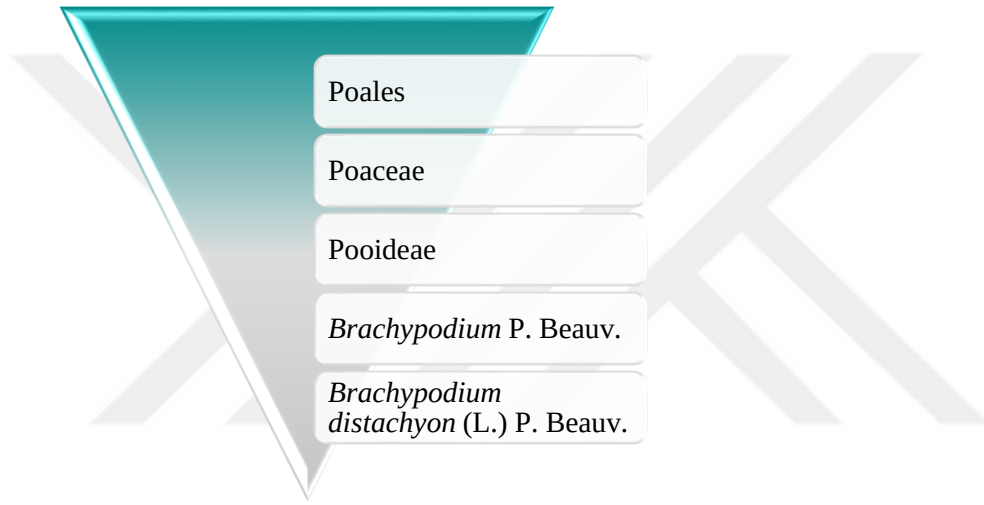
iPBS markör tekniği kullanılarak daha önce buğday, incir, çeltik, fasulye ve bamya gibi çeşitli bitki türlerinde genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısı çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu markör sisteminin oldukça güçlü ve verimli olduğu görülmüştür (Arystanbekkyzy vd., 2019; Belttar vd., 2017; Cömertpay vd., 2016; Nemli vd., 2015; Yıldız vd., 2015).

Yapılan bu tez çalışması kapsamında, iPBS primerleri kullanılarak *B. distachyon* türüne ait 235 genotipten oluşan popülasyonda genetik çeşitlilik analizi yapılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda oluşan fragmentlerin polimorfizmine göre çeşitli hesaplamalar ve analizler yapılmıştır. Nei dist yöntemi ile R programında Jaccard metoduna göre genotiplerin birbirlerine uzaklıkları hesaplanarak benzerlik matrisi oluşturulmuştur ve böylece dendrogram çıkartılmıştır. Temel bileşen analizi (PCA) yapılarak elde edilen verilerin doğruluğu güçlendirilmiştir. Ayrıca STRUCTURE programı kullanılarak popülasyon yapısı incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçların, *B. distachyon* ve *Pooideae* içerisinde yer alan ekonomik öneme sahip tahıllar ve diğer tüm serin mevsim buğdaygileri üzerinde çalışan araştırmacılar için yararlı olmasını umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Brachypodium distachyon*

Latince ismi Poaceae olan ve 10 000’den fazla tür içeren buğdaygiller familyasının sahip olduğu üç alt aileden en büyüğü olan ve buğday, arpa ve çavdar gibi önemli tahılları ve yem bitkilerini içeren Pooideae alt ailesinin sekanslanan ilk üyesi olan *Brachypodium distachyon* türü, yapı ve gelişim bakımından tipik bir otsudur (Draper vd., 2001; Vogel vd., 2010, 2009).



Şekil. 2.1. *B. distachyon* türünün taksonomik yapısı.

Geçtiğimiz birkaç bin yılda insanlar, Poadeae familyasına ait buğdaygil türlerinin bir kısmını evcilleştirerek buğday, çeltik, mısır ve sorgum gibi birçok önemli kültür bitkisinin oluşmasını sağlamıştır. Bu evcilleştirilerek oluşturulan “core Pooid” alt ailesinin evrimsel gelişiminde *Brachypodium* öncü olarak görülmektedir (Draper vd., 2001).

Dünyada tüketilmekte olan gıdaların yaklaşık %60'ı buğdaygillerden elde edilmektedir ve ekonomik olarak oldukça öneme sahiptir (Keller ve Feuillet, 2000). Önemli bir buğdaygil bitkisi olan *B. distachyon* türünün doğal yayılış gösterdiği alanlar, küçük taneli tahılların ataları ile büyük ölçüde örtüşen ve ılıman bölgeler olan Orta Doğu'yu ve Akdeniz'i kapsamaktadır (Opanowicz vd., 2008; Vogel vd., 2010).

Genom boyutu oldukça küçük olan *B. distachyon*'un genomu, başlangıçta 0,21 pg/ haploid genom olarak tahmin edilen ve şu anda 0,36 pg/ haploid genom kabul edilen ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$) C değeriyle yaklaşık olarak 272 Mbp'dan ve $n = 5$ temel kromozom sayısı ile 6 adet haritalanmamış scaffolddan oluşmaktadır (Opanowicz vd., 2008; Ozdemir vd., 2008). *Arabidopsis*, nispeten daha küçük genoma (135 Mbp) sahip olmasına rağmen filogenetik olarak Poaceae ailesine oldukça uzaktır. *B. distachyon*, Poaceae familyasındaki en küçük genoma sahip tür olması ve iyi bir model bitkide bulunması gereken bir çok özelliğe sahip olması nedenleriyle Poaceae içerisinde yer alan tüm serin mevsim buğdaygilleri için model sistem olarak seçilmiş ve kabul görmektedir (Draper vd., 2001).

Tablo 2.1. *Brachypodium distachyon* türünün kromozom sayısı ve yapısı.

Kromozom	Uzunluk (bp)	Kromozom Haritası	Gen Sayısı
1	74 834 646	Kromozom 1	8 976
2	59 328 898	Kromozom 2	6 965
3	59 892 396	Kromozom 3	7 012
4	48 648 102	Kromozom 4	5 050
5	28 444 383	Kromozom 5	2 991
6	774 881	78 adet haritalanmamış scaffold	0
Toplam			
6	271 923 306	5 Kromozom ve 78 scaffold	30 994

Buğdaygiller içerisinde en küçük genoma sahip olan *B. distachyon*'un kendine döllen bir bitki olması, kolay büyüme koşullarına sahip olması, generasyon süresinin kısa olması (8 hafta), fiziksel boyunun kısa olması (yaklaşık olarak 20 cm), yaşam döngüsünün 4 aydan daha kısa olması ve genetik transformasyon kolaylığı gibi arzu edilen ve izlenebilir bir deneysel modelin gerektirdiği birçok özelliğin kombinasyonuna sahip bir yabancı bitkidir (Bevan vd., 2010; Draper vd., 2001; Opanowicz vd., 2008; Ozdemir vd., 2008).

Yüksek verimli transformasyon, gen kaynakları koleksiyonları, genetik markörler, gen bağlantı haritası, BAC (bacterial artificial chromosome) kütüphaneleri, fiziksel haritalar, mikroçip ve veritabanı geliştirmeyi kolaylaştıran bu türün genom sekansının çeltik ve sorgumun gen içeriği ve gen aile yapısı bakımından benzerlikleri, tüm buğdaygil bitkileri için güçlü bir fonksiyonel genomik kaynağı olduğunu göstermektedir (Opanowicz vd., 2008).

Serin mevsim buğdaygil bitkilerinin tohumları un, nişasta, şeker, şurup, yağlar ve malt gibi doğrudan insan yiyecekleri için ve dolaylı olarak hayvan yemi olarak kullanılır, mahsul artıkları ise küçük bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Ancak son zamanlarda bu atıkları kullanma ve biyoyakıt üretimi için yeni ürünler geliştirme konusunda büyük ilgi vardır (Opanowicz vd., 2008). Yenilenebilir enerji ve gıda üretimi amacıyla dallıdır, buğday ve serin mevsim yem bitkileri gibi buğdaygil türleri üzerinde yapılan araştırmaların artması gerekmektedir (Opanowicz vd., 2008; Vogel vd., 2010).

Büyük bir habitusa sahip olmaları, genomlarının büyüklüğü ve yetiştirilmelerindeki güçlükler gibi nedenlerden dolayı son yıllarda geliştirilmekte olan enerji bitkileri üzerinde bilimsel çalışmalar (mutant ekranlar, transgenik manipülasyon, kontrollü koşullar altında büyüme) yapmayı son derece zorlaştırmakta ve bu nedenle iyi bir modele sahip olmak avantaj sağlamaktadır (Vogel vd., 2009).

B. distachyon, sahip olduğu avantajlar nedenleriyle tahıllar için bu güne kadar model olarak kullanılan çeltik ve ilk model bitki olan *Arabidopsis thaliana* ya göre daha iyi bir model sistemdir. Bu model sistem ile yapılacak olan çalışmaların başta tahıllar olmak üzere tüm serin mevsim buğdaygilleri üzerinde yapılan bilimsel çalışmaları kolaylaştırarak genomik bilgi üretimine hız katması beklenmektedir (Bevan vd., 2010). Geleneksel bir model olarak hizmet etmenin yanı sıra *Brachypodium*, son derece verimli *Agrobacterium* aracılı transformasyon sistemi ve hızlı üretim süresi sayesinde buğdaygil

bitkilerindeki transgenik yaklaşımlar için mükemmel bir sistemdir (Vogel vd., 2009). Genom sekansının mevcut olmasının sağladığı avantaj ile transformasyon, mutagenез ve gen haritalama için moleküler ve genetik araçlara sahiptir (Opanowicz vd., 2008).

Brachypodium cinsi içerisinde yer alan *Brachypodium sylvaticum* da model olarak daha buğday ve arpa klonlama projeleri gibi moleküler çalışmalar da kullanılmıştır. Ancak *B. sylvaticum* çok yıllık yabancı döllen bir tür olup, genomu *B. distachyon*'a kıyasla çok daha büyüktür (Opanowicz vd., 2008; Vogel vd., 2009). Brkljacic vd., (2011) ile Ozdemir vd., (2008)' nin çalışmaları bu tür çalışmalara örnek olarak gösterilebilir. Yapılan transpozon çalışmalarında *B. distachyon* genomunun %21.4'ünü retrotranspozonların oluşturduğu belirlenmiştir.. Çeltik (%26), sorgum (%54) ve buğday (%80'den fazla) ile karşılaştırıldığında *B. distachyon*' un retrotranspozon içeriğinin çok daha düşük olduğu dikkat çekmektedir (Vogel vd., 2010).

2.2. Transpozonlar

Birkaç nadir tür dışında çoğu ökaryotik organizmanın genomunun büyük bir kısmını dağılmış tekrar dizileri oluşturmaktadır ve büyük ölçekli DNA sekanslamaları sonucunda görülmüştür ki bu diziler ağırlıklı olarak çeşitli mekanizmalar kullanarak genom içerisinde kendisini çoğaltabilen ve başka lokasyonlara taşıyabilen transposable (mobil) elementlerdir (Havecker vd., 2004; R. Kalendar vd., 2011; Wicker vd., 2007).

Transposable elementler, RNA ara maddesi veya DNA ara maddesi gibi çeşitli replikatif stratejiler kullanmaktadır. Ökaryotik canlıların yaşam ağacında bu kadar geniş bir şekilde bulunmaları, transpozonların oldukça uzun bir geçmişe sahip olduğunu göstermektedir (Feschotte, 2008).

Plasmodium falciparum ve buna yakın bazı türler hariç tüm ökaryotik ve prokaryotik canlıların genomunda bulunurlar (Wicker vd., 2007). Genom içerisinde kendilerini kopyalama ve konum değiştirme yetenekleri sayesinde canlıların genomlarının boyutunu arttırırken, eklendikleri yerlere göre genomda gen delesyonu, genin farklı ifade edilmesi gibi bazı mutasyonlara sebep olabilmektedirler (Havecker vd., 2004). Barbara McClintock, transpozonları ilk kez 1950 yılında, mısır (*Zea mays*) bitkisinde yer değiştirebilen kontrol elementleri olarak keşfetmiştir.

Transposable elementler kendi içlerinde oldukça büyük bir çeşitlilik göstermekle birlikte insan genomunun %45'ini teşkil ederken, bitki genomlarının yarısından fazlasını, hatta %90'ı kadarını oluşturabilirler (Capy vd., 1998; Cho, 2018; Ruslan Kalendar, 2011; Ruslan Kalendar vd., 2010). Küçük bir genoma sahip olan *Utricularia gibba* bitkisinin genomunun yaklaşık olarak %3'ünü oluştururken, büyük bir genoma sahip olan mısır bitkisinin genomunun yaklaşık olarak %85'ini oluşturmaktadırlar (Ibarra-Laclette vd., 2013; Schnable vd., 2009). Yaklaşık olarak 500 Mbp genoma sahip olan bitki türlerinde (çeltik, sorgum, vb.) genomun yaklaşık olarak %30'unu transposable elementler oluşturmaktadır. Bu nedenle, transposable element oranının bitki genomlarında %30 olduğu sanılıyordu (Michael, 2014). Ancak günümüzde, yüksek doğruluğa sahip büyük genom bilgileri ve efektif biyoinformatik araçlar sayesinde tekrar eden diziler hakkında daha fazla bilgi edinilmektedir ve böylece transposable element oranının her bitkide çeşitlilik gösterdiği bilgisine ulaşılmıştır (Kim vd., 2012; Levy, 2013).

Transposable elementler iki farklı replikasyon mekanizması kullanırlar:

- Sınıf I Transposable Elementler: Kendisinden bir RNA üreterek ve daha sonra bunu cDNA'ya dönüştürerek farklı lokasyona yerleşmesi mekanizmasıdır. Retrotranspozon olarak adlandırılan bu transpozon türünde RNA ara formu kullanılır. Genom içerisindeki sayıları artmaktadır.
- Sınıf II Transposable Elementler: Kendisini genom içerisinde kesip çıkararak farklı bir lokasyona yerleşmesi mekanizmasıdır. DNA ara formu şeklinde taşınırlar. Genom içerisindeki sayıları sabittir (R. Kalendar vd., 2011; Ruslan Kalendar, 2011; Ruslan Kalendar vd., 2010).

Birçok bitki genomunda retrotranspozonların miktarı sınıf II transposable elementlere kıyasla çok daha fazladır. Özellikle LTR retrotranspozonları, transposable elementler ailesinde oldukça baskındır (Mirouze ve Vitte, 2014).

Transposable (mobil) elementlerden; entegrasyon aktivitesi, dağılımı ve yüksek kopya sayısı gibi genomik özellikleri sayesinde çeşitli yollarla moleküler markör olarak yararlanılmaktadır (Ruslan Kalendar vd., 2010). Bu markörler DNA fingerprinting, genetik çeşitlilik ve filogeni analizlerinde, genom haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır (Poczai vd., 2013).

2.2.1. Retrotranspozonlar

Retrotranspozonlar, retrovirüsler gibi RNA ara maddesi üreterek ve sonrasında ters transkripsiyon ile cDNA oluşturarak farklı bir lokusta genoma tekrar entegre olarak hareket ederler ve orjinal kopyaları genomda varlığını sürdürmeye devam eder. Böylece genomdaki miktarları artarken aynı zamanda hareket ederler (Havecker vd., 2004; R. Kalendar vd., 2011; Ruslan Kalendar vd., 2010). Ancak retrovirüslerin yaptığı gibi genomdan ayrılarak başka hücreleri enfekte etmek yerine retrotranspozonlar yalnızca kopyalarını genoma entegre ederler. Bu entegrasyon polen veya yumurta hücrelerinde gerçekleşirse polimorfizme neden olabilir (Havecker vd., 2004).

Kendisini tekrarlayan ve yer değiştiren retrotranspozonlar, hemen hemen bütün ökaryotik genomlarda ve özellikle bitkilerde bol miktarda bulunan bileşenlerdir (R. Kalendar vd., 2011; Ruslan Kalendar vd., 2010). Nispeten kısa evrimsel zaman çizgisine göre kopya sayısında büyük ölçüde değişiklik gösteren ve bitki genomunun yapısal evriminin majör componentini temsil eden, en değişken genomik bileşendir (Ruslan Kalendar, 2011). Yüksek bitkilerde tekrarlanarak toplam DNA miktarına önemli ölçüde katkı sağlarlar ve genomun yarısından fazlasını oluşturabilirler (Ruslan Kalendar vd., 2010). Örneğin, mısır genomunun %75'inden fazlasını retrotranspozonlar oluşturmaktadır ve bu retrotranspozonların büyük kısmı LTR- retrotranspozonlarıdır (Monden vd., 2014).

Retrotranspozonlar da kendi içerisinde yapısına ve transpozisyon döngüsüne göre iki alt gruba ayrılmaktadır;

- Uzun terminal tekrar dizileri bulunduran ve bitki genomlarında baskın bulunan LTR retrotranspozonlar
- Uzun tekrar dizileri bulundurmayan non-LTR retrotranspozonlar (long interspersed repetitive elements (LINE) ve short interspersed repetitive elements (SINE)) (R. Kalendar vd., 2011; Ruslan Kalendar, 2011).

Bitki genomlarındaki uzun terminal tekrar dizileri (LTR) içeren sınıf I retrotranspozon miktarı non-LTR retrotranspozonlarına kıyasla daha bol ve aktiftir ve genomdaki miktarı %40 ile %70 arasında değişmektedir (Ruslan Kalendar, 2011; Ruslan Kalendar vd., 2010; Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Her ne kadar en yaygın retrotranspozonlar genom boyunca dağılmış olsa da, tahıllarda ve turuncgillerde genellikle bölgesel olarak birbirine yakın ve iç içe geçmiş şekilde bulunurlar (Ruslan Kalendar, 2011).

Retrotranspozonlar, RNA üretmek için uzun tekrar dizilerinden transkribe olurlar ve uzun tekrar dizilerinin hemen iç kısmında bulunan bölge ters transkripsiyon ile ekstra kromozomal cDNA oluşturmak için korunmuş priming bölgesidir (Ruslan Kalendar, 2011; Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014).



Şekil 2.2.1. LTR retrotranspozon yapısı.

LTR retrotranspozonları, iki ucu arasında ayrılan bir tek LTR kopyası içeren bir RNA kopyası üretmek için uzun terminal tekrar dizileri içeren 5'LTR bölgesinden transkribe olur. Bu RNA daha sonra HIV gibi lentivirüslerin yaptığı gibi ters transkripsiyon ile genoma tekrar entegre olacak olan ekstra kromozomal cDNA oluşturur (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). 5'LTR'lerin hemen iç kısmı ters transkripsiyon için priming bölgeleridir. Retrotranspozonun büyük merkezi kısmı, RNA'nın yerleştirildiği virüs benzeri bir partikülün yapısal bileşenlerini, ters transkriptaz ve integras enzimi ile birlikte kodlar (Ruslan Kalendar, 2011). Hem genel yapısal özellikler, hem de yaşam döngüsünün temel adımları, retrotranspozonlar ve retrovirüsler tarafından paylaşılmaktadır (Havecker vd., 2004).

Retrovirüslerde de GAG ve Pol genleri, LTR ve PBS bölgeleri bulunmaktadır. Retrovirüsler ile retrotranspozonların bazı küçük farklılıkları bulunmaktadır. Bunlardan en belirginini ENV genidir. Retrotranspozonlar, retrovirüslerin yaptığı gibi kendilerini kopyaladıktan sonra bir zarf proteini üreterek başka konakçıları enfekte etmezler. Bu nedenle de zarf proteini üreten ENV geni bulundurmazlar. Retrotranspozonlarda bulunan GAG geni, Gag kapsid proteininin üretiminden sorumlu gendir. Pol ise AP (aspartik proteinaz), RT (reverse transkriptaz), RH (Rnase H) ve INT (integraz) genlerini bulundurmaktadır. Bu Pol genleri de aynı şekilde retrovirüslerde bulunmaktadır (Ruslan Kalendar, 2011).

Retrotranspozonların entegrasyon aktivitesi, kalıcılığı, genel dağılımları, korunmuş yapısı, sekans motifleri, yüksek kopya sayısı gibi özellikleri moleküler markör geliştirmek için ideal bir kaynak olduğunu göstermektedir (Ruslan Kalendar vd., 2010).

İnsan ve diğer memeli genomlarında bulunan retrotranspozonların çoğunluğu uzun terminal tekrar dizileri içermeyen non-LTR retrotranspozonlar olup, biraz farklı bir kopyala yapıştır mekanizmasına sahip olan LINE ve SINE gruplarını içermektedir. LINE elementlerinin L1 ailesi ve SINE elementlerinin Alu ailesi insan genomik DNA'sının yaklaşık olarak %30'unu, 2 milyon bazı içermektedir. Memelilerdeki SINE gibi Alu tekrarları genom boyunca dağılım göstermektedir ve bu tekrarların herhangi birine bağlanan primer sekansları ile spesifik olmayan birçok bant üretilir ve Alu tekrar polimorfizmlerini tespit etmek için markör olarak kullanılabilir (Ruslan Kalendar, 2011; Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014; Kumar ve Hirochika, 2001).

2.3. Moleküler Markörler

Moleküler markörler, farklı genotipler arasındaki ilişkiyi ve hangi eşleşmelerin yeni ve daha iyi gen kombinasyonları üretebileceğini tahmin etmeyi sağlayan genetik varyasyon araçlarıdır (Ruslan Kalendar vd., 2010). Moleküler markörlerin genotipleri birbirinden ayırt etme kabiliyetlerinin yüksek olması, stabilite, maliyetleri ve kullanım kolaylıkları gibi özellikleri genetik çalışmalarda kullanılmaya oldukça uygun olduğunu göstermektedir (Grover ve Sharma, 2016).

Biyokimya ve moleküler biyolojideki önemli gelişmelerle birlikte DNA markör sistemleri son 40 yılda önem kazanmıştır (Ruslan Kalendar, 2011). Daha önceleri kullanılan morfolojik markörler çevresel faktörlerin fenotipi etkilemesi, genotipin her zaman fenotipte görünmemesi gibi etkenlerden dolayı oldukça dezavantaja sahiptir (Mondini vd., 2009). Biyokimyasal markör sistemindeki allozim ve izozim gibi enzimler ve sekonder metabolit gibi biyokimyasalların stabil olmaması ve çeşitli zorluklarının bulunması da biyokimyasal markörlerin kullanımını azaltmıştır (Ruslan Kalendar, 2011). Bu markör sistemlerinin zorlukları ve bitki genom sekanslama ile ilgili bilgi artışı ve bunun gibi birçok gelişme DNA polimorfizmine dayalı markörlerin gelişmesini hızlandırmıştır (Grover ve Sharma, 2016; Ruslan Kalendar, 2011; Nadeem vd., 2018).

DNA markörleri; genetik çeşitlilik ve dağılımın araştırılmasında, bağlantı haritalarının oluşturulmasında, gen saptamada, filogenetik analiz yapmada ve belirli genleri taşıyan genotiplerin veya hatların incelenmesinde önemli bir role sahiptir (Ruslan Kalendar, 2011).

Genetik markörler uygulanış şekillerine göre temel olarak ikiye ayrılmaktadır:

- Hibridizasyona dayalı markörler (RFLP, restriction fragment length polymorphism) ve
- PCR (polimerase chain reaction)'a dayalı markörler.

RFLP markör tekniğinde restriksiyon endonükleazları kullanılarak gDNA (genomik DNA) kesilir ve çeşitli problemlara hibridize olan değişik uzunluktaki nükleotid fragmentleri incelenir (Grover ve Sharma, 2016).

Primer olarak kullanılan küçük DNA fragmentlerinin amplifikasyonuna dayalı olan PCR tekniği 1983 yılında Carry Mullis tarafından geliştirilmiştir ve moleküler markör teknolojisinde bir çığır açmıştır (Ruslan Kalendar, 2011; Mullis ve Faloona, 1987). Kullanılan primer ve primerin bağlanacağı hedef bölgeye göre çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Nadeem vd., 2018).

Moleküler markörlerin çeşitli avantajları vardır:

- Çevresel faktörlerden etkilenmezler,
- Genomdaki herhangi bir sekansa uygulanabilirler,
- Pleiotropik veya epistatik etki göstermezler,
- Fenotipik varyasyon göstermeyen polimorfizmleri ayırt edebilirler (Mondini vd., 2009).

Çeşitli retrotranspozon tabanlı markör sistemleri geliştirilmiştir:

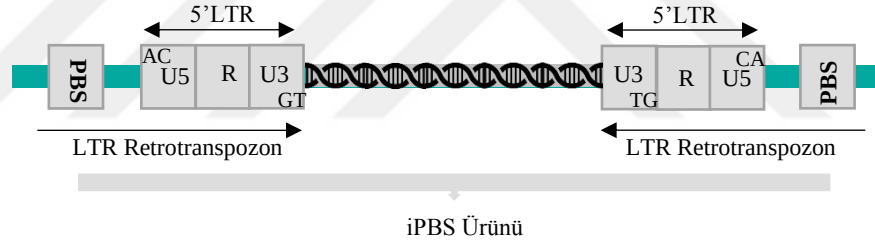
- Sequence-specific amplified polymorphism (SSAP)
- Inter-retrotranspozon amplified polymorphism (IRAP)
- Retrotranspozon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP)
- Retrotranspozon-based insertional polymorphism (RBIP)
- Tagged microarray marker (TAM)
- Retrotranspozon UTL polymorphism fingerprinting (RUP)

Tüm bu retrotranspozon tabanlı markör sistemlerinde sekans bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Transposable elementlere özel primer geliştirmek için sekans bilgisine ihtiyaç duyulması tüm retrotranspozon tabanlı markör sistemlerinde genel bir problemdir. Ancak inter Primer Binding Sites (iPBS) markör tekniği bu problemin üstesinden gelmektedir (Alzohairy vd., 2014).

2.3.1. iPBS markör yöntemi

Retrotranspozonlara ait polimorfizmin izolasyonu ve görüntülenmesi için son zamanlarda iPBS metodu kullanılmaktadır. iPBS amplifikasyon tekniği önceden belirlenmiş bir sekans bilgisine ihtiyaç duymadığı için ve bağlanma sıcaklığı ve primer uzunluğu sayesinde yüksek tekrarlanabilirliği ile, diğer retrotranspozon bazlı markörlere kıyasla oldukça avantajlıdır (Antonius-Klemola vd., 2006; Guo vd., 2014). Ayrıca düşük maliyeti ve yüksek verimliliği de iPBS retrotranspozonlarını iyi bir markör sistemi yapmaktadır (Ali vd., 2019).

LTR bölgeleri, PCR ile direkt amplifikasyona izin veren korunmuş motif içermez (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Ancak primer bağlanma sekansı (PBS), LTR retrotranspozonlarının üzerindeki uzun tekrar dizilerinin yanında bulunan bir bölgedir ve genel olarak korunmaktadır. Genom üzerinde birbirine yakın ve içiçe geçmiş olarak bulunmaktadır (Ruslan Kalendar, 2011).



Şekil 2.3.1. Kalendar ve ark. (2010) geliştirdiği iPBS markör tekniği.

Kalendar ve ark. (2010) geliştirmiş olduğu iPBS metodunda bu korunan PBS bölgeleri hedef alınmaktadır. PBS bölgelerine özel primerler dizayn edilmiştir ve Şekil 2.3.1’de gösterildiği üzere PCR amplifikasyonu iki PBS arasında gerçekleşmektedir (Ruslan Kalendar vd., 2010). İki farklı retrotranspozondaki aynı PBS bölgelerine bağlanan primerler, iki retrotranspozon arasını çoğaltmaktadır (Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Oluşan fragmentler iki adet PBS, iki adet LTR ve aradaki iç bölgeyi içermektedir (Alzohairy vd., 2014; Ruslan Kalendar ve Schulman, 2014). Böylece Kalendar ve ark. (2010), ökaryotik genomların hızlı ve kolay bir şekilde incelenmesine olanak sağlamışlardır. Genotipler arası polimorfizmin görüntülenmesi için oldukça verimli ve evrensel bir tekniktir.

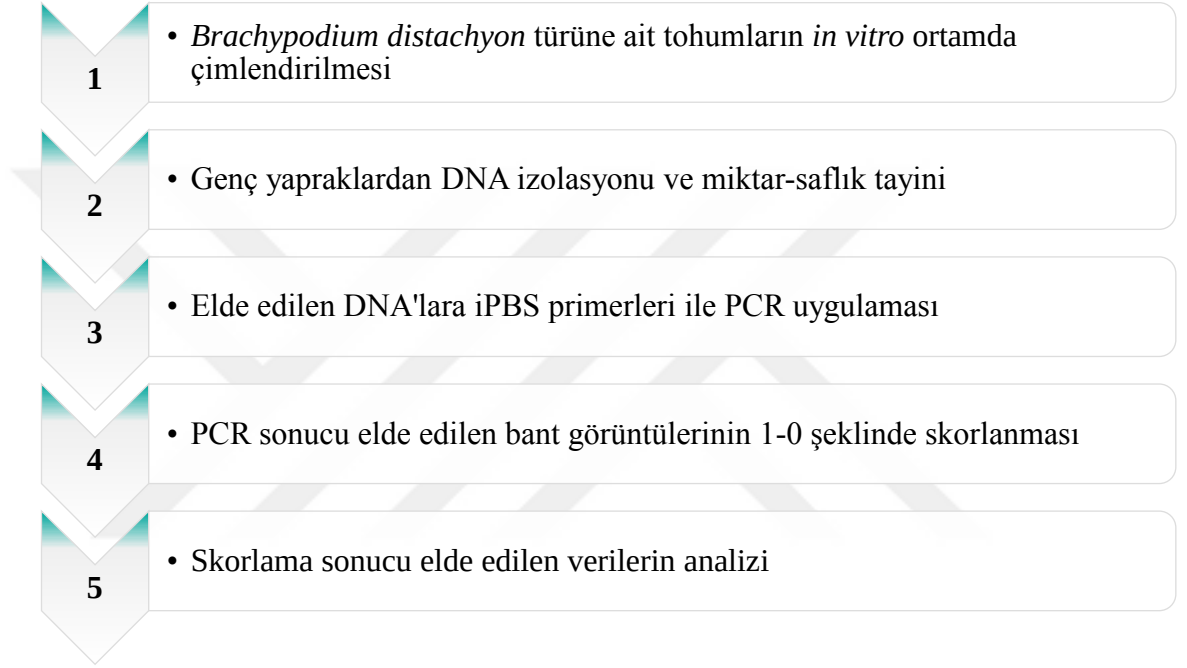
iPBS markör sistemi daha önce üzüm (*Vitis vinifera* L.) (Guo vd., 2014), bezelye (*Pisum sativum*) (Baloch vd., 2015), fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) (Nemli vd., 2015), nohut (*Cicer arietinum*) (Andeden vd., 2013), kayıngiller (*Fagaceae*) (Coutinho vd., 2018) ve guava (*Psidium guajava*) (Mehmood vd., 2016) gibi çeşitli bitkilerde genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılmış ve kullanılan türlerin popülasyon yapıları analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu markör sisteminin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışma Planı

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Serası ve Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İzlenen yol aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1):

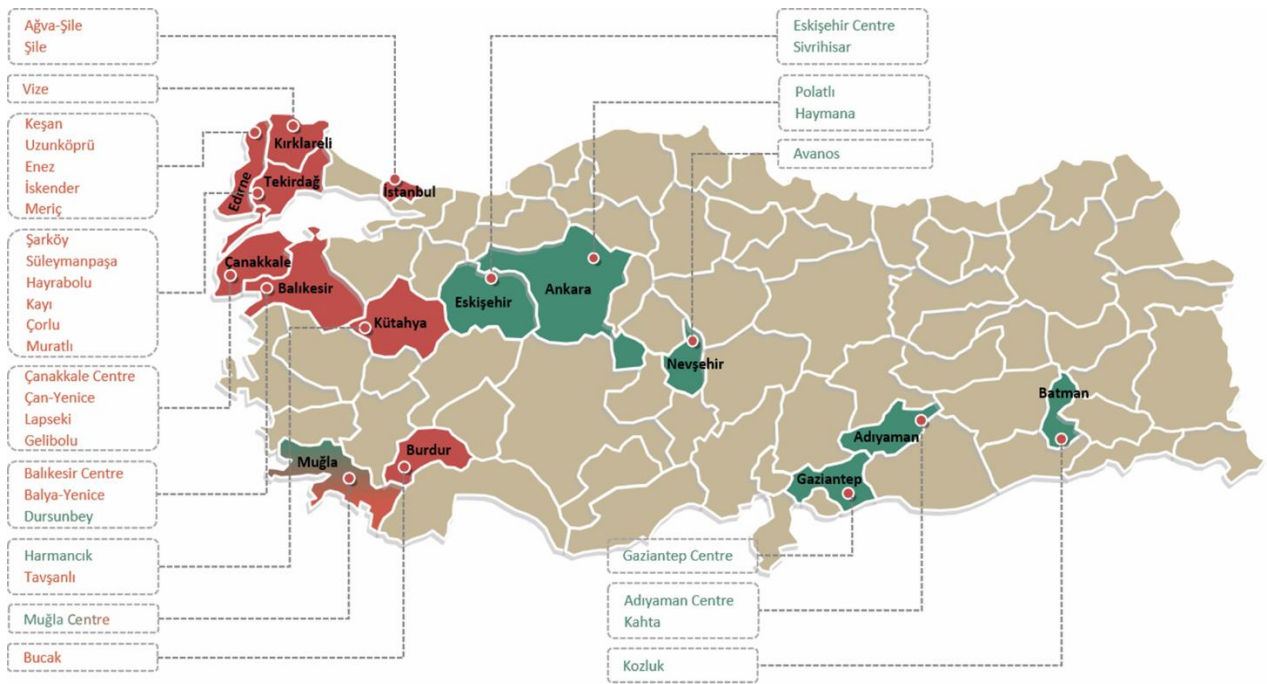


Şekil 3.1. Tez çalışmasında izlenen yol.

3.2. Kullanılan Materyaller

3.2.1. Bitki materyali

DNA materyali olarak *B. distachyon* türüne ait Türkiye'nin farklı lokasyonlarına ait 235 genotip tohumu Prof. Dr. Metin Tuna tarafından temin edildikten sonra bu tohumlar çimlendirilerek gelişen genç yapraklar kullanılmıştır. Bu genotipler Şekil 3.2. ve Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan *Brachypodium distachyon* türüne ait 235 genotipin Türkiye'deki lokasyonları

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan *Brachypodium distachyon* türüne ait 235 genotip ve lokasyonları

Genotip No	Genotip Adı	Toplandığı Lokasyon	Koordinat		Rakım	Ploidi Seviyesi
Geno1	Koz 3a	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno2	90-3	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026° 25.482'	415 feet	Diploid
Geno3	83-18	TÜBİTAK Gen Merkezi	N 40° 47.189'	E 029° 27.601'	593 feet	Mixed
Geno4	46-3	Burdur-Bucak-2	N 37° 28.672'	E 030° 33.631'	854 m	Diploid
Geno5	69-7	Çanakkale Serçeler Köyü	N 40° 03.470'	E 026° 35.758'	362 feet	Diploid
Geno6	14-1	Kayı Köyü, Tekirdağ	N 41° 02.537'	E 027° 30.374'	720 feet	Diploid
Geno7	67-3	Harmancık- Kütahya	N 39° 40.773'	E 029° 08.846'	2240 feet	Diploid
Geno8	67-2	Harmancık- Kütahya	N 39° 40.773'	E 029° 08.846'	2240 feet	Diploid
Geno9	11-6	Çeneköy, Hayrabolu	N 41° 12.029'	E 027° 11.192'	275 feet	Diploid
Geno10	65-8	Balıkesir merkez II Kütahya çıkışı	N 39° 41.131'	E 027° 58.782'	642 feet	Diploid
Geno11	39-2	Danişment (deniz kenarı)	N 40° 36.007'	E 026° 24.876'	20 feet	—
Geno12	5-3	Olacak, Meriç	N 41° 12.275'	E 026° 28.639'	334 feet	Diploid
Geno13	45-7	Burdur-Bucak-1	N 37° 28.679'	E 030° 33.541'	862 m	Diploid
Geno14	Koz 46	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno15	5-6	Olacak, Meriç	N 41° 12.275'	E 026° 28.639'	334 feet	Diploid
Geno16	5-9	Olacak, Meriç	N 41° 12.275'	E 026° 28.639'	334 feet	Diploid
Geno17	5-13	Olacak, Meriç	N 41° 12.275'	E 026° 28.639'	334 feet	Diploid
Geno18	28-10	Beğendik	N 40° 56.692'	E 026° 34.106'	378 feet	Diploid
Geno19	90-8	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026° 25.482'	415 feet	Diploid
Geno20	34-12	Ahmetli, Şile	N 41° 09.394'	E 029° 34.811'	29 feet	Diploid
Geno21	46-4	Burdur-Bucak-2	N 37° 28.672'	E 030° 33.631'	854 m	Diploid
Geno22	33-14	Üveyizli, Şile	N 41° 06.690'	E 029° 25.759'	253 feet	Diploid
Geno23	33-4	Üveyizli, Şile	N 41° 06.690'	E 029° 25.759'	253 feet	Diploid
Geno24	93-14	Balya Yenice arası II	N 39° 46.888'	E 027° 24.375'	1740 feet	Diploid
Geno25	9-14	Bıyıklı, Tekirdağ (3)	N 41° 00.891'	E 027° 25.351'	860 feet	Diploid
Geno26	91-11	Çanakkale Bursa Yolu Başlangıcı	N 38° 43.864'	E 034° 49.910'	155 feet	Diploid
Geno27	97-20	Kütahya yolu Dursunbey-Harmancık arası	N 39° 39.306'	E 029° 01.933'	2020 feet	Diploid
Geno28	Koz 46	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno29	Adi 46	Adıyaman	—	—	—	Diploid
Geno30	Koz 26	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno31	35-12	Şile	N 41° 09.532'	E 029° 37.526'	95 feet	Mixed
Geno32	42-7	Hasköy, Enez	N 40° 38.717'	E 026° 16.342'	124 feet	Diploid
Geno33	38-3	Kılıçköy, Keşan	N 40° 47.768'	E 026° 34.282'	130 feet	Diploid
Geno34	Gaz 6	Gaziantep-1	—	—	—	Diploid
Geno35	Gaz 2	Gaziantep-1	—	—	—	Diploid
Geno36	92-20	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028° 37.931'	2215 feet	Diploid
Geno37	66-14	Şehitlik II Çanakkale	N 40° 14.653'	E 026° 17.708'	605 feet	Diploid
Geno38	35-6	Şile	N 41° 09.532'	E 029° 37.526'	95 feet	Mixed
Geno39	34-11	Ahmetli, Şile	N 41° 09.394'	E 029° 34.811'	29 feet	Diploid
Geno40	97-24	Kütahya yolu Dursunbey-Harmancık arası	N 39° 39.306'	E 029° 01.933'	2020 feet	Diploid

Geno41	99-11	Muğla	N 37° 07.545'	E 028°22.724'	2079 feet	Diploid
Geno42	Koz 1	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno43	108-17	Eskişehir	N 39° 43.058'	E 030°40.601'	3005 feet	Diploid
Geno44	92-21	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028°37.931'	2215 feet	Diploid
Geno45	109-11	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno46	99-23	Muğla	N 37° 07.545'	E 028°22.724'	2079 feet	Diploid
Geno47	108-11	Eskişehir	N 39° 43.058'	E 030°40.601'	3005 feet	Diploid
Geno48	24-5	Ballı, Şarköy	N 40° 49.633'	E 027° 04.405'	538 feet	Diploid
Geno49	97-25	Kütahya yolu Dursunbey-Harmancık arası	N 39° 39.306'	E 029°01.933'	2020 feet	Diploid
Geno50	100-3	Kütahya-Eskişehir arası	N 39° 34.643'	E 030°07.208'	3090 feet	Diploid
Geno51	92-15	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028°37.931'	2215 feet	Diploid
Geno52	Kah 2	Kahta (Adıyaman)	—	—	—	Diploid
Geno53	8-3	Bıyıklı, Tekirdağ (2)	N 41° 02.028'	E 027° 22.162'	482 feet	Diploid
Geno54	105-8	Kütahya Tavşanlı çıkışı	N 39° 32.222'	E 029°38.014'	3370 feet	Diploid
Geno55	Gaz 4	Gaziantep-1	—	—	—	Diploid
Geno56	94-1	Balıkesir Merkez	N 39° 38.741'	E 027°46.100'	827 feet	Diploid
Geno57	92-18	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028°37.931'	2215 feet	Diploid
Geno58	Koz 3a	Kozluk (Batman)	—	—	—	Diploid
Geno59	93-14	Balya Yenice arası II	N 39° 46.888'	E 027°24.375'	1740 feet	Diploid
Geno60	62-23	Çan ile Yenice arası	N 39° 57.891'	E 027°11.662'	1000 feet	Diploid
Geno61	97-16	Kütahya yolu Dursunbey-Harmancık arası	N 39° 39.306'	E 029°01.933'	2020 feet	Diploid
Geno62	17-11	Vize	N 41° 32.076'	E 027° 50.014'	446 feet	Diploid
Geno63	38-4	Kılıçköy, Keşan	N 40° 47.768'	E 026° 34.282'	130 feet	Diploid
Geno64	93-18	Balya Yenice arası II	N 39° 46.888'	E 027°24.375'	1740 feet	Diploid
Geno65	66-14	Şehitlik II Çanakkale	N 40° 14.653'	E 026°17.708'	605 feet	Diploid
Geno66	17-6	Vize	N 41° 32.076'	E 027° 50.014'	446 feet	Diploid
Geno67	66-12	Şehitlik II Çanakkale	N 40° 14.653'	E 026°17.708'	605 feet	Diploid
Geno68	17-13	Vize	N 41° 32.076'	E 027° 50.014'	446 feet	Diploid
Geno69	12-20	Buzağıcı, Hayrabolu	N 41° 15.349'	E 027° 08.400'	177 feet	Diploid
Geno70	26-12	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno71	4-1	Çiftlik, Uzunköprü	N 41° 15.686'	E 026° 37.298'	111 feet	Diploid
Geno72	4-2	Çiftlik, Uzunköprü	N 41° 15.686'	E 026° 37.298'	111 feet	Diploid
Geno73	11-5	Çeneköy, Hayrabolu	N 41° 12.029'	E 027° 11.192'	275 feet	Diploid
Geno74	68-4	İlgardere-Gelibolu	N 40° 15.889'	E 026°28.859'	60 feet	Diploid
Geno75	42-4	Hasköy, Enez	N 40° 38.717'	E 026° 16.342'	124 feet	Diploid
Geno76	17-7	Vize	N 41° 32.076'	E 027° 50.014'	446 feet	Diploid
Geno77	68-2	İlgardere-Gelibolu	N 40° 15.889'	E 026°28.859'	60 feet	Diploid
Geno78	3-4	Çakmak, Edirne	N 41° 23.438'	E 026° 39.637'	283 feet	Diploid
Geno79	8-4	Bıyıklı, Tekirdağ (2)	N 41° 02.028'	E 027° 22.162'	482 feet	Diploid
Geno80	96-10	Pada Köyü Kepsut-Dursunbey arası Balıkesir	N 39° 44.669'	E 028°21.423'	1660 feet	Diploid
Geno81	93-2	Balya Yenice arası II	N 39° 46.888'	E 027°24.375'	1740 feet	Diploid
Geno82	88-16	Avanos III Nevşehir	N 38° 44.536'	E 034°50.289'	3796 feet	Diploid
Geno83	42-2	Hasköy, Enez	N 40° 38.717'	E 026° 16.342'	124 feet	Diploid
Geno84	23-6	Şarköy	N 40° 38.947'	E 027° 04.011'	778 feet	Diploid

Geno85	67-1	Harmancık- Kütahya	N 39° 40.773'	E 029°08.846'	2240 feet	Diploid
Geno86	84-8	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029°45.249'	441 feet	Diploid
Geno87	9-13	Bıyıklı, Tekirdağ (3)	N 41° 00.891'	E 027° 25.351'	860 feet	Diploid
Geno88	88-25	Avanos III Nevşehir	N 38° 44.536'	E 034°50.289'	3796 feet	Diploid
Geno89	23-2	Şarköy	N 40° 38.947'	E 027° 04.011'	778 feet	Diploid
Geno90	12-8	Buzağıcı, Hayrabolu	N 41° 15.349'	E 027° 08.400'	177 feet	Diploid
Geno91	88-23	Avanos III Nevşehir	N 38° 44.536'	E 034°50.289'	3796 feet	Diploid
Geno92	86-13	Avanos-Nevşehir	N 38° 44.470'	E 034°50.725'	3640 feet	Diploid
Geno93	12-14	Buzağıcı, Hayrabolu	N 41° 15.349'	E 027° 08.400'	177 feet	Diploid
Geno94	3-3	Çakmak, Edirne	N 41° 23.438'	E 026° 39.637'	283 feet	Diploid
Geno95	39-14	Danişment (deniz kenarı)	N 40° 36.007'	E 026° 24.876'	20 feet	—
Geno96	8-10	Bıyıklı, Tekirdağ (2)	N 41° 02.028'	E 027° 22.162'	482 feet	Diploid
Geno97	38-7	Kılıçköy, Keşan	N 40° 47.768'	E 026° 34.282'	130 feet	Diploid
Geno98	23-13	Gölcük, Şarköy	N 40° 42.537'	E 027° 05.872'	667 feet	Diploid
Geno99	41-3	İzzetiye	N 40° 48.349'	E 026° 39.615'	329 feet	Diploid
Geno100	92-17	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028°37.931'	2215 feet	Diploid
Geno101	85-21	Nevşehir'e 35 km'e kala	N 38° 50.440'	E 034°33.266'	3915 feet	Diploid
Geno102	89-11	Avanos 4 Nevşehir	N 38° 43.864'	E 034°49.910'	3224 feet	Diploid
Geno103	45-4	Burdur-Bucak-1	N 37° 28.679'	E 030° 33.541'	862 m	Diploid
Geno104	97-1	Kütahya yolu Dursunbey-Harmancık arası	N 39° 39.306'	E 029°01.933'	2020 feet	Diploid
Geno105	69-1	Çanakkale Serçeler Köyü	N 40° 03.470'	E 026°35.758'	362 feet	Diploid
Geno106	27.6.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno107	65-2	Balıkesir merkez II Kütahya çıkışı	N 39° 41.131'	E 027°58.782'	642 feet	Diploid
Geno108	27.2.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno109	86-21	Avanos-Nevşehir	N 38° 44.470'	E 034°50.725'	3640 feet	Diploid
Geno110	84-22	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029°45.249'	441 feet	Diploid
Geno111	105-3	Kütahya Tavşanlı çıkışı	N 39° 32.222'	E 029°38.014'	3370 feet	Diploid
Geno112	99-19	Muğla	N 37° 07.545'	E 028°22.724'	2079 feet	Diploid
Geno113	105-13	Kütahya Tavşanlı çıkışı	N 39° 32.222'	E 029°38.014'	3370 feet	Diploid
Geno114	27.7.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno115	105-6	Kütahya Tavşanlı çıkışı	N 39° 32.222'	E 029°38.014'	3370 feet	Diploid
Geno116	27.8.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno117	95-3	Balyadan sonra Balıkesir'e 40 km kala	N 39° 42.073'	E 027°33.289'	1190 feet	Diploid
Geno118	27.9.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno119	27.3.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno120	90-1	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026°25.482'	415 feet	Diploid
Geno121	27.1.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno122	84-11	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029°45.249'	441 feet	Diploid
Geno123	66-3	Şehitlik II Çanakkale	N 40° 14.653'	E 026°17.708'	605 feet	Diploid
Geno124	27.10.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno125	84-19	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029°45.249'	441 feet	Diploid
Geno126	90-2	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026°25.482'	415 feet	Diploid
Geno127	86-10	Avanos-Nevşehir	N 38° 44.470'	E 034°50.725'	3640 feet	Diploid
Geno128	90-2	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026°25.482'	415 feet	Diploid

Geno129	89-20	Avanos 4 Nevşehir	N 38° 43.864'	E 034° 49.910'	3224 feet	Diploid
Geno130	27.4.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno131	66-7	Şehitlik II Çanakkale	N 40° 14.653'	E 026° 17.708'	605 feet	Diploid
Geno132	89-4	Avanos 4 Nevşehir	N 38° 43.864'	E 034° 49.910'	3224 feet	Diploid
Geno133	65-4	Balıkesir merkez II Kütahya çıkışı	N 39° 41.131'	E 027° 58.782'	642 feet	Diploid
Geno134	90-7	18 Mart Üniv. Kampus	N 40° 06.910'	E 026° 25.482'	415 feet	Diploid
Geno135	65-7	Balıkesir merkez II Kütahya çıkışı	N 39° 41.131'	E 027° 58.782'	642 feet	Diploid
Geno136	27.5.C	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno137	96-2	Pada Köyü Kepsut-Dursunbey arası Balıkesir	N 39° 44.669'	E 028° 21.423'	1660 feet	Diploid
Geno138	39-10	Danişment (deniz kenarı)	N 40° 36.007'	E 026° 24.876'	20 feet	—
Geno139	41-2	İzzetiye	N 40° 48.349'	E 026° 39.615'	329 feet	Diploid
Geno140	85-12	Nevşehir'e 35 km'e kala	N 38° 50.440'	E 034° 33.266'	3915 feet	Diploid
Geno141	45-13	Burdur-Bucak-1	N 37° 28.679'	E 030° 33.541'	862 m	Diploid
Geno142	12-13	Buzağıcı, Hayrabolu	N 41° 15.349'	E 027° 08.400'	177 feet	Diploid
Geno143	9-2	Bıyıklı, Tekirdağ (3)	N 41° 00.891'	E 027° 25.351'	860 feet	Diploid
Geno144	25-9	Yenice	N 40° 54.824'	E 027° 08.742'	580 feet	Diploid
Geno145	33-5	Üveyizli, Şile	N 41° 06.690'	E 029° 25.759'	253 feet	Diploid
Geno146	40-3	Dişbudak	N 40° 43.009'	E 026° 34.751'	216 feet	Diploid
Geno147	39-6	Danişment (deniz kenarı)	N 40° 36.007'	E 026° 24.876'	20 feet	—
Geno148	15-4	Yeşilsirt Köyü, Muratlı	—	—	—	Diploid
Geno149	84-15	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029° 45.249'	441 feet	Diploid
Geno150	83-8	TÜBİTAK Gen Merkezi	N 40° 47.189'	E 029° 27.601'	593 feet	Mixed
Geno151	46-4	Burdur-Bucak-2	N 37° 28.672'	E 030° 33.631'	854 m	Diploid
Geno152	14-9	Kayı Köyü, Tekirdağ	N 41° 02.537'	E 027° 30.374'	720 feet	Diploid
Geno153	24-2	Ballı, Şarköy	N 40° 49.633'	E 027° 04.405'	538 feet	Diploid
Geno154	41-5	İzzetiye	N 40° 48.349'	E 026° 39.615'	329 feet	Diploid
Geno155	84-4	Ağva Şile yolu II	N 41° 05.347'	E 029° 45.249'	441 feet	Diploid
Geno156	46-6	Burdur-Bucak-2	N 37° 28.672'	E 030° 33.631'	854 m	Diploid
Geno157	25-14	Yenice	N 40° 54.824'	E 027° 08.742'	580 feet	Diploid
Geno158	26-7	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno159	37-13	Barağı, Keşan	N 40° 43.187'	E 026° 25.906'	60 feet	Diploid
Geno160	25-4	Yenice	N 40° 54.824'	E 027° 08.742'	580 feet	Diploid
Geno161	25-10	Yenice	N 40° 54.824'	E 027° 08.742'	580 feet	Diploid
Geno162	11-4	Çeneköy, Hayrabolu	N 41° 12.029'	E 027° 11.192'	275 feet	Diploid
Geno163	83-17	TÜBİTAK Gen Merkezi	N 40° 47.189'	E 029° 27.601'	593 feet	Mixed
Geno164	94-1	Balıkesir Merkez	N 39° 38.741'	E 027° 46.100'	827 feet	Diploid
Geno165	23-12	Gölcük, Şarköy	N 40° 42.537'	E 027° 05.872'	667 feet	Diploid
Geno166	81-8	Çanakkale şehitlik	N 40° 15.339'	E 026° 18.774'	870 feet	Diploid
Geno167	88-19	Avanos III Nevşehir	N 38° 44.536'	E 034° 50.289'	3796 feet	Diploid
Geno168	85-11	Nevşehir'e 35 km'e kala	N 38° 50.440'	E 034° 33.266'	3915 feet	Diploid
Geno169	91-1	Çanakkale Bursa Yolu Başlangıcı	N 38° 43.864'	E 034° 49.910'	155 feet	Diploid
Geno170	8-9	Bıyıklı, Tekirdağ (2)	N 41° 02.028'	E 027° 22.162'	482 feet	Diploid
Geno171	109-16	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032° 13.909'	3265 feet	Diploid
Geno172	108-19	Eskişehir	N 39° 43.058'	E 030° 40.601'	3005 feet	Diploid
Geno173	112-13	Kaymaz çıkışı Eskişehir	N 39° 29.650'	E 031° 14.473'	3390 feet	Diploid

Geno174	117-7	Kütahya'ya 10 km kala	N 39° 30.126'	E 029°52.618'	3450 feet	Diploid
Geno175	96-7	Pada Köyü Kepsut-Dursunbey arası Balıkesir	N 39° 44.669'	E 028°21.423'	1660 feet	Diploid
Geno176	112-1	Kaymaz çıkışı Eskişehir	N 39° 29.650'	E 031°14.473'	3390 feet	Diploid
Geno177	109-1	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno178	105-17	Kütahya Tavşanlı çıkışı	N 39° 32.222'	E 029°38.014'	3370 feet	Diploid
Geno179	100-13	Kütahya-Eskişehir arası	N 39° 34.643'	E 030°07.208'	3090 feet	Diploid
Geno180	117-2	Kütahya'ya 10 km kala	N 39° 30.126'	E 029°52.618'	3450 feet	Diploid
Geno181	109-12	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno182	96-1	Pada Köyü Kepsut-Dursunbey arası Balıkesir	N 39° 44.669'	E 028°21.423'	1660 feet	Diploid
Geno183	109-4	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno184	91-15	Çanakkale Bursa Yolu Başlangıcı	N 38° 43.864'	E 034°49.910'	155 feet	Diploid
Geno185	100-14	Kütahya-Eskişehir arası	N 39° 34.643'	E 030°07.208'	3090 feet	Diploid
Geno186	109-4	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno187	95-15	Balyadan sonra Balıkesir'e 40 km kala	N 39° 42.073'	E 027°33.289'	1190 feet	Diploid
Geno188	96-5	Pada Köyü Kepsut-Dursunbey arası Balıkesir	N 39° 44.669'	E 028°21.423'	1660 feet	Diploid
Geno189	109-14	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno190	85-17	Nevşehir'e 35 km'e kala	N 38° 50.440'	E 034°33.266'	3915 feet	Diploid
Geno191	100-4	Kütahya-Eskişehir arası	N 39° 34.643'	E 030°07.208'	3090 feet	Diploid
Geno192	108-16	Eskişehir	N 39° 43.058'	E 030°40.601'	3005 feet	Diploid
Geno193	111-17	Polatlı- Haymana arası	N 39° 29.645'	E 032°26.810'	3246 feet	Diploid
Geno194	111-2	Polatlı- Haymana arası	N 39° 29.645'	E 032°26.810'	3246 feet	Diploid
Geno195	109-2	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno196	109-10	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno197	111-3	Polatlı- Haymana arası	N 39° 29.645'	E 032°26.810'	3246 feet	Diploid
Geno198	109-8	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno199	112-25	Kaymaz çıkışı Eskişehir	N 39° 29.650'	E 031°14.473'	3390 feet	Diploid
Geno200	108-20	Eskişehir	N 39° 43.058'	E 030°40.601'	3005 feet	Diploid
Geno201	109-5	Polatlı Haymana arası Polatlı çıkışı	N 39° 32.597'	E 032°13.909'	3265 feet	Diploid
Geno202	112-4	Kaymaz çıkışı Eskişehir	N 39° 29.650'	E 031°14.473'	3390 feet	Diploid
Geno203	45-11	Burdur-Bucak-1	N 37° 28.679'	E 030° 33.541'	862 m	Diploid
Geno204	92-15	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028°37.931'	2215 feet	Diploid
Geno205	1-5	İskender, Edirne	N 41° 37.897'	E 026° 41.330'	328 feet	Diploid
Geno206	1-7	İskender, Edirne	N 41° 37.897'	E 026° 41.330'	328 feet	Diploid
Geno207	1-13	İskender, Edirne	N 41° 37.897'	E 026° 41.330'	328 feet	Diploid
Geno208	24-14	Ballı, Şarköy	N 40° 49.633'	E 027° 04.405'	538 feet	Diploid
Geno209	68-9	Ilgardere-Gelibolu	N 40° 15.889'	E 026°28.859'	60 feet	Diploid
Geno210	14-4	Kayı Köyü, Tekirdağ	N 41° 02.537'	E 027° 30.374'	720 feet	Diploid
Geno211	11-7	Çeneköy, Hayrabolu	N 41° 12.029'	E 027° 11.192'	275 feet	Diploid
Geno212	Bd-21	—	—	—	—	—
Geno213	26-1	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno214	25-7	Yenice	N 40° 54.824'	E 027° 08.742'	580 feet	Diploid
Geno215	1-14	İskender, Edirne	N 41° 37.897'	E 026° 41.330'	328 feet	Diploid
Geno216	26-13	İnecik	N 40° 56.578'	E 027° 18.347'	642 feet	Diploid
Geno217	11-2	Çeneköy, Hayrabolu	N 41° 12.029'	E 027° 11.192'	275 feet	Diploid

Geno218	1-4	İskender, Edirne	N 41° 37.897'	E 026° 41.330'	328 feet	Diploid
Geno219	63-6	Yenice Balya arası	N 39° 48.006'	E 027° 22.948'	1169 feet	Diploid
Geno220	42-1	Hasköy, Enez	N 40° 38.717'	E 026° 16.342'	124 feet	Diploid
Geno221	40-6	Dişbudak	N 40° 43.009'	E 026° 34.751'	216 feet	Diploid
Geno222	37-2	Barağı, Keşan	N 40° 43.187'	E 026° 25.906'	60 feet	Diploid
Geno223	9-11	Bıyıklı, Tekirdağ (3)	N 41° 00.891'	E 027° 25.351'	860 feet	Diploid
Geno224	24-3	Ballı, Şarköy	N 40° 49.633'	E 027° 04.405'	538 feet	Diploid
Geno225	15-7	Yeşilsirt Köyü, Muratlı	—	—	—	Diploid
Geno226	92-21	Dursunbey- Balıkesir	N 39° 36.515'	E 028° 37.931'	2215 feet	Diploid
Geno227	62-14	Çan ile Yenice arası	N 39° 57.891'	E 027° 11.662'	1000 feet	Diploid
Geno228	37-9	Barağı, Keşan	N 40° 43.187'	E 026° 25.906'	60 feet	Diploid
Geno229	63-1	Yenice Balya arası	N 39° 48.006'	E 027° 22.948'	1169 feet	Diploid
Geno230	89-14	Avanos 4 Nevşehir	N 38° 43.864'	E 034° 49.910'	3224 feet	Diploid
Geno231	45-6	Burdur-Bucak-1	N 37° 28.679'	E 030° 33.541'	862 m	Diploid
Geno232	63-7	Yenice Balya arası	N 39° 48.006'	E 027° 22.948'	1169 feet	Diploid
Geno233	41-4	İzzetiye	N 40° 48.349'	E 026° 39.615'	329 feet	Diploid
Geno234	16-5	Seymen, Çorlu	N 41° 05.786'	E 027° 55.796'	357 feet	Diploid
Geno235	12-12	Buzağıcı, Hayrabolu	N 41° 15.349'	E 027° 08.400'	177 feet	Diploid

3.2.2. Kullanılan alet ve cihazlar

- TissueLyser Cihazı (Teknogen)
- Kuru Su Banyosu (AccuBlock, Labnet)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma 4K15C)
- Santrifüj (Eppendorf 5417C)
- Magnetik Karıştırıcı (Isolab)
- pH Metre (Isolab)
- Hassas Terazî (Sartorius)
- Ultra Saf Su Cihazı
- Thermocycler (BioRad T100)
- Elektroforez Tankı
- Elektroforez Elektrik Kaynağı (VWR)
- G-BOX Jel Görüntüleme Sistemi (SYNGENE, USA)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf)
- Nanodrop Spektrofotometre (ND-1000, Thermo Co.)
- -20 °C Derin Dondurucu
- Mikrodalga Fırın
- Kar makinesi
- K-Seal Plate Kaplama Cihazı
- Otoklav

3.2.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Bu tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar ve hazırlanan çözeltiler aşağıdaki gibidir:

Mikroprep buffer (100 mL):

- 25 mL DNA ekstraksiyon buffer
- 25 mL nuclei lysis buffer
- 10 mL %5'lik sarcosyl
- 0,1 gr sodyum bisülfid

Son hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

DNA ekstraksiyon buffer (100 mL):

- 6,37 gr sorbitol
- 1,21 gr Tris
- 0,186 gr EDTA

Son hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Nuclei Lysis buffer (100 mL):

- 2 gr CTAB
- 1,861 gr EDTA
- 11,688 gr NaCl
- 20 mL 1 M Tris

Son hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

%5'lik Sarcosyl (100 mL):

- 5 gr Sarcosyl

Son hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Kloroform/ izoamil alkol (24:1):

- 240 mL kloroform
- 10 mL izoamil alkol

0,2 M Na-Ac - %70'lik Etanol (100 mL):

- 3 M Na-Ac stok çözeltisinden 6.6 mL
- 23,4 mL ultra saf su
- 70 mL %100 etanol

50 X TAE solüsyonu (1 L):

- 242 g Trizma Base
- 57,1 mL Glacial Asetik Asit
- 100 mL 0,5 M EDTA (8 pH)

Son hacim ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

TE Buffer (100 mL):

- 1 mL 1 M Tris- HCl
- 0,2 mL 0,5 M EDTA

Son hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Brom fenol blue (50 mL):

- 35 mL Gliserol
- 2 mL 0,5 M EDTA
- 1 mL 50 X TAE
- 11,5 mL ultra saf su
- 0,5 mL %20'lik SDS
- 0,30 g brom fenol blue

3.3. Yöntem

3.3.1. *Brachypodium distachyon* türüne ait tohumların çimlendirilmesi ve örneklerin toplanması

235 adet genotip, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Serası'nda (İzmir, Türkiye) 235 adet saksıya, saksıların yaklaşık %70'i toprak ve %30'u torf ile dolu olacak şekilde ekilmiştir. Saksılar her gün düzenli olarak sulanmıştır. Yaklaşık 4 haftalık bir sürenin ardından büyümüş olan bitkilerin genç yapraklarından 0,1 gram toplanmış, bu örnekler ependorflara konularak sıvı azot (-196°C) içerisine alınmıştır. Laboratuvara götürülen örnekler TissueLyser cihazı ile metal bilyeler aracılığıyla fiziksel olarak parçalama işlemine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.3.1. *Brachypodium distachyon* tohumlarının ekimi ve çimlendirilmesi.

3.3.2. DNA izolasyonu

Murray ve Thompson (1980)'ın geliştirmiş olduğu ve bazı modifikasyonların olduğu mikroprep DNA izolasyon metodu kullanılmıştır. Protokole başlamadan önce gerekli solüsyonlar 3.2.3. Kullanılan Solüsyonlar başlığı altında yazılı olduğu gibi hazırlanmıştır. Uygulanan protokol aşağıdaki gibidir:

- Her bir ependorfun içerisine yaklaşık 0,1 g yaprak örneği alınmıştır ve bu yapraklar TissueLyser cihazı ile fiziksel olarak parçalanmıştır.
- Sıvı azottan çıkarılan her bir yaprak örneğinin üzerine 0,75 mL mikroprep buffer eklenmiş ve ependorflar 10-15 saniye vortekslenmiştir.
- Örnekler, 65°C'de her 5 dakikada bir alt üst edilerek 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Ependorflar kuru su banyosundan alınıp oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- Her bir örneğin üzerine 0,75 mL kloroform-izoamil alkol eklenmiştir.
- Ependorflar 10 dakika boyunca yavaşça alt üst edilmiştir.
- +4 °C'de 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır.
- Santrifüjden ıkarılan ependorflarda faz ayrımı gözlenmiş ve üst faz mikropipet aracılığıyla temiz ependorflara aktarılmıştır.
- Aktarılan üst fazlara üst faz miktarı kadar soğuk (-20°C) %100 etanol eklenmiştir.
- Ependorflar 5000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Ependorflara %70'lik 0,4 mL etanol eklenmiştir.
- 5000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Ependorflardaki alkol tamamen uçtuktan sonra 0,2 mL TE (Tris-EDTA) buffer eklenerek DNA'lar özdürölmüştür.
- İzolasyonu tamamlanan örnekler -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.3.3. DNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi

İzolasyonu yapılarak elde edilen DNA'ların saflığına ve miktarlarına elektroforetik ve spektrofotometrik yöntemler ile bakılmıştır.

3.3.3.1. Agaroz jel elektroforezi

DNA'ların saflığını incelemek için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 250 mL 1 X TAE (Tris- Asetik Asit- EDTA) solüsyonuna 2,5 g agar eklenmiş ve mikrodalga fırında kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra elektroforez tanklarına yerleştirilecek olan tepsilere dökülmüş ve tarakları takılmıştır. Jelin donmasının ardından taraklar çıkarılmıştır.

İzolasyonu tamamlanan her bir DNA örneğinden 10 µL alınmış ve üzerine 2 µL brom fenol blue eklenmiştir. Boyanan DNA'lar mikropipet ile jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Jeldeki her sıranın ilk ve son kuyucuğuna 2 µL 1 Kb'lik DNA ladder (Geneaid) yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak elektroforez işlemi önce 60 Voltta başlatılmış ve DNA'lar kuyulardan çıktıktan sonra 80 Volt gerilimde yaklaşık olarak 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Yürümüş olan DNA'ların bulunduğu jel EtBr ile boyama işlemi için ayrı bir kaba aktarılmıştır. Homojen bir şekilde 600 mL su ve 90 µL EtBr içeren kaba aktarılan jel 20 dakika boyunca çalkalayıcıda çalkalanmıştır. EtBr ışıktaki bozulduğu için kabın dışı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. 20 dakika süren boyama işleminin ardından jel saf su ile durulanarak G-BOX (SYNGENE, USA) görüntüleyici içerisine aktarılmıştır. Ultra viyole ışığa maruz kalan jeldeki EtBr'ün ışıma yapması sonucu elde edilen görüntü bilgisayara aktarılmıştır.

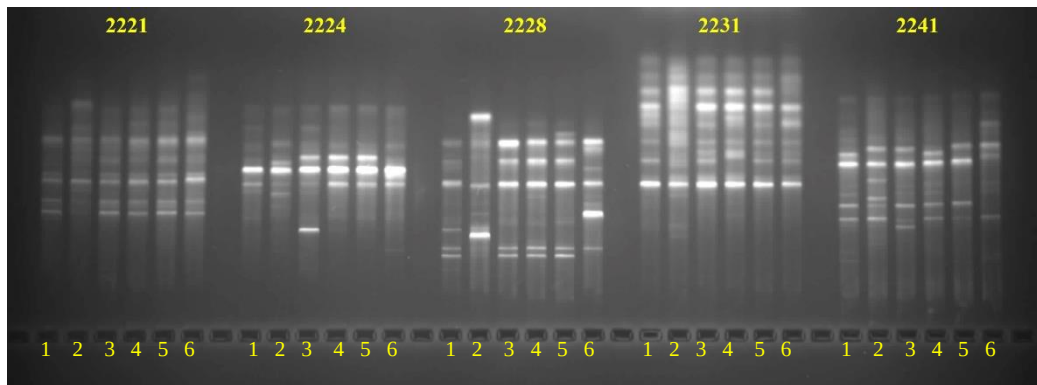
3.3.3.2. Nanodrop spektrofotometrisi

İzolasyonu yapılan DNA'ların saflık kontrolü için nanodrop (ND-1000, Thermo Co.) cihazında 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapılmış ve bu değerlerin birbirlerine oranı ile saflığı incelenmiştir. 260 nm/280 nm değerinin olması gerektiği aralık 1,80-2,00 iken, 260 nm/230 nm değeri 2,00'den büyük olmalıdır. Nanodropta ölçülen değerler Tablo 4.2'de verilmiştir. Ayrıca PCR'a dayalı olan iPBS tekniğinde DNA konsantrasyonu oldukça önemlidir. Nanodrop cihazı ile DNA'ların miktarları ng/μL cinsinden ölçülmüştür ve her bir örnek, son hacim 200 μL olacak şekilde 5 ng/μL konsantrasyona seyreltilerek PCR'a hazır hale getirilmiştir.

3.3.4. Primerlerin test edilmesi ve seçimi

DNA izolasyonu sonrası seyreltme işlemi ile hazır olan örnekler için en uygun primerlerin seçilmesi amacıyla sıcaklıkları bilinen 35 adet primer, rastgele seçilmiş olan 4 adet DNA örneğinde deneme seti kurularak test edilmiştir. PCR'dan elde edilen ürünler agaroz jelde (%2) yaklaşık olarak 2 saat yürütülmüştür. Daha sonra bu jel EtBr ile boyanmış ve G-BOX cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir.

Test edilen bazı primerlere ait jel görüntüsü aşağıdadır (Şekil 3.3.4). Test edilen 35 adet primerden 28 tanesi amplifikasyon durumu ve polimorfik bant verme durumu göz önünde bulundurularak seçilmiş ve deneylere devam edilmiştir.



Şekil 3.3.4. Test edilen bazı primerlere ait jel görüntüsü.

3.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bu tez çalışmasında, Kalendar vd. (2010)'nin geliştirmiş olduğu ve retrotranspozonları hedef alan iPBS moleküler markör tekniği kullanılmıştır. iPBS primerlerinin nükleotid dizilerindeki farklılıklardan dolayı bağlanma sıcaklıkları (annealing) farklıdır ve seçilen primerlerin sıcaklıkları Tablo 3.3.5'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3.5. Seçilen primerlerin bağlanma sıcaklıkları.

Primer Adı	Sıcaklık (°C)	Nükleotid sayısı	Primerin Dizilişi
2085	55	12	ATGCCGATACCA
2087	48	12	GCAATGGAACCA
2273	45	12	GCTCATCATGCCA
2389	48	12	ACATCCTTCCCA
2391	45	12	ATCTGTCAGCCA
2392	48	12	TAGATGGTGCCA
2393	45	12	TACGGTACGCCA
2217	48	18	ACTTGGATGTCGATACCA
2221	51	18	ACCTAGCTCACGATGCCA
2222	46	18	ACTTGGATGCCGATACCA
2224	51	18	ATCCTGGCAATGGAACCA
2228	51	18	CATTGGCTCTTGATACCA
2229	48	18	CGACCTGTTCTGATACCA
2230	45	18	TCTAGGCGTCTGATACCA
2241	51	18	ACCTAGCTCATCATGCCA
2243	51	18	AGTCAGGCTCTGTTACCA
2245	51	18	GAGGTGGCTCTTATACCA
2251	54	18	GAACAGGCGATGATACCA
2252	45	18	TCATGGCTCATGATACCA
2255	45	18	GCGTGTGCTCTCATACCA
2257	48	18	CTCTCAATGAAAGCACCA
2295	51	18	AGAACGGCTCTGATACCA
2298	45	18	AGAAGAGCTCTGATACCA
2373	51	18	GAACCTTGCTCCGATGCCA
2399	45	18	AAACTGGCAACGGCGCCA
2400	51	18	CCCCTCCTTCTAGCGCCA
2401	53	18	AGTTAAGCTTTGATACCA
2402	51	18	TCTAAGCTCTTGATACCA

iPBS primerlerinin kullanıldığı PCR işleminde her bir örnek için PCR kokteyli hazırlanmıştır. Bu PCR kokteylinin içeriği Tablo 3.3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.3.6. Bir genotip için hazırlanan PCR kokteyli.

Bileşen	Miktar (µL)
10 X <i>Taq</i> Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
dNTP (2 mM)	3
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
Primer (10 pmol)	2
<i>Taq</i> DNA polimeraz (Thermo Scientific)	0,2
UP su	2,8
DNA (5 ng/µL)	4
Toplam miktar	15

Hazırlanan kokteyl, well-plate’e dağıtılmış olan DNA örneklerinin üzerine eklenmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra thermocycler cihazına konularak PCR işlemi başlatılmıştır. Reaksiyon basamakları Tablo 3.3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.3.7. PCR işleminin reaksiyon basamakları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	94°C	30 saniye
2	94°C	25 saniye
3	Primerin bağlanma sıcaklığı	45 saniye
4	72°C	60 saniye
5	2.basamağa geçiş	35 defa
6	72°C	5 dakika
7	4°C	-

3.3.6. Agaroz jel elektroforezi

250 mL 1X TAE ve 5 gram agaroz kullanılarak hazırlanan %2'lik jel mikrodalga fırında kaynayana kadar ısıtıldıktan sonra tepsilere dökülmüş ve 36'lık taraklar takılmıştır. Jel oda sıcaklığında donduktan sonra taraklar çıkartılarak tepsi, içerisinde 1X'lik TAE buffer bulunan tanklara daldırılmıştır. Thermocycler cihazından çıkarılan 15µL'lik PCR ürünlerinin üzerine 3 µL brom fenol blue eklenmiş ve mikropipetler aracılığıyla jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmişlerdir. Jelin her sırasındaki ilk ve son kuyucuklara 2 µL 100 bp'lik DNA ladder (Geneaid) yüklenmiştir. Jel 100 Voltta yaklaşık 2 buçuk saat yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra agaroz jel 600 mL saf su ve 90 µL EtBr ile hazırlanmış olan solüsyon içerisinde 20 dakika çalkalanarak boyanmıştır. Daha sonra G-BOX cihazında UV ışık altında görüntüsü alınmıştır.

3.3.7. Jel görüntülerinin skorlanması

PCR işleminde iPBS primerlerinin retrotranspozonlara bağlanması ile çoğaltılmış olan fragmentlerin elektroforez sonrasında elde edilen görüntülerindeki polimorfik bantlar, her bir örnek için bant bulunduranlar (1) ve bant bulundurmayanlar (0) olarak skorlanarak, elde edilen veriler Microsoft Office Excel (2016) dosyasına kaydedilmiştir.

3.3.8. Verilerin analizi

Bir genetik markörün polimorfizm oranı ile genotipleri ayırt etme gücünü ölçmek için kullanılan yöntemler R Studio bilgisayar programı üzerinden yazılan çeşitli kodlarla hesaplanmıştır. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri her bir primer için $PIC = 1 - \sum P_i^2$ formülüne göre hesaplanmıştır. P_i değeri, allel frekansını ifade etmektedir (De Riek et al., 2001).

Shannon-Wiener çeşitlilik indeksi, $H' = -\sum P_i \ln(P_i)$ formülüne göre, resolving power (RP) değeri ise $R_p = \sum I_b$, $I_b = 1 - [2 \times (0.5 - P)]$ formülleri ile hesaplanmıştır (Gilbert et al, 1999). Gen çeşitliliği, beklenen heterozigotluk değeri olarak $H_e = 1 - \sum P_i^2$ ile, efektif allel sayısı $N_e = 1/(\sum P_i^2)$ ile Excel ve R programları aracılığıyla hesaplanmıştır.

Popölasyon yapısı, R Studio programı aracılığıyla Jaccard metodu kullanılarak genetik uzaklık ve temel bileşen analizi (PCA) ile hesaplanmıştır. Ayrıca Jaccard katsayısı kullanılarak Nei dist (Nei, 1972) kümeleme analizleri yapılmış, benzerlik matrisi oluşturulmuş ve dendrogram çizilerek gruplar belirlenmiştir (Jaccard, 1908). PCA analizi ise R studio programında R statistical functions (R stats) ve Gaussian Mixture Modelling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation (mclust) paketleri aracılığıyla yapılmıştır.

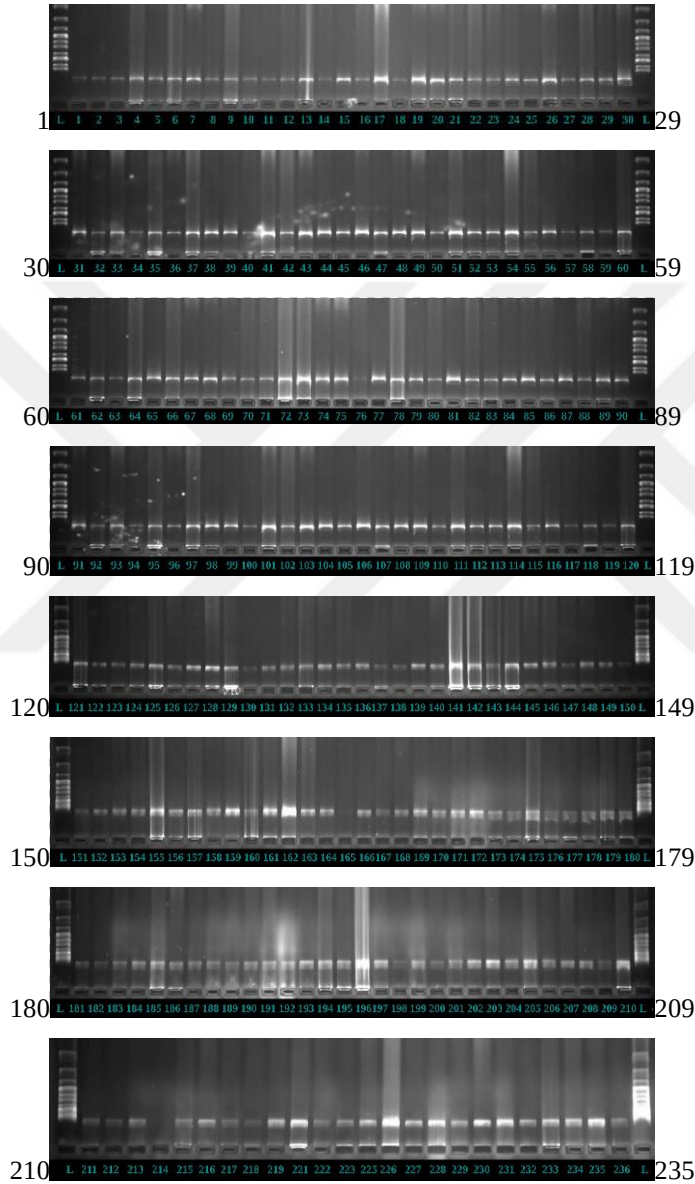
STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard vd., 2000) yazılımı kullanılarak popölasyon yapısı belirlenmiştir. STRUCTURE programı ayırt edici allel frekansları ile popölasyondaki grupları belirlemektedir. K değeri ile ifade edilen ve her lokustaki allel frekansları ile tanımlanan sayı; popölasyondaki grup sayısı olarak kabul edilir. En uygun K değeri için 1 ile 10 arasında hesaplama yapılmıştır. Burn-in period 100.000 ve burn-in length için 100.000 tekrarla her bir K değeri için 100 tekrar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar STRUCTURE HARVESTER versiyon 0.6.94 yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve her bir K değeri için, en yüksek olasılık gösteren değer kabul edilerek ΔK hesaplanmıştır. ΔK -K grafiğı elde edilerek, popölasyonun oluşturduğu grup sayısı belirlenmiştir.

Bağılantı dengesizliğı (LD) analizi TASSEL v.5.0 programı kullanılarak iki lokasyon arasındaki katsayı korelasyonu karesi olan LD parametresi r^2 değeri ile istatistiksel olarak anlamlı olan $p \leq 0.01$ değerleri için, STRUCTURE sonucunda elde edilen iki gruba ve tüm popölasyona uygulanmıştır. Bu analiz sonucu elde edilen veriler, R studio programı üzerinde işlenerek çeşitli grafikler elde edilmiştir (Bradbury vd., 2007; Whitt ve Buckler, 2003). LD decay grafiğı, r^2 değerleri ve genetik uzaklık (kb) değerleri arasındaki korelasyonu göstermektedir. Grafikler R studio programındaki “ggplot2” paketi kullanılarak oluşturulmuştur (R Core Team, 2014; Wickham, 2011).

4. BULGULAR

4.1. DNA Saflık Jeli Sonuçları

B. distachyon türüne ait olan 235 adet genotipin DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra bu DNA'ların saflık durumunu incelemek amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntüleri alınmıştır. Jel görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Genomik DNA'ların agaroz jeldeki saflık görüntüsü

Agaroz jeli görüntüleri incelendiğinde izolasyonu yapılmış olan *B. distachyon* DNA'larının iPBS moleküler markör çalışmasında kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

4.2. DNA Nanodrop Sonuçları

DNA izolasyonu sonrasında örneklerin PCR işlemine hazırlanması için 5 ng/ μ L'ye seyreltilmesi gerekmektedir. Seyreltme işlemini gerçekleştirmek ve DNA'ların saflık durumunu kontrol etmek amacıyla Nanodrop cihazında ölçümleri yapılmıştır ve ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. İzolasyonu yapılan DNA'ların nanodrop sonuçları

Genotip No	Örnek Adı	ng/ μ L	260/280	260/230
Geno1	Koz 3a	188,00	1,97	2,04
Geno2	90-3	123,01	2,15	2,10
Geno3	83-18	151,18	2,13	2,08
Geno4	46-3	572,18	1,97	2,01
Geno5	14-1	20,61	2,01	1,24
Geno6	67-3	359,27	2,15	2,23
Geno7	67-2	468,61	2,13	2,22
Geno8	11-6	79,03	1,92	1,49
Geno9	65-8	510,71	2,12	2,26
Geno10	39-2	185,27	2,07	2,19
Geno11	5-3	86,10	2,11	2,26
Geno12	45-7	112,02	2,11	2,28
Geno13	Koz 46	541,49	1,88	1,98
Geno14	5-6	189,80	2,12	2,22
Geno15	5-9	405,34	2,13	2,13
Geno16	5-13	152,70	2,16	2,17
Geno17	28-10	859,88	2,16	2,23
Geno18	14-8	27,30	2,20	1,99
Geno19	34-12	488,94	2,14	2,19
Geno20	46-4	214,49	2,14	2,20
Geno21	33-14	263,56	2,15	2,30
Geno22	33-4	210,40	2,14	2,21
Geno23	93-14	445,59	2,11	2,19
Geno24	9-14	223,30	2,16	2,22
Geno25	91-11	367,31	2,15	2,20
Geno26	97-20	123,34	2,15	2,09
Geno27	Koz 46	282,70	2,16	2,29
Geno28	Adi 46	197,03	2,07	2,02
Geno29	Koz 26	532,49	2,12	2,21
Geno30	35-12	162,11	2,07	1,78
Geno31	42-7	205,94	2,08	2,15
Geno32	38-3	126,93	2,15	2,10
Geno33	Gaz 6	398,15	2,14	2,18
Geno34	Gaz 2	333,86	2,12	2,10
Geno35	92-20	365,05	2,08	2,17
Geno36	66-14	367,74	2,14	2,15
Geno37	35-6	362,31	2,14	2,29
Geno38	34-11	200,77	2,14	2,07
Geno39	97-24	111,82	2,17	2,19

Geno40	99-11	322,81	2,11	1,95
Geno41	Koz 1	427,80	2,13	2,19
Geno42	108-17	278,42	2,13	2,17
Geno43	92-21	456,45	2,11	2,05
Geno44	109-11	452,10	2,12	2,11
Geno45	99-23	291,91	2,13	2,16
Geno46	108-11	170,21	2,09	1,92
Geno47	24-5	480,31	2,01	1,98
Geno48	97-25	183,11	2,08	2,19
Geno49	100-3	129,21	2,13	2,19
Geno50	92-15	388,54	2,15	2,16
Geno51	Kah 2	198,52	2,14	2,21
Geno52	8-3	111,26	2,15	2,17
Geno53	105-8	183,77	2,17	2,16
Geno54	Gaz 4	315,28	2,14	2,16
Geno55	94-1	241,01	2,15	2,16
Geno56	92-18	304,53	2,13	2,17
Geno57	Koz 3a	157,53	2,17	2,15
Geno58	93-14	971,24	2,15	2,12
Geno59	62-23	270,53	2,16	2,21
Geno60	97-16	516,87	2,16	2,25
Geno61	17-11	242,81	2,14	2,23
Geno62	62-8	8,39	2,18	1,12
Geno63	38-4	855,03	2,16	2,13
Geno64	93-18	211,67	2,15	2,17
Geno65	66-14	297,24	2,15	2,23
Geno66	17-6	195,36	2,16	2,29
Geno67	66-12	531,96	2,11	2,20
Geno68	17-13	403,41	2,12	2,16
Geno69	12-20	214,74	2,08	2,13
Geno70	26-12	67,33	2,05	2,14
Geno71	4-1	509,42	2,11	2,06
Geno72	4-2	430,85	2,12	2,28
Geno73	11-5	511,20	2,15	2,19
Geno74	68-4	272,51	2,13	2,12
Geno75	42-4	243,32	2,13	2,09
Geno76	17-7	493,09	2,13	2,13
Geno77	68-2	238,49	2,14	2,07
Geno78	3-4	322,75	2,15	2,20
Geno79	8-4	400,29	2,12	2,09
Geno80	96-10	250,20	2,16	2,11
Geno81	93-2	313,78	2,12	2,06
Geno82	88-16	253,19	2,16	2,19
Geno83	42-2	140,18	2,14	2,10
Geno84	23-6	803,22	2,17	2,13
Geno85	67-1	131,02	2,10	2,26
Geno86	84-8	257,83	2,14	2,22
Geno87	9-13	139,14	2,10	2,22
Geno88	88-25	145,51	2,06	2,08
Geno89	23-2	211,63	2,12	2,25
Geno90	12-8	451,72	1,97	2,06
Geno91	88-23	211,37	2,13	2,16

Geno92	86-13	338,55	2,13	2,26
Geno93	12-14	156,44	2,12	2,11
Geno94	3-3	165,03	2,10	1,67
Geno95	39-14	282,86	2,14	2,21
Geno96	8-10	173,16	2,15	2,22
Geno97	38-7	502,72	2,13	2,20
Geno98	23-13	247,51	2,15	2,13
Geno99	41-3	201,07	2,14	2,08
Geno100	92-17	285,45	2,10	2,13
Geno101	85-21	255,88	2,10	2,12
Geno102	89-11	160,97	2,14	2,10
Geno103	45-4	176,63	2,10	2,23
Geno104	97-1	370,94	2,10	2,16
Geno105	69-1	304,84	2,14	2,11
Geno106	27.6.C	331,97	2,11	2,13
Geno107	65-2	345,10	2,11	2,17
Geno108	27.2.C	134,06	2,11	2,09
Geno109	86-21	133,69	2,13	2,06
Geno110	84-22	215,29	2,08	2,09
Geno111	105-3	93,26	2,17	2,23
Geno112	99-19	85,78	2,15	2,00
Geno113	105-13	233,64	2,11	2,11
Geno114	27.7.C	275,42	2,11	2,13
Geno115	105-6	381,30	2,08	2,08
Geno116	27.8.C	117,13	2,09	2,01
Geno117	95-3	205,50	2,12	2,25
Geno118	27.9.C	132,21	2,12	2,10
Geno119	27.3.C	156,09	2,10	2,07
Geno120	90-1	392,78	2,07	2,14
Geno121	27.1.C	335,98	1,92	1,88
Geno122	84-11	329,31	2,10	2,14
Geno123	66-3	239,24	2,09	2,01
Geno124	27.10.C	242,90	2,03	2,02
Geno125	84-19	254,92	2,12	2,14
Geno126	90-2	226,73	2,10	2,14
Geno127	86-10	265,39	2,08	2,02
Geno128	90-2	339,03	2,12	2,19
Geno129	89-20	79,00	2,09	1,78
Geno130	27.4.C	78,61	2,14	2,09
Geno131	66-7	150,28	2,07	1,88
Geno132	89-4	289,43	2,14	2,21
Geno133	65-4	291,92	2,13	2,22
Geno134	90-7	305,86	2,13	2,17
Geno135	65-7	209,40	2,13	2,33
Geno136	27.5.C	134,71	2,11	1,96
Geno137	96-2	185,02	2,04	2,04
Geno138	39-10	96,38	2,17	2,21
Geno139	41-2	375,95	2,11	2,18
Geno140	85-12	380,07	2,15	2,24
Geno141	45-13	317,11	2,11	2,19
Geno142	12-13	641,40	2,13	1,99
Geno143	9-2	639,78	2,13	1,98

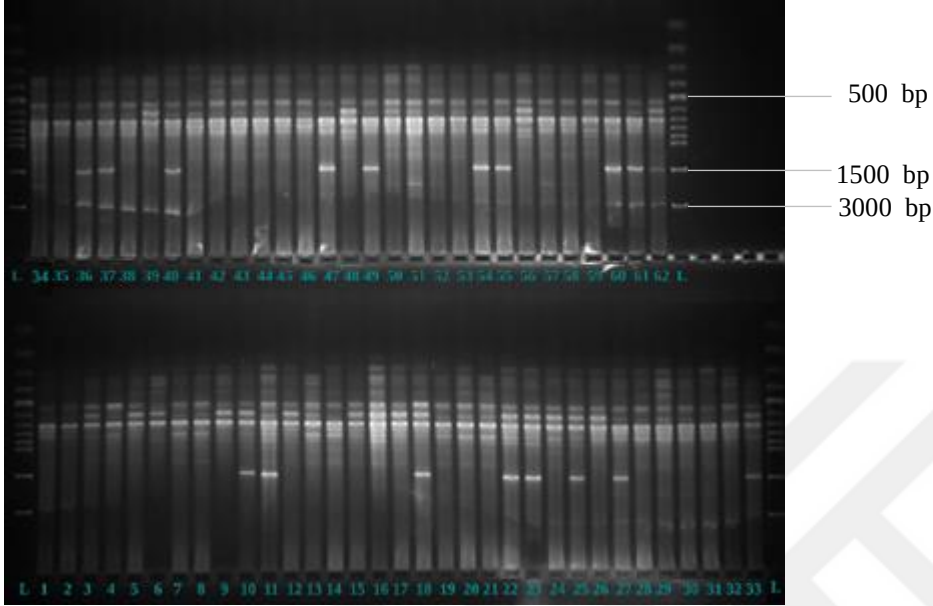
Geno144	25-9	462,71	1,98	2,07
Geno145	33-5	756,91	2,13	1,83
Geno146	40-3	433,04	2,14	2,27
Geno147	39-6	199,43	2,12	2,12
Geno148	15-4	559,09	2,10	2,19
Geno149	84-15	248,41	2,10	2,17
Geno150	83-8	61,82	2,04	1,65
Geno151	46-4	145,95	2,07	2,13
Geno152	14-9	202,92	2,15	2,05
Geno153	24-2	785,79	2,14	2,21
Geno154	41-5	395,27	2,14	2,22
Geno155	84-4	282,32	2,10	2,08
Geno156	46-6	115,18	2,09	2,01
Geno157	25-14	225,58	2,09	2,15
Geno158	26-7	465,58	2,13	2,31
Geno159	37-13	315,81	2,13	2,35
Geno160	25-4	327,73	2,13	2,25
Geno161	25-10	502,61	2,14	2,13
Geno162	11-4	845,76	2,11	2,18
Geno163	83-17	433,34	2,16	2,23
Geno164	94-1	442,51	2,15	2,11
Geno165	23-12	82,80	2,06	2,16
Geno166	81-8	152,99	2,07	1,99
Geno167	88-19	794,76	2,14	2,24
Geno168	85-11	464,24	2,14	2,35
Geno169	91-1	295,89	2,13	2,25
Geno170	8-9	264,37	2,10	2,01
Geno171	109-16	415,46	2,14	2,39
Geno172	108-19	265,63	2,12	2,20
Geno173	112-13	219,40	2,08	2,04
Geno174	117-7	229,69	2,09	1,98
Geno175	96-7	280,29	2,13	2,12
Geno176	112-1	137,80	2,11	2,05
Geno177	109-1	122,68	2,06	1,77
Geno178	105-17	290,86	2,13	2,15
Geno179	100-13	268,91	2,14	2,13
Geno180	117-2	360,80	2,11	2,14
Geno181	109-12	224,02	2,12	2,10
Geno182	96-1	244,83	2,13	2,08
Geno183	109-4	551,36	2,09	2,38
Geno184	91-15	318,85	2,09	2,14
Geno185	100-14	327,42	2,14	2,21
Geno186	109-4	559,28	2,15	2,19
Geno187	95-15	263,83	2,12	2,25
Geno188	96-5	208,89	2,11	2,12
Geno189	109-14	249,27	2,10	2,06
Geno190	85-17	202,79	2,07	2,05
Geno191	100-4	279,31	2,12	2,20
Geno192	108-16	132,14	2,16	2,09
Geno193	111-17	135,23	2,14	2,16
Geno194	111-2	322,02	2,12	2,24
Geno195	109-2	172,71	2,11	2,07

Geno196	109-10	278,31	2,10	2,37
Geno197	111-3	369,64	2,11	2,20
Geno198	109-8	153,77	2,12	2,44
Geno199	112-25	387,23	2,11	2,18
Geno200	108-20	124,05	2,09	2,32
Geno201	109-5	218,19	2,09	2,37
Geno202	112-4	382,22	2,12	2,21
Geno203	45-11	445,37	2,12	2,22
Geno204	92-15	152,42	2,06	2,00
Geno205	1-5	333,67	2,12	2,20
Geno206	1-7	429,13	2,13	2,16
Geno207	1-13	339,35	2,14	2,09
Geno208	24-14	187,81	2,11	2,11
Geno209	68-9	756,45	2,12	2,06
Geno210	14-4	371,27	2,11	2,23
Geno211	11-7	375,55	2,11	2,41
Geno212	Bd-21	84,06	2,07	1,51
Geno213	26-1	355,90	2,10	2,25
Geno214	25-7	357,28	2,12	1,89
Geno215	1-14	173,91	2,11	2,18
Geno216	26-13	202,07	2,11	2,18
Geno217	11-2	197,75	2,14	2,23
Geno218	1-4	202,88	2,13	1,99
Geno219	63-6	187,85	2,07	2,11
Geno220	42-1	194,51	2,09	2,03
Geno221	40-6	63,27	2,22	3,35
Geno222	37-2	383,51	2,13	2,34
Geno223	9-11	336,42	2,12	2,19
Geno224	24-3	247,56	2,10	2,23
Geno225	15-7	265,14	2,10	2,13
Geno226	92-21	256,96	2,11	2,06
Geno227	62-14	115,81	2,13	2,16
Geno228	37-9	425,68	2,11	2,25
Geno229	63-1	318,79	2,12	2,23
Geno230	89-14	751,22	2,08	2,06
Geno231	45-6	138,81	2,09	1,94
Geno232	63-7	52,43	2,18	3,51
Geno233	41-4	195,54	2,12	2,50
Geno234	16-5	495,12	2,11	2,18
Geno235	12-12	137,04	2,11	2,28

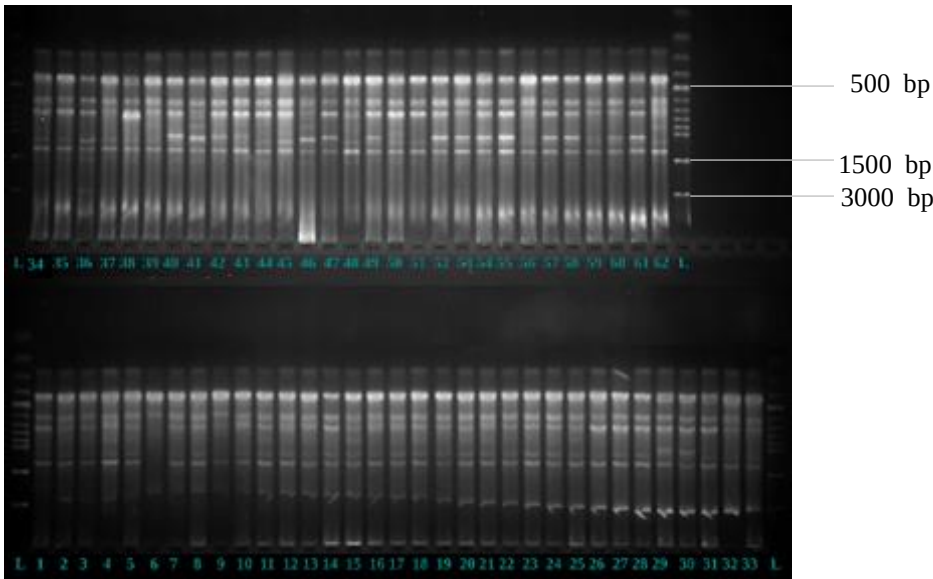
Nanodrop analizi sonuçları incelendiğinde *B. distachyon* türüne ait izole edilen DNA örneklerinin hem miktar açısından hem de kaliteleri açısından iPBS moleküler markör çalışmalarında kullanılabilir olduklarına karar verilmiştir.

4.3. iPBS Markörünün Analiz Sonuçları

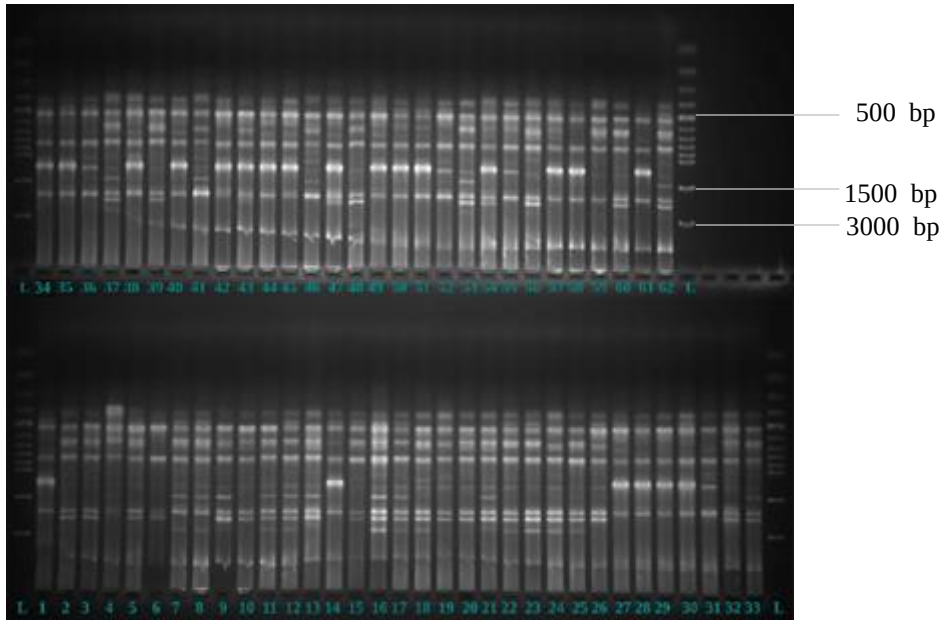
235 adet *B. distachyon* genotipine 28 adet iPBS primeri ile PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) uygulanmıştır. Elde edilen jel görüntülerinden bazıları aşağıdaki gibidir (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2, Şekil 4.3.3, Şekil 4.3.4).



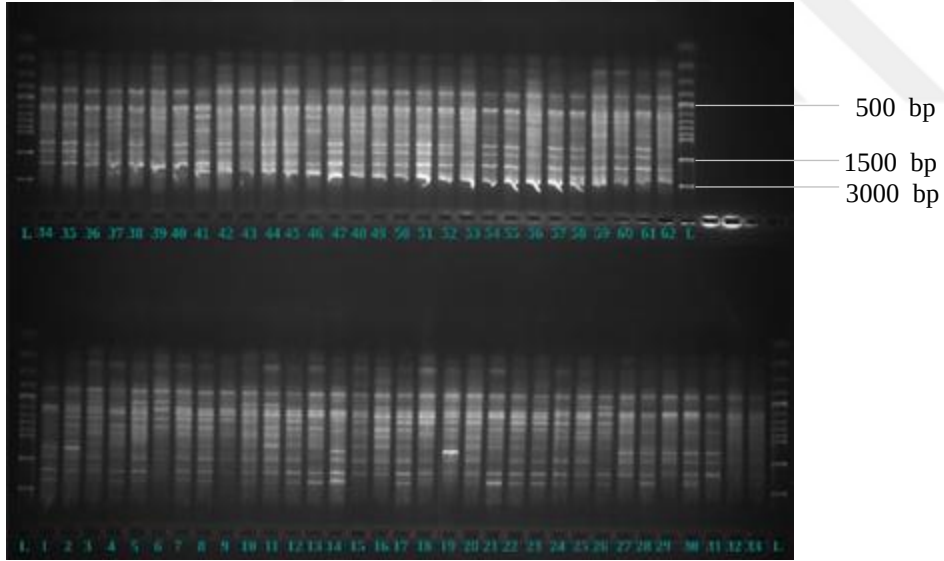
Şekil 4.3.1. iPBS 2224 primerinin ilk 62 genotipteki görüntüsü.



Şekil 4.3.2. iPBS 2400 primerinin ilk 62 genotipteki görüntüsü.



Şekil 4.3.3. ipBS 2228 primerinin ilk 62 genotipteki görüntüsü.



Şekil 4.3.4. ipBS 2251 primerinin ilk 62 genotipteki görüntüsü.

iPBS primerleri ile yapılan PCR işleminden sonra elde edilen bant profilleri Tablo 4.3'deki gibidir. *B. distachyon* türünün 235 genotipine uygulanan 28 adet iPBS primerinin amplifikasyonu sonrasında elde edilen, boyutları 200 bp ile 3000 bp arasında değişen 212 banttan 184 tanesinin yani % 86'sının polimorfik olduğu saptanmıştır. Primer başına düşen toplam bant sayısının ortalama 8, polimorfik bant sayısının ise 7 olduğu görülmüştür. En yüksek sayıda polimorfik bant veren primer 13 bant ile iPBS 2401 iken, en düşük sayıda polimorfik bant veren primer ise 2 bant ile iPBS 2402'dir. Polimorfik bant oranı %100 olan primerler ise iPBS 2085, 2255, 2257, 2273, 2298, 2389, 2393, 2399 ve 2401'dir.

Bu tez çalışmasında kullanılan 28 adet iPBS markörünün etkinliğini ölçmek için yapılan çeşitli hesaplamalar sonucu PIC (polimorfizm bilgi içeriği) değeri, gen çeşitliği (beklenen heterozigotluk değeri) (H_e), Shannon değeri (I) ve R_p (resolving power) değeri elde edilmiştir (Tablo 4.3).

En yüksek PIC değeri 0,87 ile 2245 primerinde iken en düşük PIC değeri ise 0,18 ile 2273 primerindedir ve toplam PIC değerlerinin tüm primerler için ortalaması 0,66'dir ve 1'e oldukça yakın olduğu için bu kullanılan primerlerin oldukça bilgilendirici olduğunu göstermektedir. Primerlerin genotipleri ayırt etme gücünü gösteren resolving power değerinin ise bu çalışmada 0,38 (2273) ile 4,64 (2401) arasında değiştiği görülmüştür.

Gen çeşitliliği değeri (beklenen heterozigotluk değeri) 0,49 değeri ile en fazla 2230 primerinde gözlemlenirken, 0,06 değeri ile en az 2400 primerinde gözlemlenmiştir. Tüm yapılan çalışmada ise 235 genotip için ortalama gen çeşitliliği değeri 0,25'dir. Shannon çeşitlilik indeksine bakıldığında ise en yüksek değer 2224 primerinde 0,31 olarak hesaplanmıştır, en düşük değer ise 0,06 ile 2392 primerinde görülmüştür. Tüm primerler için hesaplanan ortalama Shannon değeri ise 0,19'dir. Efektif allel sayısı (N_e) 2,72 değeri ile en fazla 2402 primerinde görülürken, 0,26 değeri ile en düşük 2228 primerinde görülmüştür. Tüm primerler için ortalama efektif allel sayısı ise 0,69'dir.

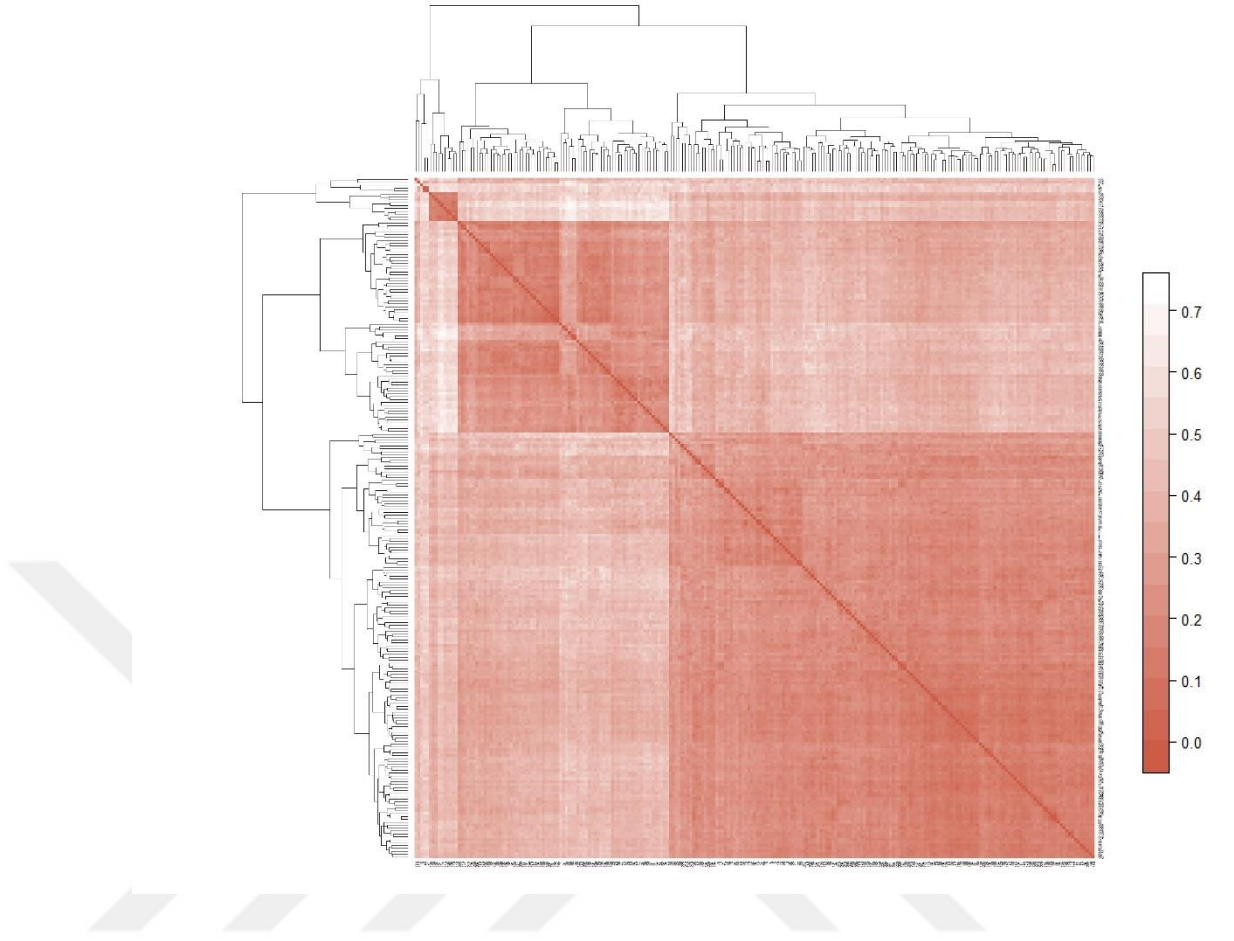
Tablo 4.3. iPBS primerleri ile oluşturulan bant profilleri.

Primer ID	TB	PB	PR	PIC	Ne	I	He	Rp
iPBS 2085	8	8	100%	0.75	0.10	0.77	0.08	0.75
iPBS 2087	9	7	78%	0.78	0.65	1.49	0.24	2.41
iPBS 2217	5	4	80%	0.76	1.05	0.61	0.12	0.52
iPBS 2221	10	9	90%	0.59	0.27	1.49	0.20	2.46
iPBS 2222	7	5	71%	0.72	0.71	0.68	0.15	0.97
iPBS 2224	7	5	71%	0.76	0.85	1.56	0.40	3.13
iPBS 2228	13	12	92%	0.68	0.26	2.54	0.26	4.63
iPBS 2229	10	9	90%	0.60	0.28	2.07	0.31	4.47
iPBS 2230	5	3	60%	0.85	2.26	0.75	0.49	1.50
iPBS 2241	9	8	89%	0.68	0.34	2.04	0.35	4.42
iPBS 2243	11	8	73%	0.71	0.43	1.33	0.19	2.50
iPBS 2245	8	6	75%	0.87	1.33	1.59	0.30	2.67
iPBS 2251	5	4	80%	0.47	0.47	0.79	0.28	1.56
iPBS 2252	5	4	80%	0.74	0.95	0.97	0.30	1.67
iPBS 2255	11	11	100%	0.73	0.34	2.46	0.28	4.40
iPBS 2257	4	4	100%	0.21	0.32	0.42	0.19	0.95
iPBS 2273	2	2	100%	0.18	0.61	0.18	0.17	0.37
iPBS 2295	10	9	90%	0.82	0.61	0.75	0.20	2.45
iPBS 2298	12	12	100%	0.86	0.58	2.65	0.23	3.70
iPBS 2373	10	8	80%	0.61	0.32	1.99	0.35	4.52
iPBS 2389	7	7	100%	0.60	0.36	1.14	0.21	1.95
iPBS 2391	7	5	71%	0.77	0.88	0.69	0.17	1.21
iPBS 2392	6	5	83%	0.46	0.37	0.32	0.08	0.42
iPBS 2393	4	4	100%	0.54	0.55	0.98	0.37	2.14
iPBS 2399	6	6	100%	0.50	0.35	0.87	0.20	1.71
iPBS 2400	5	4	80%	0.76	1.02	0.55	0.12	0.14
iPBS 2401	13	13	100%	0.74	0.29	2.91	0.25	4.64
iPBS 2402	3	2	67%	0.82	2.72	0.61	0.38	1.15
Average	7.57	6.57	86%	0.66	0.69	1.29	0.25	2.27
Total	212	184	TB: Total bands number. PB: Polymorphic bands number. PR: Polymorphism rate. PIC: Polymorphism information contents. Ne: Effective allele number. I: Shannon's information index. He: Nei's gene diversity. Rp: Resolving power					

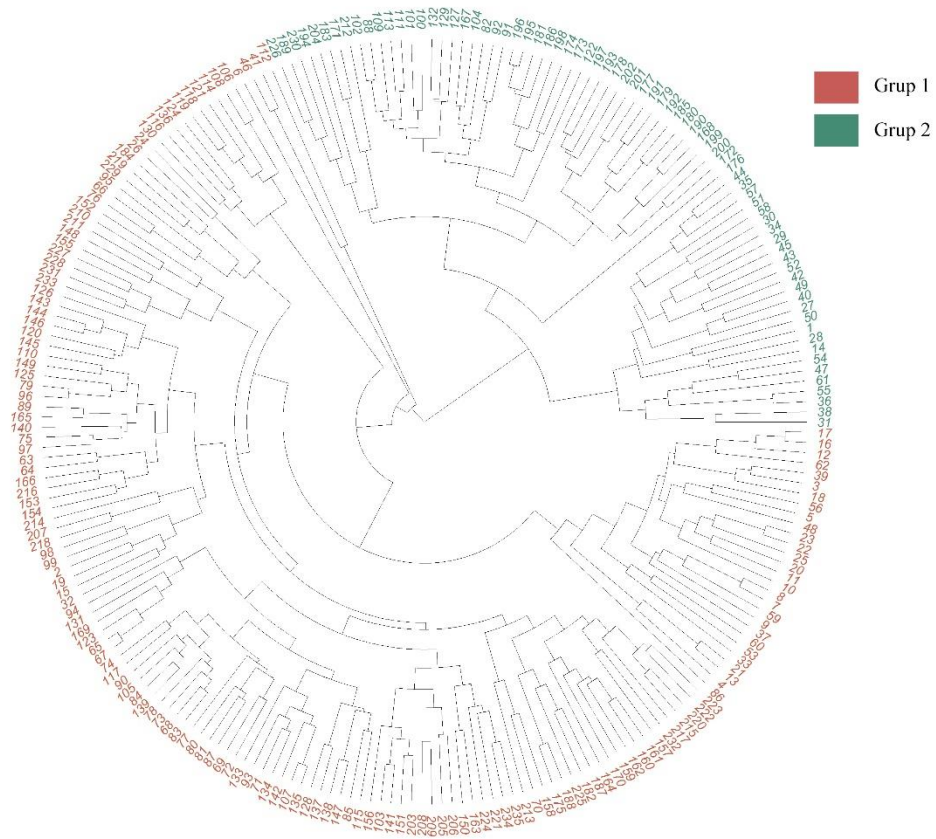
iPBS verileri kullanılarak Jaccard benzerlik katsayısı ile R Studio programında yapılan analize göre *B. distachyon* genotiplerinin aralarındaki genetik uzaklık değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile çizilen heat map ve dendrogram Şekil 4.3.5 ve Şekil 4.3.6’da verilmiştir. Dendrogram incelendiğinde, genotiplerin 2 alt grup oluşturduğu görülmektedir. Grup 1 içerisinde 74 adet genotip varken, grup 2 içerisinde 161 adet genotip vardır (Şekil 4.3.6; Kırmızı renkli – Grup 1, Mavi renkli – Grup 2).

Genetik uzaklık değerleri incelendiğinde; tüm değerlerin 0,04 ile 0,67 aralığında olduğu görülmektedir. Popülasyonda Geno65 (Sehitlik, Canakkale) ve Geno68 (Sehitlik, Canakkale) kodlu genotiplerin birbirine en yakın genotipler olduğu ve aralarındaki genetik uzaklığın 0,02 olduğu görülmektedir. Geno58 (Kozluk, Batman) ve Geno115 (Tavsanlı, Kutahya) kodlu genotiplerin ise birbirine en uzak genotipler olduğu ve aralarındaki genetik uzaklığın 0,67 olduğu görülmektedir.

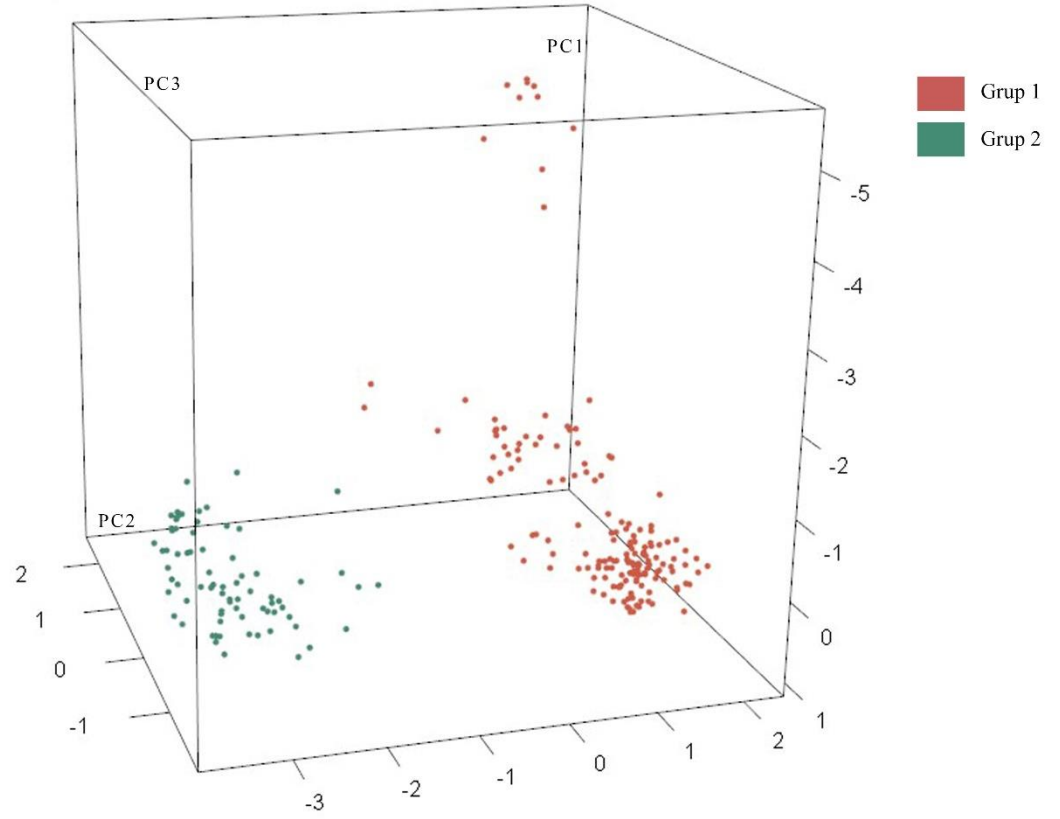
B. distachyon genotiplerinden oluşan koleksiyondaki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla alternatif olarak yapılan temel bileşen analizi (PCoA) sonucunda elde edilen grafikte, dendrogramda görüldüğü gibi genotiplerin 2 alt gruba ayrıldığı görülmüştür ve dendrogramdan elde edilen verileri destekler niteliktedir (Şekil 4.3.7).



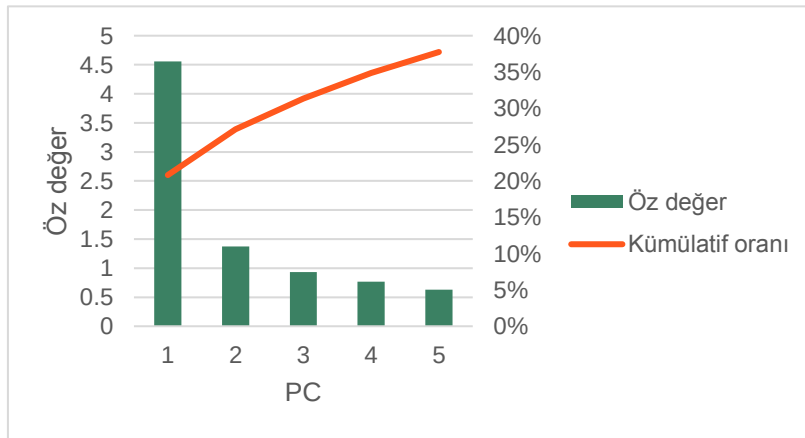
Şekil 4.3.5. iPBS verileri kullanılarak çizilen heat map.



Şekil 4.3.6. iPBS verileri kullanılarak Nei dist metoduna göre çizilen UPGMA dendrogram

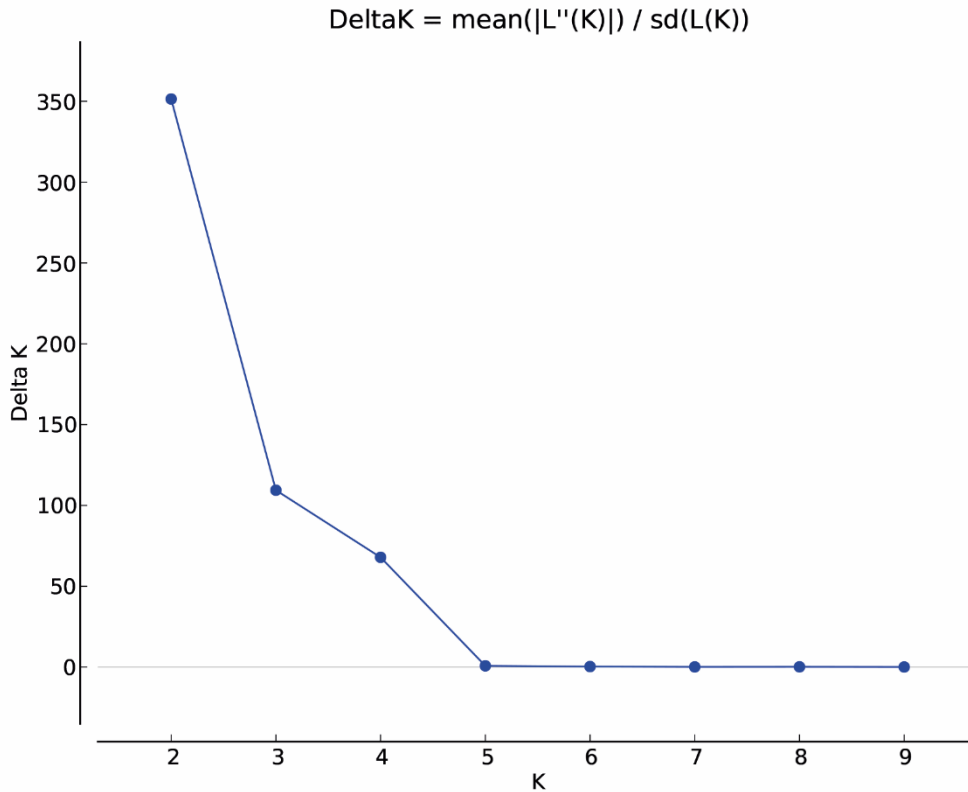


Şekil 4.3.7. iPBS verileri kullanılarak çizilen PCoA grafiği

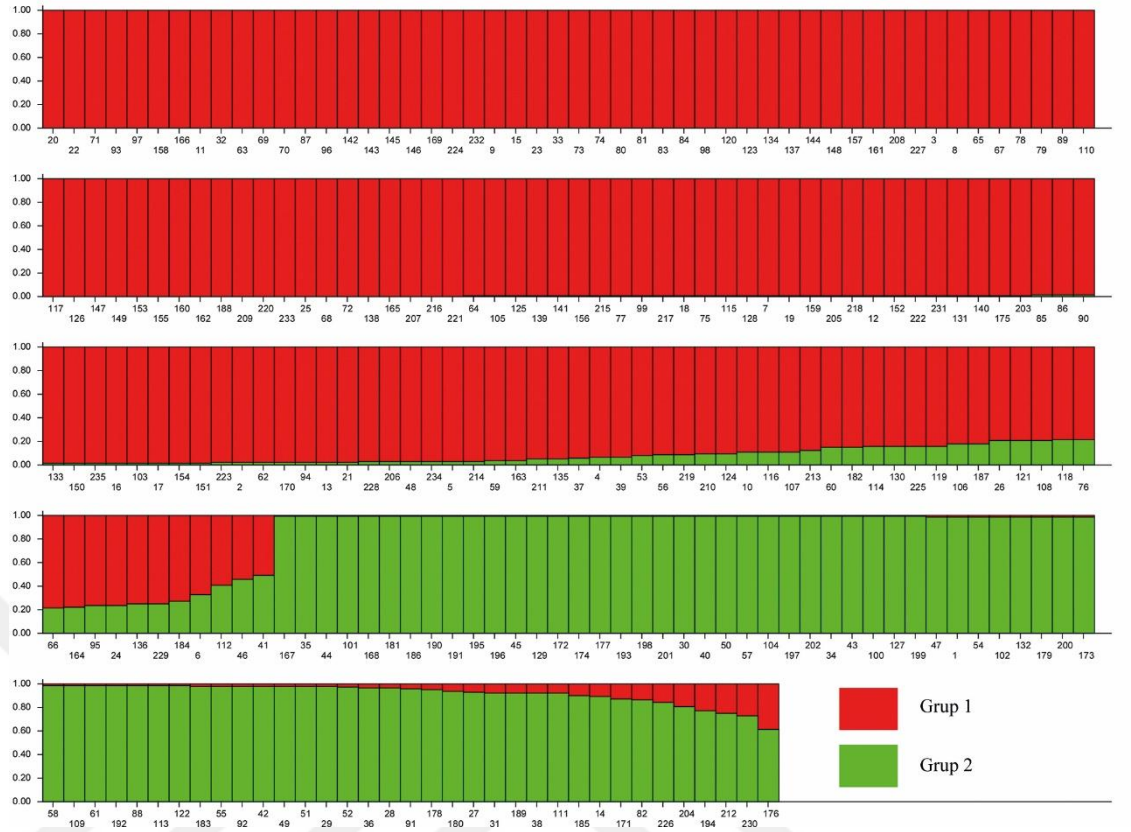


Şekil 4.3.8. PCoA grafiğine ait verilerin öz değer ve kümülatif oran grafiği.

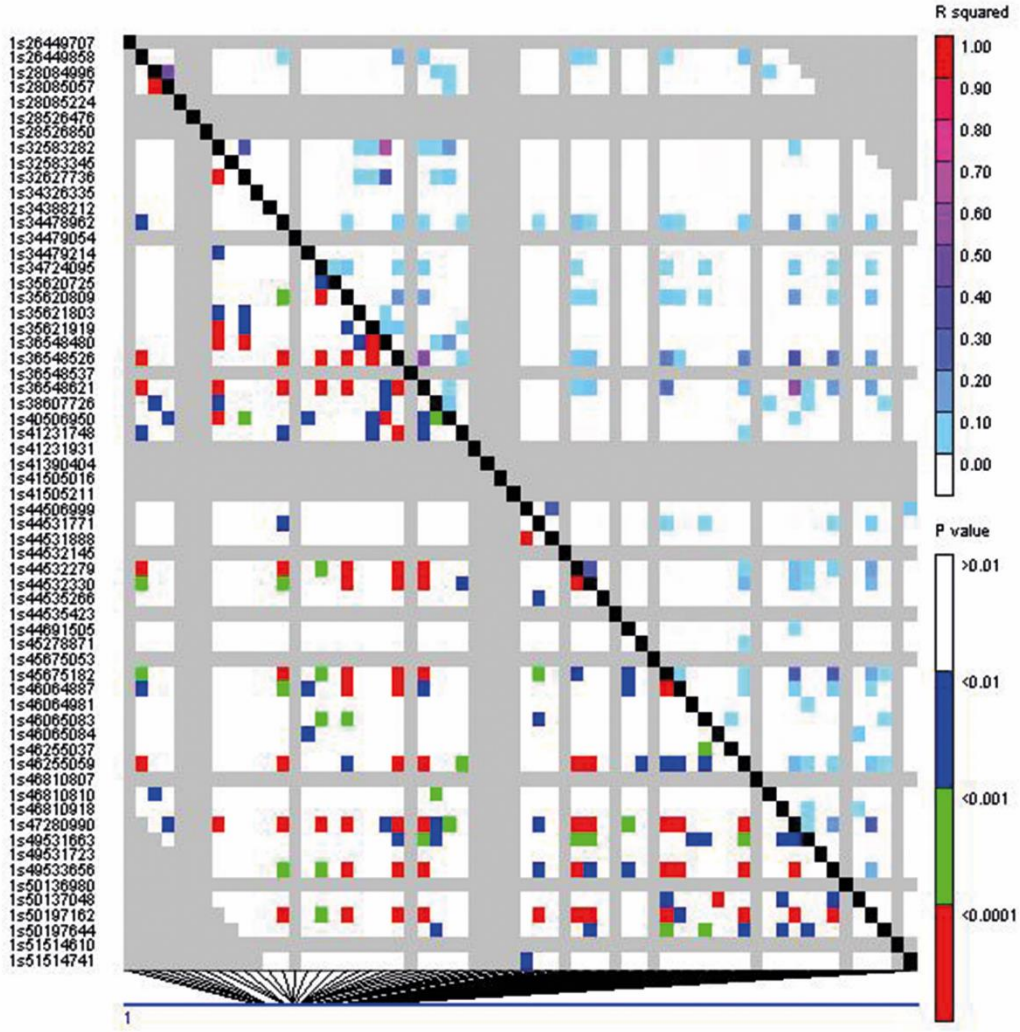
Bu çalışmada kullanılan *B. distachyon* türüne ait 235 adet genotipten oluşan kolleksiyonun, STRUCTURE programı kullanılarak Evanno metoduna göre popülasyon yapısı belirlenmiştir. En uygun alt grup sayısını temsil eden Delta K (ΔK) değeri $\Delta K = m(L''(K)) / sd(L(K))$ formülüne göre STRUCTURE HARVESTER aracılığı ile hesaplanmıştır. En yüksek Delta K değeri 351,42 olarak hesaplanmıştır ve bu değer grafik üzerinde $K = 2$ 'yi göstermektedir (Şekil 4.3.9). Bu Delta K değeri baz alınarak STRUCTURE programından elde edilen popülasyon grafiği ise Şekil 4.3.10'da görülmektedir. 235 adet genotipin bulunduğu popülasyon iki gruba (Grup 1 ve Grup 2) ayrılmıştır. Aynı grup içerisindeki genotiplerin ortalama uzaklıkları (beklenen heterozigotluk değeri) ilk grup için 0,14, ikinci grup için 0,15 olarak hesaplanmıştır. Ortalama *Fst* değerleri ise ilk grup için 0,43 iken ikinci grup için 0,33 olarak hesaplanmıştır.



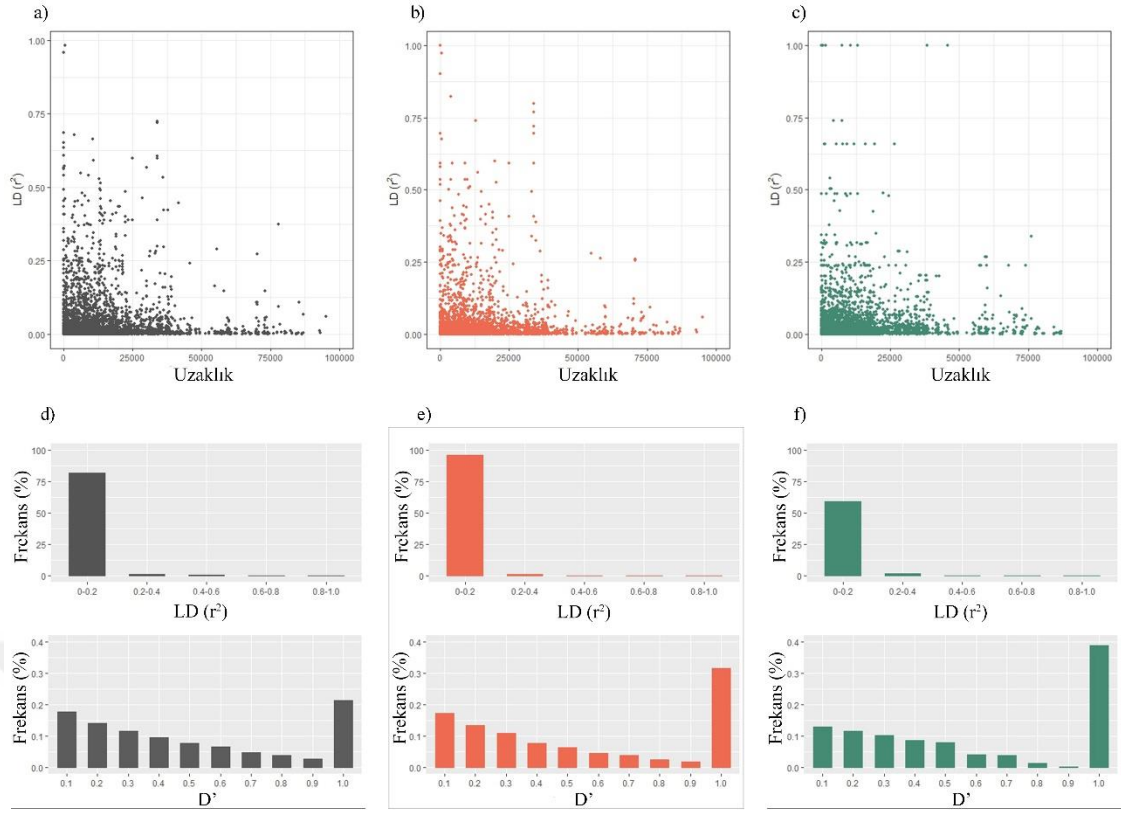
Şekil 4.3.9. ΔK değeri ve K değerleri grafiği



Şekil 4.3.10. *B. distachyon* popülasyon yapısı analiz sonucu ($K = 2$).

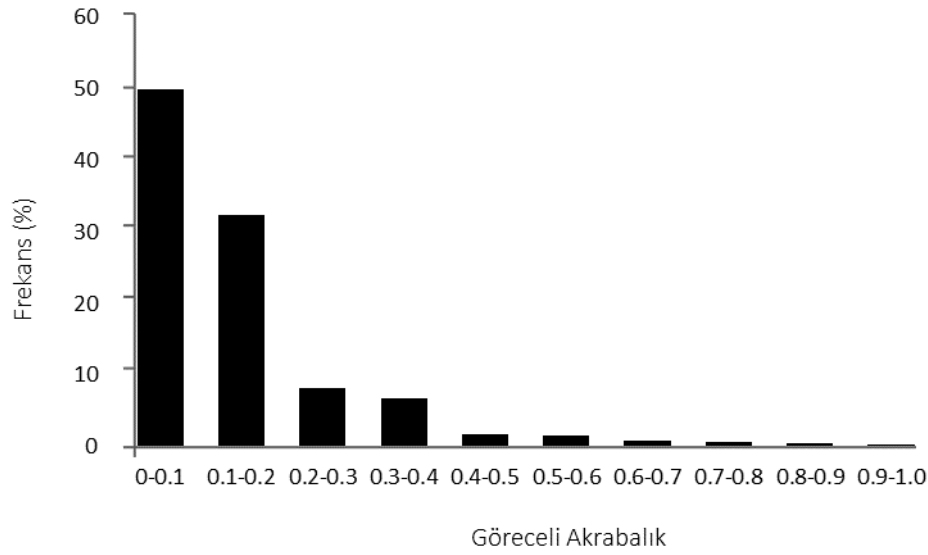


Şekil 4.3.11. LD heat map (tüm popülasyon için).



Şekil 4.3.12. LD dağılım grafikleri (a) tüm popülasyon, (b) grup 1 ve (c) grup 2. r^2 ve D' değerlerinin dağılım grafikleri (a) tüm popülasyon, (b) grup 1 ve (c) grup 2.

Şekil 4.3.11’de görülen heat map, bağlantı dengesizliği (LD) analizi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak tüm popülasyon için elde edilmiştir. Bu heat map’e göre (Şekil 4.3.11) grafiğin üst kısmında bulunan üçgen olasılık değerlerini (p -değerleri) gösterirken, grafiğin alt kısmında bulunan üçgen r^2 değerlerini göstermektedir. LD analizi sonucunda elde edilen verilere göre sonuçlar şu şekildedir: ortalama r^2 değerleri ilk grup için 0.18 iken ikinci grup için 0.31’tür ve tüm popülasyon için elde edilen r^2 değeri 0.13’tür. İstatiksel olarak önemli olan loci çiftleri için olan ortalama LD değerleri (D') ise ilk grup için 0.67 bulunurken, ikinci grup için 0.78 olarak hesaplanmıştır. Tüm *B. distachyon* popülasyonu için elde edilen D' değeri ise 0.58’dir. r^2 değerleri grup 1, grup 2 ve tüm popülasyon için sırasıyla %44.8, %27.1 ve %47.7 oranında 0.1’den düşük bir değere sahiptir (Şekil 4.3.12). Diğer yandan, LD decay grafikleri, LD ölçüsünün (r^2) Grup 1, Grup 2 ve tüm *B. distachyon* genotiplerinde baz çifti mesafesi (kb) ile nasıl değiştiğini göstermektedir (Şekil 4.3.12).



Şekil 4.3.13. Göreceli akrabalık değerleri grafiği

Ayrıca bu tez çalışmasında, *B. distachyon* genotiplerindeki bağıl akrabalık seviyesini analiz etmek için 184 polimorfik lokus kullanılmıştır ve çift akrabalık değerleri 0 ile 1 arasındadır. Yapılan hesaplamalar sonucunda, çift akrabalık tahmin değerlerinin % 82.3'ünün 0 ile 0.2 değerleri arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.13). Ek olarak, nispi akrabalık tahmin değerlerinin % 97,'sinin 0,4'ten az olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.3.13), yani genotiplerin büyük çoğunluğunun uzak akraba olduğu görülmekte iken, bazı genotipler yüksek benzerlik göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Genetik çeşitlilik analizleri ve genotipler arasındaki ilişkileri incelemek, çeşit geliştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Genetik çeşitlilik analizleri, genetik çeşitlilik seviyesi ve popülasyon yapısının anlaşılmasını sağlar ve bitki ıslahı programlarında ebeveyn genotipleri olarak kullanılacak genotiplerin seçilmesinde bir araç görevi görür (Ellegren ve Galtier 2016). *B. distachyon*, Poaceae ailesinde en küçük genoma sahiptir ve filogenetik olarak buğday, çeltik ve sorguma yakındır, bu sebeplerden dolayı tüm buğdaygiller için güçlü bir fonksiyonel genomik kaynak görevi görür (Draper ve ark. 2001; Vogel ve ark. 2010). Bu nedenle, bu tür üzerinde yapılan genetik çeşitlilik analizleri serin mevsim tahıl ve buğdaygil yem bitkilerinin gelecekteki ıslah çalışmalarını kolaylaştıracak ve hız katacaktır (Draper ve ark. 2001).

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru, moleküler markör teknolojisindeki gelişmelerle birlikte özellikle DNA markörleri, bitkilerin genotipleri hakkında geniş bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Retrotranspozon tabanlı moleküler markörler, bitki genomik ve filogenetik analizleri için güçlü kaynaklardır, çünkü genetik varyasyonun önemli bir kısmı transposable elementlerden kaynaklanmaktadır (Roy vd., 2014). Özellikle iPBS markör sistemi, retrotranspozon bazlı markör sistemleri ile karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir; örneğin, primer tasarlanırken sekans bilgisi gerekli değildir, düşük miktarda DNA gerektirir ve kullanımı kolaydır. iPBS moleküler markörleri ile genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik çalışmalar, bağlantı haritalarının oluşturulması, gen saptama ve belirli genleri taşıyan genotiplerin veya hatların incelenmesi gibi çeşitli çalışmaların yapılmasını sağlamaktadır.

Retrotranspozon bazlı çalışmalar bir çok bitki üzerinde yapılmıştır. Baloch ve ark.(2015), bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde iPBS markör yöntemi kullanarak popülasyon yapısını araştırmışlardır. Coutinho ve ark. (2018), Fagaceae ailesinin üyeleri olan kestane, kayın ve meşe türlerinde iPBS markörleri aracılığı ile moleküler karakterizasyon çalışması yapmışlardır. Arystanbekkyzy ve ark. (2018), yabani ve yerli emmer buğdayında (*Triticum turgidum* spp. *Dicoccoides*) iPBS markörleri ile filogenetik ve taksonomik çalışmalar yapmışlardır. Souza ve ark. (2018), sazgillerde (*Eleocharis*) retrotranspozon miktarı, çeşitliliği ve dağılımını incelemişlerdir. Genetik çeşitlilik çalışmaları ise aspir (*Carthamus tinctorius* L.), asma (*Vitis vinifera* L. Spp. *sativa* D.C.), nohut (*Cicer*), bamya (*Abelmoschus esculentus* L.), *Leonurus cardiaca* gibi çeşitli bitkilerde yapılmıştır. Bununla birlikte, bu tez çalışması iPBS markörleri kullanılarak *B.*

distachyon genotiplerinin tanımlanması ve moleküler karakterizasyonu hakkında ilk rapordur.

Bu tez çalışmasında 235 *B. distachyon* genotipi 28 adet iPBS markörü kullanılarak analiz edilmiştir. Bu markörler ile 212 adet bant görüntüsü elde edilmiştir ve bunlardan 184 tanesi polimorfiktir. Oranlandığı zaman çalışma sonucu elde edilen bantların %86'sının polimorfik olduğu görülmektedir. En fazla polimorfik bant elde edilen primer 13 bant ile iPBS 2401 iken en az polimorfik bant elde edilen primer ise 2 bant ile iPBS 2402'dir. Elde edilen tüm bantların polimorfik olduğu primerler ise iPBS 2085, 2255, 2257, 2273, 2298, 2389, 2393, 2399 ve 2401'dir. Bu tez çalışmasında primer başına elde edilen polimorfik bant sayısı değerleri fasülye (Nemli ve ark. 2015) ve incir (Belttar ve ark. 2017) için bildirilen sırasıyla 3.8 ve 2.7 değerlerinden daha yüksek hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, iPBS primerlerinin, önceki çalışmalarda kullanılan bu türlere kıyasla *B. distachyon* için daha fazla kopya sayısının olduğunu göstermektedir (Belttar vd., 2017; Nemli vd., 2015). Öte yandan, daha önce yapılan bazı iPBS çalışmalarında, primer başına düşen polimorfik alel sayısının, bu tez çalışmasında elde edilenden daha fazla olduğu bildirilmiştir; örneğin, kayısı (Baránek ve ark. 2012), bezelye (Baloch ve ark. 2015), üzüm (Guo ve ark. 2014), çeltik (Cömertpay ve ark. 2016), nohut (Andeden ve ark. 2013) ve safran (Gedik vd., 2017), polimorfik bant sayısını sırasıyla 6.6, 6.7, 7.1, 8.5, 13 ve 25.1 olarak tespit etmiştir. Bu durum, *B. distachyon* genomunun küçük olması ve iPBS bölgelerinin farklı türler arasında değişkenlik gösterebilmesi şeklinde açıklanabilir (Draper ve ark. 2001; Kalendar ve ark. 2019). Ek olarak, bu çalışmada bulunan ortalama polimorfizm oranı, AFLP (% 70) (Filiz vd., 2009), SSR (% 66) (Vogel vd., 2009), SSR ve ISSR (%26 ve %16) (Hammami vd., 2014) gibi *B. distachyon* türünde yapılan önceki çalışmalarda elde edilenden daha büyük bulunmuştur. Diğer yandan, *B. distachyon*'da RAPD markörleri kullanılarak yapılan çalışmaya göre elde edilen polimorfizm düzeyinin (% 96) daha fazla olduğu görülmüştür (Jaroszewicz vd., 2012), ancak iPBS markör sisteminin RAPD yöntemine kıyasla, kolay gerçekleştirilebilir ve tekrar üretilebilirlik gibi birçok avantajı vardır. (Ruslan Kalendar vd., 2010). Genetik markörlerin etkinliğini belirlemek için ana kriterlerden biri polimorfizmdir (Ali ve ark. 2019) ve sonuçlarımıza göre iPBS markör sisteminin *B. distachyon* çalışması için uygun olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan 28 adet iPBS primerinin etkinliklerini belirlemek amacıyla çeşitli hesaplamalar yapılmıştır. Bunlar; PIC (Polimorfizm Bilgi İçeriği) değeri, gen çeşitliliği (beklenen heterozigotluk değeri), Shannon değeri ve RP (Resolving Power)'dir (Tablo 4.3). PIC hesaplamaları sonucu elde edilen verilere göre, en yüksek

PIC değeri 2245 primerinde 0,87 olarak görülmüştür. En düşük PIC değeri ise 2273 primerinde 0,18 değerine sahiptir. Tüm bu çalışmada kullanılan primerlerin ortalama PIC değeri ise 0,66'dır (Tablo 4.3). Elde edilen bu sonuçlar ile iPBS 2245 primerinin *Brachypodium distachyon* genotiplerinin genetik çeşitliliğini ayırt etmede en etkili olduğu görülmektedir. Daha önce yapılan iPBS çalışmalarında elde edilen PIC değerleri ise şu şekildedir; Mehmood ve ark. (2013)'nin guava (*Psidium guajava*) bitkisinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri PIC değerleri 0,13 ile 0,37 arasında değişmektedir. Andeden ve ark. (2013)'nin nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinde yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmasında hesapladıkları PIC değerleri 0,86 ile 0,95 arasında değişirken, ortalama PIC değerinin ise 0,91 olduğu görülmüştür. Nemli ve ark. (2015), fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi ile yaptıkları çalışmada hesapladıkları PIC değeri 0,03 ile 0,94 arasında değişmekteyken ortalama PIC değeri 0,73'tür. Bu tez çalışmasında elde edilen PIC değerinin (0,66) daha önce yapılmış olan çalışmalarda elde edilen değerlerden daha düşük olmasının sebebi, çalışılan bitkilerdeki iPBS bölgelerinin miktarındaki farklılıklar olarak düşünülebilir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen ortalama PIC değerinin (0,66), bezelye (0,61) (Baloch ve ark. 2015), çeltik (0,35) (Cömertpay ve ark. 2016) ve pamukta (0,17) (Tyagi ve ark. 2014) yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da göstermektedir ki iPBS markör sistemi *B. distachyon* türünde bezelye, çeltik ve pamuğa kıyasla daha verimli çalışmaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen PIC değerlerini desteklemesi amacıyla hesaplanan ve primerlerin genotipleri ayırt etme gücünü gösteren resolving power (RP) değerinin 0,14 (2400) ile 4,64 (2401) arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 4.3). Daha önceki iPBS çalışmalarında, RP değerleri üzümde (Guo vd., 2014) 1.43 (iPBS 2231) ile 5.60 (iPBS 2230) ve *Tetradium ruticarpum*'da (XU vd., 2018) 4.44 (iPBS 2230) ile 11.20 (iPBS 2230) arasında değiştiği bulunmuştur. RP analizinin sonucu, incelenen germplazma türünün primerlerin çözme gücünü etkilediğini göstermektedir (Sarla ve ark. 2003). Elde edilen PIC ve RP sonuçları sadece bu araştırmada incelenen tüm primerlerin polimorfizmi oluşturmada güçlü olduğunu göstermekle kalmamış, aynı zamanda iPBS markörlerinin *B. distachyon*'daki genetik çeşitliliği belirlemede özellikle etkili olduğunu göstermiştir.

B. distachyon genotipleri yapılan bu tez çalışmasında, Shannon'ın bilgi endeksi (I) ve Nei'nin genetik çeşitliliğinin (H) ortalama değeri sırasıyla 1.29 ve 0.25 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.3). Bu hesaplamalar için daha yüksek değerler, yüksek genetik çeşitliliğin varlığını göstermektedir ve bu nedenle *B. distachyon* genotipleri arasında

makul bir farklılık vardır (Shannon 1997; Spellerberg ve Fedor 2003; Magurran 2004). Bu çalışmada elde edilen ortalama Shannon'ın bilgi indeksi (I) (1.29) ve Nei'nin genetik çeşitliliği (H) (0.25) değerlerinin daha önce yapılan bazı çalışmalara kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür; örneğin, çeltikte sırasıyla 0.30 ve 0.23 (Cömertpay ve ark. 2016) ve safranda sırasıyla 0.29 ve 0.16 (Gedik ve ark. 2017) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, efektif allellerin (Ne) miktarı büyük genetik varyasyonun varlığını gösterir ve bu nedenle efektif allel sayısı yüksek olmalıdır. Efektif allel (Ne) sayısı, bu çalışmada 0.10 (iPBS 2085) ile 2.72 (iPBS 2402) arasında değişmektedir ve ortalama 0.69 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Daha önce yapılan birkaç iPBS çalışmasında, örneğin buğday (1.96) (Arystanbekkyzy ve ark.2019), bamya (1.46) (Yıldız ve ark.2015) ve aspir (1.33) (Ali ve ark.2019) gibi bitkilerde yapılan hesaplamalarda ortalama efektif allel sayısının daha fazla olduğu bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında R Studio programı kullanılarak Jaccard benzerlik katsayısı ile Nei dist yöntemine göre 235 *B. distachyon* genotipinin arasındaki genetik uzaklık değerleri hesaplanmıştır ve ikili genetik mesafe katsayısı puanlarına dayanarak UPGMA dendrogramı ve heat map elde edilmiştir (Şekil 4.3.5 ve 4.3.6). Genetik uzaklık değerleri 0.04 ile 0.67 arasında değişmektedir ve en yakın genotipler Geno66 (Şehitlik, Çanakkale) ve Geno67 (Şehitlik, Çanakkale) iken, Geno58 (Kozluk, Batman) ve Geno115 (Tavşanlı, Kütahya) genotipleri arasında maksimum genetik varyasyon tespit edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda, genetik olarak en uzak genotipler (Geno58 ve Geno115) F2 genotipinde büyük ayrışmayı gözlemlemek için aday ebeveynler olarak seçilebilir. Bu nedenle, genetik uzaklık analizi sonuçları bitki ıslahı programları ve genetik kaynak koleksiyonlarının oluşturulmasında kullanılabileceği açıkça görülmektedir. Diğer taraftan, dendrogramın sonucundan da görülebileceği gibi (Şekil 4.3.6), *B. distachyon* genotiplerinden oluşan kolleksiyon büyük çeşitlilik gösteren iki ana gruptan oluşmaktadır. Grup 1, Türkiye'nin kıyı bölgelerinden toplanan 161 genotip içerirken, Grup 2, Türkiye'nin iç bölgelerinden toplanan 74 genotip içermektedir ve bu gruplar da çeşitli alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 4.3.6; grup 1 kırmızı ve grup 2 mavi). Benzer şekilde, PCoA sonucu, *B. distachyon* genotiplerinden oluşan popülasyonunun, dendrogramda gösterildiği gibi yüksek genetik varyasyona sahip iki ana gruba ayrıldığını göstermiştir (Şekil 4.3.7; grup 1 kırmızı ve grup 2 mavi). Türk *B. distachyon* genotipleri ile AFLP markörü kullanılan önceki bir çalışmada, bir UPGMA dendrogramı kullanılan popülasyonu esas olarak 5 gruba ayırmış ve 116 diploid inbred hattı coğrafi kökenlerine göre sınıflandırılmıştır (Filiz ve ark. 2009). Orijinleri farklı ülkelere dayanan *B.*

distachyon genotiplerinden oluşan bir koleksiyon üzerinde yapılan bir başka popülasyon yapısı çalışmasında, popülasyon üç küme oluşturmuştur (Tyler ve ark. 2016).

STRUCTURE yazılımı ile gerçekleştirilen Türk *B. distachyon* popülasyon yapısının analizi sonucu, genotiplerin $K = 2$ 'de (Şekil 4.3.10; grup 1 kırmızı kısım ve grup 2 yeşil kısım) iki gruba ayrıldığı görülmüştür. Grup 1, Türkiye'nin esas olarak Tekirdağ, Edirne, Çanakkale ve Burdur gibi kıyı kentlerinden toplanan genotiplerden oluşurken, grup 2 ise Eskişehir ve Ankara şehirlerinden ve Türkiye'nin doğu kentlerinden (Gaziantep, Batman ve Adıyaman) toplanan genotipleri içermektedir. Dolayısıyla bu sonuç, bu iPBS çalışmasında kullanılan Türk *B. distachyon* genotiplerinin dağılımının, birkaç istisna dışında toplama yerlerine (kıyı bölgeleri veya Türkiye'nin iç kısımları) bağlı olduğunu göstermiştir. Bu sınıflandırma sonucu, simple sequence repeats (SSR) markörleri kullanılarak yapılan Türk *B. distachyon*'unun önceki genetik çeşitlilik çalışmasıyla da desteklenmektedir (Vogel ve ark. 2009). Yapılmış olan bu SSR çalışmasında Adıyaman ve Gaziantep'ten toplanan doğu hatları iki gruptan birini oluştururken, diğer grubu oluşturan hat Tekirdağ'dan toplanmıştır (Vogel ve ark. 2009). Ayrıca bu tez çalışmasında yakın yerlere ait bazı genotiplerin yüksek genetik mesafeye sahip oldukları bulunmuştur ve bu sonuç genotipler arasında, *B. distachyon*'daki yüksek kendilenme oranı ile düşük gen akışı olduğunu göstermektedir (Vogel ve ark. 2009; Tyler ve ark. 2016). Bu bulgular DNA barkodlama yöntemi (López-Alvarez ve ark. 2012), SNP (Tyler ve ark. 2016) ve SSR (Vogel ve ark. 2009) yöntemleri kullanılarak daha önce yapılan *B. distachyon*'un popülasyon yapı analizlerinin sonuçları ile uyumludur. SSR markör yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen *B. distachyon*'un önceki bir başka popülasyon yapısı analizinde kullanılan genotiplerin, bu iPBS çalışmasında olduğu gibi benzer coğrafi bölgelere göre ayrıldığı görülmüştür ve popülasyonun iki ana kümeye ayrıldığı, gruplardan birinin Kaliforniya'ya ait olurken diğerinin Avrasya'ya ait olduğu görülmüştür (Bakker ve ark.2009).

Fst akrabalık katsayısı, alt popülasyonlar arasındaki heterozigotluğun bir ölçüsünü göstermektedir (Ochoa ve Storey 2019). Yapılan bu tez çalışmasının popülasyon yapısı analizi kullanılarak *Fst* değerleri birinci grup için 0.43 ve ikinci grup için 0.33 olarak hesaplanmıştır ve bu sonuçlar alt gruplar arasında büyük farklılaşma olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Türkiye'nin kıyı bölgelerinden toplanan genotipler geniş bir coğrafi bölgeye sahip olduğundan, grup 1 beklediği gibi grup 2'den daha yüksek bir *Fst* değerine sahiptir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında zaman, Türk *B. distachyon* genotipleri kullanılarak yapılan AFLP çalışmasında, farklı lokasyonlar

arasındaki tüm karşılaştırmalar için *Fst* değerleri sıfırdan oldukça farklıdır ve bu nedenle popülasyonlar arasında büyük bir varyasyon olduğu görülmektedir (Filiz ve ark. 2009). Ayrıca başka bir çalışmada, fenotipik karakterizasyon analizine göre yabancı bir bitki olan *B. distachyon* genotiplerinde önemli miktarda doğal çeşitlilik gözlenmiştir (Tyler ve ark. 2014). Önceki çalışmalarda, *Fst* değerleri arpada 0.36 (Forsberg ve ark.2019), durum buğdayında 0.18 (Maccaferri ve ark.2005) ve çeltikte 0.85 (Garris ve ark.2003) olarak tespit edilmiştir. Kullanılan bu türlerin yakın tahıl türleri olmasına rağmen, aralarındaki genetik varyasyon seviyelerindeki farklılıklar, ıslah geçmişlerindeki farklılıklar ve genotiplerin habitatlarındaki yetiştirme oranlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, beklenen heterozigotluk değerleri (grup 1 için 0.15 ve grup 2 için 0.14), *B. distachyon* genotiplerinin *Fst* değerlerini destekleyerek büyük bir genetik varyasyon seviyesinin olduğunu göstermiştir.

LD (bağlantı dengesiziği); iki gen / QTL veya iki markör arasında rastgele bir ilişki olarak tanımlanır ve popülasyondaki aleller arasındaki korelasyonu temsil eder (Gupta ve ark.2005; Weir 2008). İlişkilendirme eşlemesi yapılırken LD decay mesafelerinin hesaplanması önemlidir (Mackay ve Powell 2007). Popülasyon yapısı; rekombinasyon, mutasyon, seleksiyon, popülasyon yoğunluğu, doğal seleksiyon ve hibridizasyonun yanı sıra LD üzerinde etkisi olan önemli faktörlerden biridir (Flint-Garcia ve ark.2003). LD, bitkilerde r^2 ve D' değerleri hesaplanarak belirlenir (Mackay ve Powell 2007) ve yapılan bu tez çalışmasındaki tüm genotipler için elde edilen ortalama r^2 değerinin (0.13) sıfıra oldukça yakın olduğu görülmüştür, bu nedenle popülasyonun bağlantı dengesine sahip olduğu görülmektedir. LD analizi sonucunda elde edilen r^2 değerinin 0'a yakın olması bağlantı dengesizliğinin az olduğu anlamına gelmektedir ve bunun sebebi *B. distachyon* türünün kendine döllen bir tür olması olarak görülmektedir çünkü rastgele döllenmenin bağlantıda kayba yol açtığı bilinmektedir (Mackay ve Powell, 2007). Ekmek ve durum buğdayı genotipleri kullanılarak gerçekleştirilen önceki bir çalışmada tüm lokus çiftlerinin sırasıyla %47.9 ve %14.0'ının anlamlı LD'de olduğu, ancak $r^2 > 0.2$ eşliğine göre ekmek buğdayının lokus çiftlerinin sadece %0.9'unun ve durum buğdayının lokus çiftlerinin sadece %3.2'sinin anlamlı LD'de olduğu görülmüştür (Somers ve ark. 2007). Ayrıca, çok çeşitli arpa suşlarında, anlamlı LD'deki lokus çiftlerinin %100'ünün $r^2 > 0.05$ değerlerine sahip olduğu, ancak bu oranın bir alt grupta % 45'e düştüğü bildirilmiştir (Malysheva-Otto ve ark. 2006). Bu sonuçlar hem anlamlı LD'deki lokus sayısının hem de LD derecesinin açıkça popülasyonun yapısına ve genom farklılıklarına bağlı olduğunu göstermektedir (Malysheva-Otto ve ark. 2006; Somers ve

ark. 2007). Yapılan bu tez çalışmasında, *B. distachyon* genotipleri için lokus çiftlerinin % 7.11'i anlamlı LD değerine sahiptir ($p < 0.01$), ancak $r^2 > 0.1$ eşliğine göre lokus çiftlerinin sadece % 4.16'sı LD değerine sahiptir (Şekil 4.3.12). Öte yandan, görel akrabalık tahmin değerlerinin % 97.2'si 0.4'ten daha azdır (Şekil 4.3.13). Bu nispi akrabalık sonuçları ve düşük LD değerleri, önceki üreme geçmişlerindeki rekombinasyonun, homozigot kendi kendine döllenmede ve daha yüksek genetik çeşitliliğin bir sonucu olarak korunduğunun ve stabilize edildiğinin bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Bu tez çalışması, küçük genom boyutuna rağmen *B. distachyon* genotipleri arasında yüksek düzeyde genetik çeşitlilik olduğunu göstermiştir. Bu yüksek çeşitliliğin nedenleri olarak, Türkiye'nin farklı iklim, toprak ve topoğrafik koşullara sahip coğrafi bölgelerden oluşan büyük bir ülke olması, Türkiye' nin *B. distachyon* türünün orijinlendiği coğrafi bölge içerisinde yer alması ve bu bölgedeki evrimsel kökenlerin uzun yıllara dayanması gösterilebilir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler, seçilecek ebeveynler gelecekteki tahıl ve yem bitkileri yetiştirme programları için oldukça uygun olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, literatürde ilk kez, Türkiye’den toplanan 235 adet *B. distachyon* genotipinin iPBS markörleri kullanılarak moleküler bilgisini göstermiştir. Çalışmada kullanılan *B. distachyon* koleksiyonu, UPGMA, PCoA ve STRUCTURE analizlerine göre genotiplerin toplandıkları lokasyonlara bağlı olarak iki ana gruba ayrılmıştır. iPBS markör sistemi *B. distachyon*’da oldukça fazla genetik çeşitliliğin varlığını göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçları *B. distachyon* ve bu türe yakın olan türlerin gelecekteki ıslah programlarında ve seçilecek ebeveynler için kullanılması önerilmektedir.

Günümüzdeki kıtlık ve iklim değişikliği gibi çeşitli problemler göz önünde bulundurulduğunda buğdaygil türleri için böyle önemli bir model olan *Brachypodium distachyon*’un GWAS (genome wide association mapping) çalışmaları ile *Fusarium* gibi patojenlere ve kuraklık, aşırı sıcak ve soğuk hava koşulları gibi çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılık araştırmaları önerilmektedir.

Genetik çeşitliliğin ve değerli gen kaynaklarının korunması canlıların gelecekteki yaşamını önemli ölçüde etkileyecek önemli bir faktördür. Şehirleşmenin artması, bitki örtüsünün zarar görmesi ve sanayileşme gibi etkenler doğadaki genetik çeşitliliği olumsuz etkilemektedir. Genetik çeşitlilikteki azalma sonucunda bitkiler kuraklık, aşırı sıcaklık değişimleri, nem vb. çevresel stres faktörlerine karşı dayanıksız hale gelmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar göre gelişmiş bitki türlerinin yabani akrabaları önemli ölçüde değerli gen kaynaklarına ve genetik çeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle *Brachypodium distachyon*’un da dahil olduğu yabani popülasyonların sahip olduğu gen kaynakları ve genetik çeşitlilik seviyeleri iyi araştırılmalı ve muhafaza edilmesi için korunmalı ve kullanılabilir hale getirilmelidir. Türkiye sahip olduğu coğrafik konumu ve heterojen ekolojik koşulları ile yüksek derecede genetik çeşitliliğe ve gen kaynaklarına sahip ve birçok yabani türün dağılım merkezi olan bir ülkedir. Bu sebeple, doğal yabani popülasyonların genetik çeşitliliğinin korunması, onlardan türeyen gelişmiş akrabalarının agronomik özelliklerini geliştirmede bu yabani türlerden yararlanılması gibi çalışmaların planlanması ve uygulanmasında Türkiye lider ülkelerden biri olmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ali F, Yilmaz A, Nadeem MA, et al (2019) Mobile genomic element diversity in world collection of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) panel using iPBS-retrotransposon markers. PLoS ONE 14:e0211985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211985>
- Andeden EE, Baloch FS, Derya M, et al (2013) iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual *Cicer* species. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 22:453–466. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0175-5>
- Antonius-Klemola K, Kalendar R, Schulman AH (2006) TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. Theoretical and Applied Genetics 112:999–1008. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0203-0>
- Bakker EG, Montgomery B, Nguyen T, et al (2009) Strong population structure characterizes weediness gene evolution in the invasive grass species *Brachypodium distachyon*. Molecular Ecology 18:2588–2601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04225.x>
- Baloch FS, Alsaleh A, de Miera LES, et al (2015) DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey. Biochem. Syst. Ecol 61:244–252. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.017>
- Baránek M, Meszáros M, Sochorová J, et al (2012) Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovická. Scientia Horticulturae 143:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.022>
- Belttar H, Yahia A, Nemli S, et al (2017) Determination of the population structure of fig genotypes from Algeria and Turkey using inter primer binding site-retrotransposon and simple sequence repeat markers. Agricultural Sciences 8:1337–1357. <https://doi.org/10.4236/as.2017.812097>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bevan MW, Garvin DF, Vogel JP (2010) *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. Current Opinion in Biotechnology 21(2):211-217. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.006>
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, et al (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23:2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Casler MD (2012) Switchgrass breeding, genetics, and genomics. Green Energy and Technology. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2903-5_2
- Comertpay G, Baloch FS, Derya M, et al (2016) Population structure of rice varieties used in Turkish rice breeding programs determined using simple-sequence repeat and inter-primer binding site-retrotransposon data. Genet. Mol. Res. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017158>
- Coutinho JP, Carvalho A, Martín A, Lima-Brito J (2018) Molecular characterization of *Fagaceae* species using inter-primer binding site (iPBS) markers. Molecular Biology Reports 45:133–142. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4146-3>
- Cui Y, Lee MY, Huo N, et al (2012) Fine mapping of the Bsr1 barley stripe mosaic virus resistance gene in the model grass *Brachypodium distachyon*. PLoS ONE 7:e38333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038333>
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15
- Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, et al (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. Plant Physiology 127:1539–1555. <https://doi.org/10.1104/pp.010196>
- Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eichten SR, Stuart T, Srivastava A, et al (2016) DNA methylation profiles of diverse *Brachypodium distachyon* align with underlying genetic diversity. Genome Research. <https://doi.org/10.1101/gr.205468.116>
- Ellegren H, Galtier N (2016) Determinants of genetic diversity. Nature Reviews Genetics 17:422-433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Molecular Ecology 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Filiz E, Ozdemir BS, Budak F, et al (2009) Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. Genome 52:876–890. <https://doi.org/10.1139/G09-062>
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual Review of Plant Biology 54:357–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907>
- Forsberg NEG, Leino MW, Hagenblad J (2019) Population structure in landrace barley (*Hordeum vulgare* L.) during the late 19th century crop failures in Fennoscandia. Heredity 123:733–745. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0277-0>
- Garris AJ, McCouch SR, Kresovich S (2003) Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L.). Genetics 165:759–769
- Gedik A, Ates D, Erdogmus S, et al (2017) Genetic diversity of *Crocus sativus* and its close relative species analyzed by iPBS-retrotransposons. Turkish Journal of Field Crops 22:. <https://doi.org/10.17557/tjfc.357426>
- Gordon SP, Priest H, Des Marais DL, et al (2014) Genome diversity in *Brachypodium distachyon*: Deep sequencing of highly diverse inbred lines. Plant Journal 79:361–374. <https://doi.org/10.1111/tpj.12569>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo DL, Guo MX, Hou XG, Zhang GH (2014) Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 52:27–32. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.10.008>
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* 57:461–485
- Hammami R, Jouve N, Soler C, et al (2014) Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol* 300:2029–2040. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1021-0>
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>
- Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology* 5:225. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-225>
- Jin L, Lu Y, Xiao P, et al (2010) Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 121:475–487. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1324-7>
- Kalendar R (2011) The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. *Ratarstvo i povrtarstvo* 48:261–274. <https://doi.org/10.5937/ratpov1102261k>
- Kalendar R, Amenov A, Daniyarov A (2019) Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. *Functional Plant Biology* 46(1):15–29
- Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, Schulman AH (2010) iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121:1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kalendar R, Flavell AJ, Ellis THN, et al (2011) Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity* 106:520-530
- López-Alvarez D, López-Herranz ML, Betekhtin A, Catalán P (2012) A DNA Barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS ONE* 7:e51058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051058>
- Anderson JA, Churchill G, Autrique J, Tanksley S, Sorrells M (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181–186. <https://doi.org/10.1139/g93-024>
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Noli E, Tuberosa R (2005) Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Molecular Breeding* 15:271–290. <https://doi.org/10.1007/s11032-004-7012-z>
- Mackay I, Powell W (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in Plant Science* 12:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.001>
- Magurran A (2004) Introduction: measurement of (biological) diversity. *Measuring Biological Diversity*
- Makarevitch I, Waters AJ, West PT, Stitzer M, Hirsch CN, Ross-Ibarra J, Springer NM (2015) Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. *PLoS Genetics* 11: e1004915. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004915>
- Malysheva-Otto LV., Ganai MW, Roder MS (2006) Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-6>
- Mochida K, Uehara-Yamaguchi Y, Takahashi F, et al (2013) Large-scale collection and analysis of full-length cDNAs from *Brachypodium distachyon* and integration with Pooideae sequence resources. *PLoS ONE* 8:e75265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Negi P, Rai AN, Suprasanna P (2016) Moving through the stressed genome: emerging regulatory roles for transposons in plant stress response. *Frontiers in Plant Science* 7:1448
- Nemli S, Kianoosh T, Tanyolac MB (2015) Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39:940–948. <https://doi.org/10.3906/tar-1505-59>
- Ochoa A, Storey JD (2019) FST and kinship for arbitrary population structures I: Generalized definitions. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/083915>
- Opanowicz M, Vain P, Draper J, et al (2008) *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends in Plant Science* 13(4):172-177. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.007>
- Ozdemir BS, Hernandez P, Filiz E, Budak H (2008) *Brachypodium* genomics. *International Journal of Plant Genomics* 2008:536104. <https://doi.org/10.1155/2008/536104>
- Pal NR, Bezdek JC, Hathaway RJ (1996) Sequential competitive learning and the fuzzy c-means clustering algorithms. *Neural Networks*. [https://doi.org/10.1016/0893-6080\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/0893-6080(95)00094-1)
- Pereira JF, Ryan PR (2019). The role of transposable elements in the evolution of aluminium resistance in plants. *Journal of Experimental Botany* 70(1):41–54. doi:10.1093/jxb/ery357
- Poczai P, Varga I, Laos M, et al (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review. *Plant Methods* 9(1):6. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-6>
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- R Core Team (2014) R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3097:CFHIWS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3097:CFHIWS]2.0.CO;2)
- Roy NS, Choi JY, Lee S Il, Kim NS (2014) Marker utility of transposable elements for plant genetics, breeding, and ecology: a review. *Genes and Genomics* 37:141-147. <https://doi.org/10.1007/s13258-014-0252-3>
- Sarla N, Bobba S, Siddiq EA (2003) ISSR and SSR markers based on AG and GA repeats delineate geographically diverse *Oryza nivara* accessions and reveal rare alleles. *Current Science* 84:683–690. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820183>
- Savas Tuna G, Baser I, Tuna M (2016) Morphological characterization of natural *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. populations collected from different geographical regions of Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*. https://doi.org/10.1501/tarimbil_00000001378
- Serrato-Capuchina A, Matute DR (2018) The Role of Transposable Elements in Speciation. *Genes*, 9:254. <https://doi.org/10.3390/genes9050254>
- Shannon CE (1997) The mathematical theory of communication. *MD Computing*. <https://doi.org/10.2307/410457>
- Somers DJ, Banks T, DePauw R, et al (2007) Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome*. <https://doi.org/10.1139/G07-031>
- Spellerberg IF, Fedor PJ (2003) A tribute to Claude-Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the “Shannon-Wiener” Index. *Global Ecology and Biogeography* 12:177–179. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.2003.00015.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stritt C, Gordon SP, Wicker T, et al (2018) Recent activity in expanding populations and purifying selection have shaped transposable element landscapes across natural accessions of the mediterranean grass *Brachypodium distachyon*. *Genome Biology and Evolution* 10:304–318. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx276>
- Tyagi P, Gore MA, Bowman DT, et al (2014) Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 127:283–295. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2217-3>
- Tyler L, Fangel JU, Fagerstrom AD, et al (2014) Selection and phenotypic characterization of a core collection of *Brachypodium distachyon* inbred lines. *BMC Plant Biology* 14:25. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-25>
- Tyler L, Lee SJ, Young ND, et al (2016) Population structure in the model grass *Brachypodium distachyon* is highly correlated with flowering differences across broad geographic areas. *Plant Genome* 9:. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.08.0074>
- Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, et al (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763–768. <https://doi.org/10.1038/nature08747>
- Vogel JP, Tuna M, Budak H, et al (2009) Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology* 9:88. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-88>
- Weir BS (2008) Linkage disequilibrium and association mapping. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:129–142. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164347>
- Whitt SR, Buckler ES (2003) Using natural allelic diversity to evaluate gene function. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 236:123–140. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:123>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8(12):973-982. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
- Wickham H (2011) *ggplot2*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- Wilson PB, Streich JC, Murray KD, et al (2019) Global diversity of the *Brachypodium* species complex as a resource for genome-wide association studies demonstrated for agronomic traits in response to climate. *Genetics* 211:317–331. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301589>
- Xu Jy, Zhu Y, Yi Z, et al (2018) Molecular diversity analysis of *Tetradium ruticarpum* (WuZhuYu) in China based on inter-primer binding site (iPBS) markers and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Chinese Journal of Natural Medicines* 16:1–9. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30024-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30024-4)



TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım ve tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sayın danışmanım Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ'a, ilgi ve destekleri için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca sorularıma cevap bulmak amacıyla beni sabırla dinleyen, yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Dr. Duygu ATEŞ'e ve

Akademik hedeflerim doğrultusunda kararlı bir şekilde yürümem için maddi ve manevi her türlü fırsatı sunan ve sevgisini esirgemeyen annem İlknur İNCE'ye, bana her zaman destek olan kardeşim Onur Çağlar GÜNER'e ve değerli arkadaşım Alkım GÜNDÜZ'e

İçtenlikle teşekkür ederim.

06 / 01 / 2021

Pınar GÜNER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı Soyadı : Pınar GÜNER

Uyruğu : T.C.

Doğum yeri : Antalya

Doğum tarihi : 01/11/1993

Telefon no. : 0507 573 3247

E-posta : pinarguner07@gmail.com

Eğitim :

Lise : Hacı Malike Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi, 2007-2011, Antalya

Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü,
2011-2016, İzmir

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim
Dalı, 2017-2020 İzmir