

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU/ORGAN SPESİFİK MİKROSATELLİT DNA GEN İÇERİKLERİNİN
CAPSICUM cDNA KÜTÜPHANELERİNDE *IN SILICO* VE *IN VITRO*
YAKLAŞIMLARLA BELİRLENMESİ**

AYŞE GÜL İNCE

**DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2010

**DOKU/ORGAN SPESİFİK MİKROSATELLİT DNA GEN İÇERİKLERİNİN
CAPSICUM cDNA KÜTÜPHANELERİNDE *IN SILICO* VE *IN VITRO*
YAKLAŞIMLARLA BELİRLENMESİ**

AYŞE GÜL İNCE

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**Bu tez, 2006.03.0121.006 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

Şubat 2010

ÖZET

DOKU/ORGAN SPESİFİK MİKROSATELLİT DNA GEN İÇERİKLERİNİN CAPSICUM cDNA KÜTÜPHANELERİNDE *IN SILICO* VE *IN VITRO* YAKLAŞIMLARLA BELİRLENMESİ

AYŞE GÜL İNCE

**Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS
Şubat 2010, 300 Sayfa**

Yaşamın en önemli molekülü olan DNA keşfedilmesinden sonra insanoğlunu yapısı ve fonksiyonuyla etkilemiştir. Günümüze değin genomik DNA ve mRNA'nın DNA formuna dönüştürülerek elde edilen cDNA'nın önemli bir bölümünün değişik motif ve tiplerde mikrosatellit DNA'dan oluştuğu bilinmektedir. DNA üzerinde bulunan bu ardışık tekrarlı DNA dizileri, ilk keşfedildiklerinde bazı bilim insanları tarafından işe yaramayan diziler olarak nitelendirilmişlerse de son yıllarda yapılan çalışmalarda bu dizilerdeki değişikliklerin özellikle insanda görülen sinir sistemi ile ilgili hastalıklarda etkin olduğu, diğer bazı organizmalarda da gen ifadesinde yer aldığı ve bazı durumlarda ise kodladığı protein üzerinde önemli etkileri olduğu gözlenmiştir. Günümüzde ardışık tekrarlı DNA ailesine dahil olan mikrosatellitler yaygın olarak genom karakterizasyonu ve gen haritalama çalışmalarında moleküler markır olarak kullanılmaktadır.

Bu tez kapsamında biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi model olarak kullanılarak, ardışık tekrarlı DNA dizilerinin (mikrosatellitlerin) doku, organ ve gelişme dönemlerindeki dağılımı ve fonksiyonu *in silico* ve *in vitro* yöntemler kullanılarak incelenmiştir. *In silico* analizler için 7 farklı doku veya gelişme dönemine ait 20738 ifade edilmiş gen dizileri (EST) içeren toplam 9.93 mega baz (Mb) nükleotit dizisi analiz edilmiştir. Yedi farklı cDNA kütüphanesinden elde edilen bu EST'ler kontig (devam eden dizi) analizine tabi tutularak aynı EST'ler uzaklaştırılmış ve biberde doku spesifik *in silico* veri tabanı oluşturulmuştur. Analizler sonucunda biber

bitkisinde genç kök, kılcal kök ve tomurcuk dokularında mikrosatellit içeriği istatistiksel olarak yüksek bulunurken, plasenta ve anter EST mikrosatellit içerikleri düşük bulunmuştur. Ayrıca organ, doku veya gelişme dönemlerinde mononükleotit, dinükleotit, trinükleotit, tetranükleotit, pentanükleotit ve hekzanükleotit tekrarlarının bulundurma sıklıklarının istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir. Doku ve organlar arasında mikrosatellit içeriklerinin farklılığı bu tekrarlı DNA dizilerinin fonksiyonel olduklarını ve gen regülasyonlarında önemli olduklarını işaret etmektedir.

In silico sonuçlarının teyidi amacıyla çalışmanın diğer aşamasında Gen Bankası (GenBank) EST verileri kullanılarak toplam 127 adet primer seti belirlenmiş ve AGi mikrosatellit primerleri olarak isimlendirilmiştir. Geliştirilen 127 AGi primer setinden 83 adeti genomik DNA ve tez kapsamında oluşturulan 16 farklı cDNA havuzu kullanılarak elde edilen ampikonların oluşturdukları amplifikasyon profillerine göre sınıflandırılmıştır. Araştırma sonucuna göre 83 primer seti TiP I, II, III, IV ve V olarak mikrosatellit ekspresyon profili (MEP) oluşturmuştur. MEP sınıflamasından farklı olarak mikrosatellitlerin üzerinde bulundukları genlere göre de sınıflandırma yapılmıştır. Çalışmanın bu evresinde kullanılan 83 primer setinin 60 adedinin (%72.29) elde edildikleri EST'lerin konstitütif (housekeeping) ekspresyon özellik gösterdiği, 23 adedinin (%27.71) ise doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre housekeeping genler üzerinde trinükleotit mikrosatellit motiflerinin en fazla olduğu belirlenirken, doku, organ ve gelişme dönemi spesifik genler üzerinde dinükleotit mikrosatellit motiflerinin en fazla olduğu saptanmıştır.

In silico ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde doku, organ ve gelişme dönemi spesifik mikrosatellit lokuslarının gen regülasyonunda önemli etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle doku spesifik genler üzerinde bulunan dinükleotit tekrar dizilerinde oluşabilecek değişiklik genin ekson bölgesinde yer alarak amino asit değişimine ve/veya kodon kaymasına neden olabildiği gibi oluşturduğu amino asit dizisinde kısalma veya artmalara neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak mikrosatellit tekrar polimorfizimlerinin fizyolojik ve

fenotipik etkilerin tam anlamıyla ortaya konması ve tekrar farklılıklarının etkilerinin belirlenebilmesi için daha fazla fizyolojik ve genetik çalışmaların yapılmasında yararlar vardır.

Çalışmanın diğer bir aşamasında ise geliştirilmiş olan 83 adet AGi mikrosatellit primer setinin farklı biber hat, çeşit ve türlerinde denenerek kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda AGi mikrosatellit primer setlerinin biber tür ve çeşitlerinde etkin bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir. Biber bitkisinin diğer bitkilerle kıyaslandığında var olan DNA markır sayısının az olması nedeni ile bu tez kapsamında geliştirilen mikrosatellit primer setlerinin biber bitki ıslahında genetik karakterizasyon ve markır destekli seçim çalışmalarında kullanılabileceği belirlenmiştir. Çalışmada belirlenmiş olan AGi primer setlerinin tamamının gen bölgelerinde bulunması nedeni ile bu primer setleri daha sonra yapılabilecek çalışmalarla fonksiyonel markır sistemlerine dönüştürülebilecektir.

ANAHTAR KELİMELEER: Biber, *Capsicum*, cDNA kütüphanesi, EST, *In silico*, *In vitro*, Mikrosatellit DNA

JÜRİ:

Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Mehmet KARACA

Yrd. Doç. Dr. Ersin POLAT

ABSTRACT

***IN VITRO* AND *IN SILICO* APPROACHES TO DETERMINE THE TISSUE/ORGAN SPECIFIC MICROSATELLITE DNA GENE CONTENTS IN *CAPSICUM* cDNA LIBRARIES**

AYŞE GÜL İNCE

**Ph. D. Thesis, Department of Horticulture
Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS
February 2010, 300 pages**

After its discovery, DNA, the most important molecule of the life, has influenced human being with its structure and functions. To date it is known that a significant portion of genomic and cDNA consist of repeating motifs of various sizes, varying from very short to very longer nucleotides called microsatellites. Although upon their discovery, these tandemly repeated DNAs were considered unimportant, recent studies indicated that changes in these sequences have related with some human neurological diseases and other studies revealed that some of these tandem repeats were in the transcribed region while some others were translated into the proteins in some organisms. At the present time microsatellites, a member of tandemly repeated DNAs, are commonly used as DNA markers in genome characterization and gene mapping studies.

In this dissertation distribution and function of tandemly repeated DNA (microsatellites) within and between organs, tissues and developmental stages were investigated based on *in vitro* and *in silico* approaches using pepper (*Capsicum annuum* L.) as a model plant. A total of 20738 expressed sequence tags (ESTs) consisting of 9.93 megabases (Mb) nucleotide information from 7 different tissues or developmental stages were analyzed using *in silico* approaches. ESTs from 7 different tissues or developmental stages were analyzed to obtain contigs (contiguous sequences) in order to remove those redundant ESTs and construction of *in silico*

tissue specific pepper database. Results indicated that EST microsatellite content of young root, hairy root and floral bud were statistically higher. EST microsatellite content of placenta and anther were statistically lower in comparison to other ESTs of tissue and developmental stages. In addition results clearly showed that mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide repeats statistically differed among the organ, tissue and developmental stages. Transcript content differences among the different libraries clearly indicated that microsatellite play important roles in gene regulations.

In order to confirm the findings of *in silico* studies, a total of 127 microsatellite primer pairs were designed using GenBank EST database. These primer pairs were called as AGi microsatellite primer pairs. Among the 127 primer pairs, 83 were used in amplification of genomic DNA and 16 different cDNA libraries developed in this study to classify microsatellites based on the amplification profiles called as microsatellite expression profiles (MEP). Results indicated that there existed at least five MEP types, called Type I, II, III, IV and V. In addition to MEP classification, microsatellites were also classified as housekeeping and tissue specific microsatellites. Results showed that among the ESTs, which were used to obtain 83 primer pairs, 60 (72.29%) were in those genes expressed constitutive (housekeeping genes) and 23 (27.71%) were on those ESTs showing differential expression among tissues, called as tissue specific genes. Further analyses indicated that genes containing trinucleotide repeats were preferentially present in those housekeeping genes while dinucleotide repeats were preferentially present in tissue specific genes.

In combined analyses of *in silico* and *in vitro* studies, results indicated that microsatellites play important roles in those organ, tissue and developmental stage specific genes. Further analyses revealed that microsatellite repeat variation in exonic regions could change the amino acid sequence, resulting in truncation on polypeptide chain or causing frame shift changes or in some cases silence mutations. Results obtained in the present study should be confirmed using physiologic and phenotypic variations within a plant species.

In another part of this study a total of 127 AGi microsatellite primer pairs were evaluated on different pepper lines and species. In comparison to other crop species, the number of DNA markers in pepper is limited. Thus new DNA markers developed for pepper will increase the application of DNA markers in pepper breeding studies including the gene mapping and genome characterization studies. Furthermore differing from other DNA markers, AGi primer pairs were specifically developed from the transcribed part of the genome, thus, they are very useful in the development of functional markers.

KEY WORDS: *Capsicum*, cDNA libraries, EST, *In silico*, *In vitro*, Microsatellites, Pepper

COMMITTEE:

Prof. Dr. A. Naci ONUS (Supervisor)

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARACA

Assist. Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖNSÖZ

DNA teknolojilerindeki özellikle yirminci yüzyılın son çeyreğinden itibaren meydana gelen yeni gelişmeler (DNA chips, protein chips, PCR chips ve otomasyonlar) genetik mühendisliği, biyomühendislik, farmakogenetik, biyoinformatik ve proteomik kavramlarının oluşumunu sağlamış ve genetik bilim dalını daha etkin bir konuma getirmiştir. Bu teknikler araştırmacıların, yenilebilir aşı üretimi, tarımsal önemi olan genlerin klonlanması, hastalık ve zararlılara karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesi, hem verim hem de kalite yönünden üstün niteliklere sahip bitkilerin üretilmesi gibi imkansız sanılan konularda başarılı çalışmalar yapmalarına olanak vermiştir.

Günümüzde altın çağını yaşayan biyoinformatiksel yaklaşımlar DNA, RNA, protein yapı ve fonksiyonlarının incelenmesinde, yeni genlerin bulunmasında veya transkripsiyon varyantlarının ve polimorfizmlerin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle DNA teknolojilerinde meydana gelen yeni gelişmeler, araştırmacıların oldukça fazla oranda DNA sekans verileri elde edebilmelerine imkan sunmuştur. Robotik otomasyon sistemlerinin kullanılmasıyla DNA sekanslama çalışmalarında bitki, hayvan ve diğer organizmalara ait milyonlarca DNA sekansı GenBank veri tabanında toplanmıştır. Bu verilerin %60 gibi büyük bir oranı “Expressed Sequence Tags” (ESTs)’lerden oluşmaktadır.

Bu tez çalışmasında biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi kullanılarak, ardışık tekrarlı DNA dizilerinin organ, doku ve gelişme dönemlerindeki dağılım ve fonksiyonları incelenmiştir. Ardışık tekrarlı DNA’lardan mikrosatellitlerin varlıklarının ve dağılımlarının organ, doku ve gelişme dönemlerinde farklılıklar gösterdiği *in silico* ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarla tespit ve teyit edilmiştir. Ayrıca organ, doku ve gelişme dönemlerine özgü mikrosatellit primer dizinleri geliştirilerek *Solanaceae* familyası bazında markır yardımıyla seleksiyon çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasına ait proje Prizma Laboratuvar Ürünleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. tarafından düzenlenen ve tüm Türkiye çapında organize edilen “Prizma Moleküler Biyoloji Proje Yarışması 2006” da “Üçüncülük Ödülü” almıştır.

Bu tez çalışması Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi ile Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarlarında ve deneme alanlarında 2006-2009 yılları arasında yürütülmüştür. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Danışman Hocam Sayın **Prof. Dr. A. Naci ONUS**’a gösterdiği destek ve yardımlardan dolayı içten teşekkür ederim. Üniversitemiz Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyeliği görevine başladığı günden itibaren her konuda yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmamın konusunun belirlenmesi de dahil olmak üzere her aşamasında etkin bir rol üstlenen Saygıdeğer Hocam **Doç. Dr. Mehmet KARACA**’ya sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca yoğun işlerinin arasında değerli katkıları için Sayın Jüri üyelerim **Prof. Dr. Kenan TURGUT** (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), **Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI** (İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) ve **Yrd. Doç. Dr. Ersin POLAT**’a (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın özellikle *in silico* aşamasında gerek desteği gerekse bilgisayar programlarıyla yardımcı olan Sayın Hocam **Doç. Dr. Mehmet BİLGİN**’e çok teşekkür ederim. Tez çalışmamın farklı aşamalarında desteklerini esirgemeyen **Dr. Ayşe GÜMÜŞ KARACA**’ya, **Dr. Nafiye ADAK**’a, **Arş Gör. Safnaz Y. ELMASULU**’ya, Yüksek Lisans öğrencisi **Fitnet YILDIZ**’a ve ayrıca bu çalışmanın gerçekleştirilmesine katkısı olan herkese teşekkür ederim.

Hayatımı paylaşabildiğim yıllar boyunca sözleriyle, duasıyla ve yürekten desteğiyle yanımda olan sevgili annem merhum **Ayşe İNCE**’ye sonsuz teşekkür ediyorum. Sevgili babam **İsmail İNCE**’ye ve bana yardımcı olan aile bireylerime desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	7
2.1. Mikrosatellit DNA	7
2.2. Mikrosatellitlerin Varlığı ve Dağılımı	10
2.3. Mikrosatellit Varyasyonlarının Genetik Etkileri	12
2.4. Mikrosatellitlerin Belirlenmesi	18
2.5. Biber Genomu ve Mikrosatellit İçeriği	20
2.6. DNA Markır Sistemleri.....	21
2.7. DNA Ekstraksiyon Yöntemleri	29
2.8. RNA Ekstraksiyon Yöntemleri	31
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. <i>In silico</i> Analizler	33
3.1.1. Kontig analizleri	33
3.1.2. Mini veri bankasının (MVB) oluşturulması	34
3.2. Düzenli Mikrosatellitlerin Belirlenmesi	35
3.3. Değişken Mikrosatellitlerin Belirlenmesi	36
3.4. <i>In silico</i> Veri Analizleri.....	36
3.4.1. MVB bulunan S, KS ve KO kalemlerin analizleri	36
3.4.1.1. Dokuya özgü ve diğer altı dokuda ortak mikrosatellitlerin frekans analizleri	36
3.4.1.2. Dokular arası mikrosatellit frekans analizleri	37
3.4.1.3. Dokuya özgü mikrosatellit frekans analizleri	37
3.4.2. Ki-Kare uygunluk testi ile mikrosatellit yoğunluğunun analizi	38
3.5. Mikrosatellit Primer Setlerinin Dizaynı	39
3.6. <i>In vitro</i> Analizleri	40
3.7. DNA Analizlerinde Kullanılan Bitki Materyalleri	40
3.8. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	42

3.8.1. Ekstraksiyon çözültisi	43
3.8.2. Lezyon çözültisi	44
3.9. DNA Ekstraksiyon Protokolü	47
3.10. DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	49
3.10.1. Spektrofotometrik yöntem	49
3.10.2. Agaroz jel elektroforesiz	50
3.11. Mikrosatellit DNA Analizleri	51
3.11.1. PZR	51
3.11.2. Amplifikasyonunda kullanılan PZR profilleri	52
3.11.3. Agaroz jel elektroforesiz	54
3.12. <i>In vitro</i> Veri Analizleri	54
3.13. RNA Analizleri	55
3.13.1. RNA ekstraksiyonunda kullanılan bitki materyalleri	55
3.13.2. RNA ekstraksiyonu	58
3.13.3. Ekstraksiyonda kullanılan kimyasallar ve stokları	58
3.13.4. MAGi RNA ekstraksiyon protokolü	60
3.14. DNaz I Uygulaması	62
3.15. RNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	62
3.15.1. Spektrofotometrik metot	62
3.15.2. Formamit-Agaroz jel elektroforesiz	62
3.15.3. TT-PZR (RT-PCR)	63
3.16. cDNA Sentezi İçin Gerekli Bileşenler	65
3.17. cDNA Sentez Protokolü	66
3.18. cDNA Agaroz Jel Elektroforesiz	67
3.19. cDNA Optimizasyonu	67
3.20. cDNA Mikrosatellit Analizleri	69
3.20.1. <i>Taq</i> DNA polimeraz cDNA-PZR (Bioron)	69
3.20.2. <i>Taq</i> DNA polimeraz cDNA-PZR (Fermentas)	70
3.20.3. <i>Pfu</i> DNA polimeraz cDNA-PZR (Fermentas)	70
3.21. cDNA-PZR Profilleri	70
3.22. cDNA-Mikrosatellit Agaroz Jel Elektroforesiz	70

3.23. Mikrosatellit Amplikonların Ekstraksiyonu ve Saflaştırma	71
3.24. Transformasyonda Kullanılan Bakteri ve Kültürü	72
3.24.1. Bakteri kaynağı	72
3.24.2. Luria Brouth sıvı bakteri kültür ortamı	73
3.24.4. Amfisilin stoğunun hazırlanması	73
3.24.5. İzopropil β tiogalaktopiranosid stoğunun hazırlanması	74
3.24.6. X-galaktoz stoğunun hazırlanması	74
3.24.7. Amfisilin-LB sıvı bakteri kültür ortamı	75
3.24.8. Amfisilin-LB katı bakteri kültür ortamı	75
3.24.9. Bakteri ana stoğu	76
3.25. Amplikonların Sekanslama Vektörüne Aktarılması	76
3.25.1. Ligasyon	78
3.25.2. Transformasyon ve protokolü	78
3.25.3. Rekombinant klonların analizi	80
3.26. Plazmit DNA Ekstraksiyonu	80
3.26.1. Kimyasallar ve çözeltiler	81
3.26.2. Plazmit DNA ekstraksiyon protokolü	81
3.27. Rekombinant Vektörlerin Teyidi	82
3.27.1. PZR yöntemi	82
3.27.2. Restriksiyon enzimleri (RE) ile kesim yöntemi	83
3.28. Amplikonların Sekans Analizleri	83
3.29. Sekans Verilerinin Analizi ve Mikrosatellit Ekspresyon Profilleri	84
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	88
4.1. EST Verilerinin Kontig Analizleri	89
4.2. Mini Veri Bankasının (MVB) Oluşturulması	91
4.3. MVB Düzenli Mikrosatellit Analizleri	96
4.3.1 Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz I)	96
4.3.1.1. Anter dokusuna özgü ve anter dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	96
4.3.1.2. Genç kök dokusuna özgü ve genç kök dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	97

4.3.1.3. Tomurcuk dokusuna özgü ve tomurcuk dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	98
4.3.1.4. Genç meyve dokusuna özgü ve genç meyve dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	99
4.3.1.5. Kılcal kök dokusuna özgü ve kılcal kök dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	99
4.3.1.6. Plasenta dokusuna özgü ve plasenta dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	100
4.3.1.7. Yaprak dokusuna özgü ve yaprak dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri	100
4.3.2. Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz II)	104
4.3.2.1. Anter dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	104
4.3.2.2. Genç kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	104
4.3.2.3. Tomurcuk dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	105
4.3.2.4. Genç meyve dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	106
4.3.2.5. Kılcal kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	106
4.3.2.6. Plasenta dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	107
4.3.2.7. Yaprak dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	108
4.3.3. Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz III)	111
4.3.3.1. Anter dokusu ile genç kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	111
4.3.3.2. Anter dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	111

4.3.3.3. Anter dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	112
4.3.3.4. Anter dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	112
4.3.3.5. Anter dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	113
4.3.3.6. Anter dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	113
4.3.3.7. Genç kök dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	117
4.3.3.8. Genç kök dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	117
4.3.3.9. Genç kök dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	117
4.3.3.10. Genç kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	118
4.3.3.11. Genç kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	118
4.3.3.12. Tomurcuk dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	119
4.3.3.13. Tomurcuk dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	119
4.3.3.14. Tomurcuk dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	120
4.3.3.15. Tomurcuk dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	120
4.3.3.16. Genç meyve dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	121
4.3.3.17. Genç meyve dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	121

4.3.3.18. Genç meyve dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	121
4.3.3.19. Kılcal kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	125
4.3.3.20. Kılcal kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	125
4.3.3.21. Plasenta dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri	125
4.4. MVB Değişken Mikrosatellit Analizleri	127
4.4.1 Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz I)	127
4.4.1.1. Anter dokusuna özgü ve anter dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	127
4.4.1.2. Genç kök dokusuna özgü ve genç kök dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	127
4.4.1.3. Tomurcuk dokusuna özgü ve tomurcuk dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	128
4.4.1.4. Genç meyve dokusuna özgü ve genç meyve dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	128
4.4.1.5. Kılcal kök dokusuna özgü ve kılcal kök dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	129
4.4.1.6. Plasenta dokusuna özgü ve plasenta dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	130
4.4.1.7. Yaprak dokusuna özgü ve yaprak dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri	130
4.4.2. Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz II)	133
4.4.2.1. Anter dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	133
4.4.2.2. Genç kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	133
4.4.2.3. Tomurcuk dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	134

4.4.2.4. Genç meyve dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	135
4.4.2.5. Kılcal kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	135
4.4.2.6. Plasenta dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	136
4.4.2.7. Yaprak dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	136
4.4.3. Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz III)	139
4.4.3.1. Anter dokusu ile genç kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	139
4.4.3.2. Anter dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	139
4.4.3.3. Anter dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	140
4.4.3.4. Anter dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	140
4.4.3.5. Anter dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	141
4.4.3.6. Anter dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	141
4.4.3.7. Genç kök dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	141
4.4.3.8. Genç kök dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	144
4.4.3.9. Genç kök dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	144
4.4.3.10. Genç kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	145
4.4.3.11. Genç kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	145

4.4.3.12. Tomurcuk dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	146
4.4.3.13. Tomurcuk dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	146
4.4.3.14. Tomurcuk dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	147
4.4.3.15. Tomurcuk dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	147
4.4.3.16. Genç meyve dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	148
4.4.3.17. Genç meyve dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	148
4.4.3.18. Genç meyve dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	149
4.4.3.19. Kılcal kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	149
4.4.3.20. Kılcal kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	150
4.4.3.21. Plasenta dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri	150
4.5. Düzenli ve Değişken Mikrosatellitlerin Karşılaştırılması	156
4.6. <i>In vitro</i> Analizlerinin Değerlendirilmesi	163
4.6.1. Genomik DNA izolasyonu ve normalleştirilmesi	163
4.6.2. Çalışmada kullanılan farklı biber hat ve çeşitleri, türleri ve diğer <i>Solanaceae</i> familyasına ait bitki materyalleri	167
4.7. Yeni Mikrosatellit Setlerinin (AGi) Geliştirilmesi	168
4.7.1. Optimum AGi amplifikasyon profillerinin belirlenmesi	168
4.7.2. AGi setlerinin oluşturduğu ampikonların belirlenmesi	169
4.8. Mikrosatellit Setlerinin <i>Solanaceae</i> Familyasına ait Bitkilerde ve Seçilmiş F ₁ , F ₂ Bireylerinde Uygulanması	180
4.9. AGi Mikrosatellit Primer Setlerinin Değerlendirilmesi	185

4.10. cDNA Kütüphanelerinin Oluşturulması	187
4.10.1. 16 farklı örnekte toplam RNA ekstraksiyon çalışmaları	187
4.10.2. RNA kalite ve kantitelerinin araştırılması	190
4.10.2.1. Spektrofotometrik yöntem	190
4.10.2.2. Formamit-Agaroz jel yöntemi	194
4.10.2.3. TT-PZR yöntemi	195
4.10.3. cDNA sentezi ve normalleştirilmesi	195
4.11. cDNA Kütüphanelerinin PZR Amplifikasyonu	198
4.12. Mikrosatellit Ekspresyon Profillerinin (MEP) Oluşturulması	199
4.12.1. MEP TiP I	199
4.12.1.1. MEP TiP IA	200
4.12.1.2. MEP TiP IB	201
4.12.1.3. MEP TiP IC	202
4.12.2. MEP TiP II	204
4.12.3. MEP TiP III	208
4.12.4. MEP TiP IV	211
4.12.4.1. MEP TiP IVA	212
4.12.4.2. MEP TiP IVB	214
4.12.5. MEP TiP V	217
4.12.5.1. MEP TiP VA	217
4.12.5.2. MEP TiP VB	222
4.13. MEP Grubu Amplikonların Sekans Analizleri	228
4.13.1. MEP grubu amplikonların klonlanması	228
4.13.2. MEP grubu amplikonların sekans dizilerinin belirlenmesi	231
4.14. MEP Grubu Amplikonların Karakterizasyonu	233
4.15. MEP Gruplarının Karakterizasyonu	247
4.15.1. Motifler yönünden MEP gruplarının incelenmesi	248
4.15.2. Mikrosatellit motiflerinin kodlayan ve kodlamayan (UTR) bölgelerde dağılımları	248
4.15.3. Mikrosatellit motiflerinin housekeeping ve doku spesifik gen bölgelerdeki dağılımları	251

4.15.4. Mikrosatellitlerin GenBank homolojilerine göre sınıflandırılması	253
4.15.4.1. MEP TiP I	254
4.15.4.2 MEP TiP II	258
4.15.4.3. MEP TiP III	260
4.15.4.4. MEP TiP IV	262
4.15.4.5. MEP TiP V	264
5. SONUÇ	272
6. KAYNAKLAR	277
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bç	Baz çifti
bp	Base pair
cM	Santimorgan (harita birimi)
dk	Dakika
E	Homoloji analizlerinde “Expectation value”
h/h	Hacim/hacim
g	Gram
kg	Kilogram
kb	Kilobaz
l	Litre
M	Molarite
Mb	Mega baz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolarite
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
P	Probability value (Olasılık değeri)
Pg	Pikogram
pH	Potentia hydrogeny
RPM	Round per minute (dakikada dönüş sayısı)
°C	Santigrad derece
w/v	Ağırlık/hacim
xg	Gravite
V	Volt
u	Ünite, belirli şartlar altında 1 mikromol substratı bir dakika sürüde ürüne dönüştüren enzim miktarı

Kısaltmalar

AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
BTSAP	Basit Tekrarlı Sekanslar Arası Polimorfizmi
BTSP	Mikrosatelit veya Basit Tekrar Sekansları Polimorfizmi
CAPS	“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”
cDNA	“Complementary DNA”
CTAB	“Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”
DAMD	“Directed Amplification of Minisatellite DNA”
DD	“Differential Display”
DDB	Devam Eden Diziler Bütünü
Df	“Degrees of Freedom”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”, Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
DSA	Doğrudan Sekans Analizleri
EDTA	“Ethylene di-amin Tetra Acetic Acid”
EST	“Expressed Sequence Tag”
ISSR	“Inter-Simple Sequence Repeat”
LINE	“Long Interspersed Nuclear Elements”
MA	Moleküler Ağırlık
MAS	Markıra Dayalı Seleksiyon
MBA	Moleküler Biyoloji Ayarı
MEP	Mikrosatellit Ekspresyon Profili
mRNA	“Messenger RNA”
MVB	Mini Veri Bankası
NaCl	Sodyum Klorür
NaOAc	Sodyum Asetat
PCR-RFLP	“Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism”
PMLSA	Polimorfik Mikrosatellit Lokuslarının Seçici Amplifikasyonu
PVPP	“Polyvinylpolypyrrolidone, Insoluble”
PZR-SKUP	Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kısım Uzunluk Polimorfizmi

QTL	“Quantitative Trait Loci”
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RÇDP	Rastlantısal Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	“Ribonucleic Acid”, Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
RNaz	Ribonükleaz
SAMPL	“Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci”
SCAR	“Sequence Characterized Amplified Region”
Sd	Serbestlik Derecesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SF	Seyreltme Faktörü
SINE	“Short Interspersed Nuclear Elements”
SIAP	Sekans İlişkili Amplifikasyon Polimorfizmi
SKEA	Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar
SKUP	Sınırlandırılmış Kısım Uzunluk Polimorfizmi
SLS	Sodyum Laruil Sarkosil
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SRAP	“Sequence-related Amplified Polymorphism”
SSAP	Sekans Spesifik Amplifikasyon Polimorfizmi
SSR	“Simple Sequence Repeat”
TD	Teksel Diziler
TE	TRIS-EDTA
TNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
TRAP	“Target Region Amplification Polymorphism”
TRIS	“Tris (hydroxymethyl) Aminomethane”
tRNA	Transfer RNA
TWEEN-20	“Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate”
TRITON X-100	“Octyl Phenol Ethoxylate”
UTR	“Untranslated Region”
VNTR	“Variable Number Tandem Repeats”

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Düzenli mikrosatellit	8
Şekil 2.2. Değişken mikrosatellit	9
Şekil 2.3. Bileşik (Compound) mikrosatellit	9
Şekil 2.4. Biber FA03 interspesifik haritalaması	27
Şekil 2.5. Biber AC99 interspesifik haritalaması	28
Şekil 3.1. Kontig analizleri ile konsensusların belirlenmesi	33
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bazı biyoinformatik yazılım programları	35
Şekil 3.3. Çalışmada mikrosatellitlere uygulanan analizlerin grafiksel gösterimi	37
Şekil 3.4. Demre Sivrisi (DS) biber çeşidinin yetiştirilmesi	42
Şekil 3.5. RNA ekstraksiyonunda kullanılan bitki materyalleri	57
Şekil 3.6. PZR çalışmalarından bir görünüm	69
Şekil 3.7. Agaroz jelden ampikonların klonlanması için izole edilmesi	72
Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan katı ve sıvı kültürlerin hazırlanması	73
Şekil 3.9. Kullanılan ligasyon ve transformasyon işlemlerinin şematik gösterimi	77
Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan pTZ57R/T vektörün genetik haritası	77
Şekil 3.11. Pozitif klonların PZR yöntemiyle belirlenmesi	83
Şekil 3.12. MEP TiP I grubu ekspresyon profillerinin şekilsel anlatımı	84
Şekil 3.13. MEP TiP II ve III gruplarında ekspresyon profillerinin gösterimi	85
Şekil 3.14. MEP TiP IV grubunda ekspresyon profillerinin gösterimi	86
Şekil 3.15. MEP TiP V grubunda ekspresyon profillerinin gösterimi	86
Şekil 3.16. Homoloji analizlerinde mikrosatellit varyasyonunun gösterilmesi	87
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan EST verilerinin organ, doku veya gelişme dönemlerine göre dağılımı	88
Şekil 4.2. Kontig analizleri ile EST'lerin yeniden sınıflandırılması	90
Şekil 4.3. MVB verilerinin şekilsel gösterimi	95
Şekil 4.4. Çalışmada kullanılan genomik DNA'ların agaroz jel elektroforesiz görüntüsü	164
Şekil 4.5. DNA kalite ve kantitesinin spektrofotometrik analizleri	165
Şekil 4.6. AGi mikrosatellit setlerinin amplifikasyon profillerinin belirlenmesi	169
Şekil 4.7. Bazı AGi mikrosatellit setlerinin ebeveynler ve F ₁ amplifikasyonları	180
Şekil 4.8. AGi primer setlerinin <i>Capsicum</i> türlerinde uygulaması	181

Şekil 4.9. İndirgemeli PZR profili ile çoğaltılan mikrosatellit lokusları (AGi)	184
Şekil 4.10. DNA markır sayısı ve genotip sayısı arasındaki ilişki	185
Şekil 4.11. MAGi RNA ekstraksiyon yöntemi işlemlerinden bir bölüm resmi	187
Şekil 4.12. MAGi RNA ekstraksiyonu	189
Şekil 4.13. Demre Sivrisine ait RNA'nın spektrofotometrik analizleri	191
Şekil 4.14. RNA'ların formamit agaroz jel elektroforesiz görüntüsü	194
Şekil 4.15. TT-PZR ve TTsiz- PZR agaroz jel elektroforesiz görüntüsü	195
Şekil 4.16. UBI-PZR agaroz jel elektroforesiz görüntüsü	196
Şekil 4.17. Çalışmada oluşturulan cDNA agaroz jel elektroforesiz resmi	197
Şekil 4.18. Farklı amplifikasyon enzim kaynaklarının karşılaştırılması	199
Şekil 4.19. AGi015-MEP 1A paterni	200
Şekil 4.20. AGi038-MEP IA paterni	201
Şekil 4.21. MEP TiP IB-AGi019	201
Şekil 4.22. MEP TiP IB-AGi028	202
Şekil 4.23. MEP TiP IC-AGi027	203
Şekil 4.24. MEP TiP II-AGi014	205
Şekil 4.25. MEP TiP II-AGi026	206
Şekil 4.26. AGi047 ve UBI primer seti ile internalli yapılan PZR	207
Şekil 4.27. MEP TiP II-AGi103	208
Şekil 4.28. MEP TiP III-AGi013	209
Şekil 4.29. MEP TiP III-AGi016	210
Şekil 4.30. MEP TiP IVA-AGi065	212
Şekil 4.31. MEP TiP IVA-AGi101	213
Şekil 4.32. MEP TiP IVB-AGi001	215
Şekil 4.33. MEP TiP IVB-AGi002	216
Şekil 4.34. MEP TiP VA-AGi010	218
Şekil 4.35. MEP TiP VA-AGi030	219
Şekil 4.36. MEP TiP VA-AGi039	220
Şekil 4.37. MEP TiP VA-AGi070	220
Şekil 4.38. MEP TiP VA-AGi078	221
Şekil 4.39. MEP TiP VA-AGi094	222
Şekil 4.40. MEP TiP VB-AGi041	223
Şekil 4.41. MEP TiP VB-AGi117	226

Şekil 4.42. MEP gruplarının klon amaçlı 4'lü PZR amplifikasyonları	228
Şekil 4.43. İnsert pozitif klonların mavi-beyaz analiz yöntemi ile seçimi	229
Şekil 4.44. MEP pozitif klonların PZR yöntemiyle teyit edilmesi	230
Şekil 4.45. MEP pozitif klonların RE kesim yöntemiyle teyit edilmesi	230
Şekil 4.46. Çalışmada kullanılan DNA sekans verilerinin kalitesinin gösterilmesi	232
Şekil 4.47. MEP TiP IB-AGi019 sekans analizi	234
Şekil 4.48. MEP TiP VA-AGi030 sekans analizi	238
Şekil 4.49. AGi013 amplikonların sekans karşılaştırması	240
Şekil 4.50. AGi016 primer seti amplikonlarının karakterizasyonu	242
Şekil 4.51. AGi064 primer setinin amplikonlarının sekans karakterizasyonu	244
Şekil 4.52. AGi070 amplikonların sekans karakterizasyonu	246
Şekil 4.53. Amino asit kodlayan ve UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitler	249

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ükelere göre biber üretim miktarları ve ekim alanları	1
Çizelge 2.1. Ardışık tekrarlı DNA dizi tipleri	8
Çizelge 2.2. Yaygın kullanılan DNA markır sistemleri ve özellikleri	22
Çizelge 3.1. DNA ekstraksiyon çözeltilisinin bileşimi	44
Çizelge 3.2. Lezyon çözeltilisi bileşimi	46
Çizelge 3.3. PZR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları	52
Çizelge 3.4. Amplifikasyon Profili A	52
Çizelge 3.5. Amplifikasyon Profili B	53
Çizelge 3.6. Amplifikasyon Profili C	53
Çizelge 3.7. RNA izolasyonu için kullanılan bitki doku ve gelişme dönemleri	56
Çizelge 3.8. TT-PZR’da kullanılan kimyasallar ve uygulama protokolü	64
Çizelge 3.9. TT-PZR Profili	65
Çizelge 3.10. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve protokolü	67
Çizelge 3.11. PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar	68
Çizelge 3.12. cDNA PZR profili	68
Çizelge 3.13. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan kimyasal konsantrasyonları	78
Çizelge 4.1. <i>Capsicum annuum</i> L. cDNA kütüphane verileri	89
Çizelge 4.2. <i>Capsicum</i> cDNA (EST) kütüphanelerinde kontig analiz sonuçları	91
Çizelge 4.3. Doku spesifik cDNA kütüphanelerinin yeniden yapılandırılması	93
Çizelge 4.4. Dokuya özgü ve dokular arası ortak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	102
Çizelge 4.5. Dokular arası düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	109
Çizelge 4.6. Anter ve genç kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	114
Çizelge 4.7. Anter ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	114
Çizelge 4.8. Anter ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	114
Çizelge 4.9. Anter ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	115
Çizelge 4.10. Anter ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	115

Çizelge 4.11. Anter ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	115
Çizelge 4.12. Genç kök ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	116
Çizelge 4.13. Genç kök ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	116
Çizelge 4.14. Genç kök ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	116
Çizelge 4.15. Genç kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	122
Çizelge 4.16. Genç kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	122
Çizelge 4.17. Tomurcuk ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	122
Çizelge 4.18. Tomurcuk ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	123
Çizelge 4.19. Tomurcuk ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	123
Çizelge 4.20. Tomurcuk ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	123
Çizelge 4.21. Genç meyve ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	124
Çizelge 4.22. Genç meyve ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	124
Çizelge 4.23. Genç meyve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	124
Çizelge 4.24. Kılcal kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	126
Çizelge 4.25. Kılcal kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	126
Çizelge 4.26. Plasenta ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	126
Çizelge 4.27. Dokuya özgü ve dokular arası ortak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	131
Çizelge 4.28. Dokular arası değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	137
Çizelge 4.29. Anter ve genç kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	142

Çizelge 4.30. Anter ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	142
Çizelge 4.31. Anter ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	142
Çizelge 4.32. Anter ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	143
Çizelge 4.33. Anter ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	143
Çizelge 4.34. Anter ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	143
Çizelge 4.35. Genç kök ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	151
Çizelge 4.36. Genç kök ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	151
Çizelge 4.37. Genç kök ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	151
Çizelge 4.38. Genç kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	152
Çizelge 4.39. Genç kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	152
Çizelge 4.40. Tomurcuk ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	152
Çizelge 4.41. Tomurcuk ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	153
Çizelge 4.42. Tomurcuk ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	153
Çizelge 4.43. Tomurcuk ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	153
Çizelge 4.44. Genç meyve ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	154
Çizelge 4.45. Genç meyve ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	154
Çizelge 4.46. Genç Meyve ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	154
Çizelge 4.47. Kılcal kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	155
Çizelge 4.48. Kılcal kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	155

Çizelge 4.49. Plasenta ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi	155
Çizelge 4.50. MVB verilerinin mikrosatellit analizleri	157
Çizelge 4.51. DNA örneklerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları	166
Çizelge 4.52. AGi mikrosatellit primer setleri ve amplifikasyon özellikleri	173
Çizelge 4. 53. Derme Sivrisi biber çeşidinde izole edilen RNA'nın kalite ve kantitesinin gösterilmesi	193
Çizelge 4.54. MEP göre mikrosatellit primer çiftlerinin dağılımı	227
Çizelge 4.55. MEP gruplarında mikrosatellit motif içerikleri	248
Çizelge 4.56. MEP gruplarındaki mikrosatellitlerin kodlayan ve kodlamayan (UTR) bölgelerine ait dağılımları	250
Çizelge 4.57. MEP gruplarındaki mikrosatellitlerin fonksiyonlarına (housekeeping ve doku spesifik) göre dağılımları	252
Çizelge 4.58. MEP grupları ve GenBank homoloji analizleri	268

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasının *Capsicum* cinsine dahil edilen biber (*Capsicum annuum* L.) subtropik ve tropik iklim bölgelerinde yetiştirilebilen önemli bir sebze, baharat ve endüstri bitkisidir (Lefebvre vd 2001). Biber gerek içerdiği besin ve mineral maddeler, gerekse de üretim alanı ve miktarı açısından ülkemiz tarımında büyük öneme sahiptir. Dünya biber üretimi 2008 yılı verilerine göre 27 877 849 ton iken, Türkiye biber üretim miktarı 1 796 180 ton olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 1.1). Türkiye, biber üretiminde Çin Halk Cumhuriyeti ve Meksika'dan sonra dünya genelinde 3. sırada yer almaktadır (Anonim 2009).

Çizelge 1.1. Ülkelere göre biber üretim miktarları ve ekim alanları

Ülkeler	Miktar (ton) *	Ülkeler	Alan (ha)
Çin Halk Cumhuriyeti	14 274 178	Çin Halk Cumhuriyeti	652 296
Meksika	2 054 968	Endonezya	202 712
Türkiye	1 796 180	Meksika	132 337
Endonezya	1 092 115	Nijerya	93 000
İspanya	1 059 500	Türkiye	88 000
Amerika Birleşik Devletleri	915 160	Etiyopya	83 293
Dünya	27 877 849		1 822 912

*: FAO 2008 yılı verileri kullanılmıştır

Biber arkeolojik verilere göre Güney ve Orta Amerika'da geçmişi en az M.Ö. 7000'li yıllara kadar uzanan ve en eski kültüre alınan bitki türlerinden biridir. *Capsicum* cinsine dahil edilen 27 tür bulunmaktadır (Pickersgill vd 1979, Onus ve Pickersgill 2004). Bu türlerden *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. ve *C. pubescens* R.&P'in kültürü yapılmaktadır. Kültüre alınmayan 22 yabani türün çoğunluğu Amerika'nın tropik bölgelerine endemiktir. Kültüre alınmış olan türlerden *C. chinense* Amazon, *C. baccatum* ve *C. pubescens* Peru ve Bolivia, *C. annuum* ve *C. frutescens* türlerinin ise Meksika ve Orta Amerika orijinli olduğu bilinmektedir. Bilimsel çalışmaların çoğunluğu ticari öneme sahip olan *C. annuum* L. türü üzerinde yoğunlaşmıştır (Pickersgil 1969, Basu ve Krishna 2003, Portis vd 2007, Ince vd 2009, Ince vd 2010a).

Biber meyvesinin kimyasal kompozisyonu incelendiği zaman en yüksek C vitamini olmak üzere A, B, E ve K vitaminlerini de içerdiği tespit edilmiştir. C vitamini (askorbik asit) konsantrasyonu çeşitlere bağlı olarak farklılık göstermesine rağmen genellikle 100 g taze biber meyvesinde 0.5 ile 3 mg arasında değişmektedir. Bu değer çoğu meyve türünde bulunan C vitamini miktarından daha yüksektir. Son yıllarda biber için kansere karşı koruyucu etkisi olan antioksidanların belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Capsicum* türlerinde karotenoidlerden kendine özgü bir şekilde “capsanthin” ve “capsorubin” bulunmaktadır. Acılık biber meyvesinin en önemli özelliği olarak öne çıkmaktadır. Sadece *Capsicum* cinsinde bulunan ve savunma mekanizmasında görev aldığı düşünülen kapsasinoitler (capsaicinoid) acılığa neden olan etkin maddeler olarak bilinmektedir. Biber türlerine ve çeşitlerine göre kapsinoit miktarı değişmekle birlikte bilinen en acı biber çeşitleri *C. chinense* türüne aittir (Zewdie ve Bosland 2001, Navarro vd 2006, Ogiso vd 2008).

Günümüze değin yapılan bilimsel çalışmalarda biber ıslah hedefleri arasında abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığın artırılması, meyve kalitesi ile ilgili kriterlerin iyileştirilmesi, taksonomik açıdan problemlili olan tür ve aksesyonların tanımlanması gibi kıstaslar yer almaktadır. Ayrıca biber meyve kalite özelliklerinden kapsikonoit ve karotenoit içeriği, antioksidan içeriği, vitaminler ve uzun raf ömürlülüğü yönünde de çalışmalar yapılmaktadır (Anonim 2006). Özellikle bazı hastalık ve zararlılara dayanıklı olan hatların geliştirilmesi son yıllarda yoğun olarak çalışmaların yürütüldüğü bir alandır.

Belirtilen bu ıslah hedeflerine ulaşmak amacıyla araştırmacılar son yıllarda DNA yöntemleri üzerine yoğunlaşmış ve yapılan çalışmalarda biberde genetik haritalama, bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin belirlenmesi, kapsikonoit ve karotenoit içeriği gibi kriterler yönünden ileri düzeyde bilgiler kazanılmıştır (Blum vd 2003, Rao vd 2003, Ben-Chaim vd 2006).

DNA teknolojilerindeki yeni gelişmeler örneğin çip (chips) teknolojileri, RNA interferans (RNAi), nanoteknolojik uygulamalar gen veya genetik mühendisliği, biyomühendislik, farmakogenetik, biyoinformatik, genomik, transkriptomik ve

proteomik kavramlarının oluşumunu sağlamıştır. Bu gelişmeler genetik bilim dalını daha etkin bir konuma getirerek, tarım konusunda çalışan araştırmacıların, yenilebilir aşı üretimi, agronomik genlerin klonlanması, hastalık ve zararlılara karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesi, hem verim hem de kalite yönünden üstün niteliklere sahip bitkilerin üretilmesi gibi geleneksel bitki ıslahında imkansız sanılan konularda başarılı çalışmalar yapmalarına olanak vermiştir.

DNA, RNA, protein yapı ve fonksiyonlarının incelenmesinde, yeni genlerin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılan biyoinformatiksel yaklaşımlar günümüzde altın çağını yaşamaktadır. DNA teknolojilerindeki gelişmeler diğer taraftan özellikle tıp alanında da önemli düzeyde yenilikler getirerek hekimlik alanına önemli katkılar sağlamaktadır.

Günümüzde bakteri genom sekansının 15 saniyede ve insan genom sekansının 15 dakikada tamamlanmasını sağlayacak teknolojilerin varlığından söz edilmektedir. Sekanslama alanındaki bu hızlı gelişmelere paralel olarak GenBank veri tabanında organizmalara ait bütün genom dizileri, kromozom DNA dizileri ve çok sayıda EST (İfade Edilmiş Diziler: “Expressed Sequence Tags”) verileri bulunmaktadır. “National Center for Biotechnology Information” (GenBank: NCBI) verilerine göre, DNA dizi bilgileri 2006 yılında yaklaşık yüz milyar nükleotit dizisi iken 2010 yılının ilk verilerine göre 148 165 117 763 nükleotit dizisine ulaşmıştır (Anonim 2010).

İfade edilmiş diziler (EST) genelde 300 ile 600 nükleotit uzunluğunda tek bir parça halindeki mRNA’dan komplementer DNA (cDNA) formuna çevrilerek elde edilen DNA sekanslarıdır. EST’ler, elde edildikleri organizmaların belirli hücre veya dokularında ve belirli bir zamanda ifade edilmiş gen veya gen gruplarını temsil etmektedir. EST’lerin diğer bir özelliği ise elde edilişlerinin ekonomik olması ve bir veri tabanında toplanarak dünya genelindeki bilim insanlarına açık olmasıdır.

Organizmalara ait genomlar incelendiğinde ardışık ve ardışık olmayan DNA kısımlarının var olduğu görülmektedir. Özellikle ökaryotik organizmalarda kromozom paketlenmesinde, kromozom uç bölgelerinin korunmasında ve metafaz

safhasında kardeş kromatitleri bir arada tutan DNA bölgelerinde bulunan tekrarlı DNA dizilerinin yanı sıra bütün bir genom boyunca dağılmış ve genellikle 2 ile 6 nükleotit uzunluğunda (motif) bulunan mikrosatellit veya basit ardışık tekrarlı DNA dizileri bulunmaktadır. Bu DNA dizilerinin fonksiyonel olup olmadıkları tartışması özellikle insanda mikrosatellit DNA varyasyonunun önemli sinir hastalıklarına neden olmasının belirlenmesi ile son bulmuştur. Araştırmalarda mikrosatellit DNA'ların genelde promotör, intergenik ve bazı durumlarda genin fiziksel yapısında bulundukları ve gen ifadelerinde (ekspresyonlarında) görev aldıkları belirlenmiştir. Mikrosatellit DNA üzerinde meydana gelen varyasyonların *in silico* yaklaşımlarla incelenmesi ile:

- i) Genin 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin gen transkripsiyonu ve translasyonunu etkilediği,
- ii) Genin kodlayan bölgelerinde bulunan mikrosatellitlerde meydana gelen varyasyonun genin aktivasyonunu arttırdığı ya da inaktivasyonuna neden olduğu,
- iii) Genin 3'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerde meydana gelen değişikliğin geni susturduğu (fonksiyonunu durdurduğu) ya da transkripsiyonun akışını etkileyerek transkripsiyonun etkinliğini azalttığı görülmüştür.

Mikrosatellitlerle ilgili yapılan çalışmalarda mikrosatellitlerin organizmaların farklı dokularında veya farklı gelişme dönemlerinde bulunma sıklıkları ve içerikleri konusunda *in vitro* koşullarda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ancak mikrosatellitler günümüzde en çok kullanılan DNA markır sistemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Mikrosatellitlerin DNA markır sistemi dışında çalışılmamış olmasının temel nedenlerinden biri mikrosatellit alanını (domain) çevreleyen primer çiftlerinin geliştirilmesinin uzun zaman alması ve her organizmaya özgü primer çiftlerinin dizayn edilmesinin zorunluluğudur. Mikrosatellit primer çiftlerinin geliştirilmesinde organ, doku ve gelişme dönemlerine ait kütüphanelerin oluşturulmamış olması ise

diğer bir nedendir. Çoğu bitkide organ ve dokuya ait cDNA kütüphaneleri kolay bir şekilde oluşturulabilirken doku veya organlara ait gelişme dönemlerine özgü cDNA kütüphanelerinin oluşturulması zordur. Bunun en büyük nedeni bir bitki üzerinde bulunan değişik doku veya organların farklı gelişme döneminde bulunmasıdır. Bu nedenle bilim insanları genom çalışmalarını model bitki veya hayvanlar üzerinde sürdürmektedir. Ancak bu durum ekonomik önemi olan organizmalardaki çalışmaları kısıtlamaktadır. Örneğin *Arabidopsis* uzun süredir model bitki olarak kullanılmış olmasına rağmen elde edilen bilgilerin kültür bitkilerine aktarılması uzun zaman almaktadır. Bu nedenle temel çalışmalarında kültür bitkilerinde yapılması önemlilik göstermektedir.

Bu tez kapsamında model bitki olarak ülkemiz sebze üretiminde önemli bir yere sahip olan biber ve ulusal bir kaynak olan Demre Sivrisi biber çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada biber bitkisinin kullanılmasının diğer nedenleri ise aşağıda sıralanmıştır.

- i) Organ, doku ve gelişme dönemlerinin belirlenmesinin kolay olması, örneğin belirli bir dönemde alınmış olan bir meyvede aynı dönemde bulunan perikarp, plasenta, kaliks ve tohumların aynı gelişme döneminde bulunması ile senkronizasyona gerek duyulmaması,
- ii) Biber genomunun diploit ve göreceli olarak küçük olması yanı sıra B tipi kromozomlarının bulunmaması,
- iii) Ekonomik önemi nedeni ile elde edilecek bilgilerin doğrudan üretime veya ıslah çalışmalarına yansması,
- iv) GenBank verilerinde bulunan biber EST dizilerinin diğer bazı bitkilerle karşılaştırıldığında fazlalığı,
- v) Biber bitkisinin diğer kültür bitkileri ile kıyaslandığında var olan DNA markır sayısının az olması nedeni ile bu tez kapsamında geliştirilen mikrosatellit primer setlerinin biber bitki ıslahında genetik karakterizasyon ve markır destekli seçim çalışmalarında kullanılabilmesi,
- vi) *Solanaceae* familyasının önemli bir üyesi olan biberin (*Capsicum annuum* L.) aralarında patates (*Solanum tuberosum* L.), domates

(*Lycopersicon esculentum* veya yeni adıyla *Solanum lycopersicum* L.), ağaç tipi domates (*Solanum betaceum* Cav.), patlıcan (*Solanum melongena* L.), Afrika patlıcanı (*Solanum macrocarpon* L.), çilek domatesi (*Physalis pruinosa* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), güzel avrat otu (*Atropa belladonna* L.), tatula (*Datura stramonium* L.) ve petunya (*Petunia hybrida* (Hook.) Vilm) gibi önemli bitkilerle genetik düzeyde benzerlik göstermesi (Knapp 2002, Hunziker 2001) nedeni ile elde edilen bilgilerin *Solanaceae* familyasının diğer üyelerinde kullanılma şansının yüksek olması olarak sıralanabilen nedenler bulunmaktadır.

Çalışmada GenBank veri tabanından elde edilen yedi farklı EST kütüphanesinden (kılcal kök, genç kök, yaprak, tomurcuk, genç meyve, plasenta ve anter) elde edilen veriler *in silico* yaklaşımlarla incelenmiştir. Demre Sivrisi biber çeşidi kullanılarak 16 farklı organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü cDNA kütüphaneleri (perikarp, plasenta, yaprak, tomurcuk, çiçek, kök, sap, tohum ve bunların değişik gelişme dönemlerinden oluşturulmuş) oluşturulmuş ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmanın amaçları arasında:

- i) Gen karakterizasyonlarında kullanılabilecek *in silico* veri tabanının oluşturulması,
- ii) Organ, doku ve gelişme dönemlerine ait EST veya cDNA kütüphanelerinden yararlanarak mikrosatellitlerin frekansları (sıklığı), dağılımları ve fonksiyonlarına ait bilgiler elde edilmesi,
- iii) Mikrosatellitlerin ekspresyon profillerine (MEP) göre sınıflandırılması ve fonksiyonlarının belirlenmesi,
- iv) Biber bitkisinde sınırlı olan mikrosatellit markır sayısını artırmak üzere yeni mikrosatellit primer çiftlerinin (AGi primer setlerinin) geliştirilmesi yer almaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Mikrosatellit DNA

DNA dizileri incelendiğinde özellikle ökaryotik genomlarda bulunan ve çoğunlukla heterokromatin yapıda olan ancak tam ardışıklık göstermeyen “LINE”, “SINE”, “*Alu*” elementleri dışında hem heterokromatin hem de ökromatin yapısal özelliği olan mikrosatellit ve minisatellit DNA elementleri önemlilik arz etmektedir. Tekrarlı DNA dizileri keşfedilmelerinin ardından işe yaramayan DNA dizileri olarak nitelendirilmişlerse de bu diziler özellikle bazı insan hastalıkları ile (örneğin “Huntingtin”, “Junctophilin-3”, “Ataxin”, “Machado-Joeeph” ve “Haw River” sendromu gibi) ilgili olmaları nedeniyle son yıllarda bilim insanlarının dikkatlerini toplamıştır (Gacy vd 1995, Karlin ve Burge 1996, Lalioti vd 1997, Wren vd 2000, Yamada vd 2002, Fondon vd 2008).

Mikrosatellit DNA’nın çalışılan bütün organizmalarda saptanmış olması bilim insanlarını mikrosatellitlerin varlık nedenlerinin araştırılmasına yöneltmiştir. Mikrosatellitlerin ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda bulunma nedenleri günümüze değin tam anlamıyla ortaya konulamamıştır. Levinson ve Gutman (1987) mikrosatellit varyasyonunun DNA replikasyonu (DNA eşlemesi) sırasında DNA polimeraz enziminin “strand slippage” olarak da bilinen sentezleme sırasında geriye kayarak yeni nükleotitleri eklemesi hatası yanında düzensiz rekombinasyon veya bu iki olayın her ikisinin birden gerçekleşmesi sonucu tekrar dizi sayılarının azalması veya artması şeklinde oluştukları fikrini ileri sürmüşlerdir.

Mikrosatellit DNA alanlarında (“domain”) tekrarlanan nükleotit tipine, motif uzunluklarına göre değişik mikrosatellitlerin varlığı son 20 yıldır moleküler temelde bilinmektedir. Tekrar eden motif uzunluğu 2 ile 6 arasında olan ve genellikle en az 10 kez tekrarlanan DNA sekansları mikrosatellit veya basit tekrarlı sekanslar (“Simple Sequence Repeats, SSRs”) olarak bilinirken, tekrar eden motif sayıları 6 ve üzerinde olan ve tekrar dizilerinde tek düzelik göstermeyen DNA’lar ise minisatellit DNA olarak nitelendirilmektedir. Tekrarlı DNA’lar mikrosatellit ve minisatellit dışında da değişik isimler altında gruplandırılmakta (Karaca ve Ince 2008) olup bunlar Çizelge

2.1’de gösterilmiştir. Çizelge 2.1’de gösterildiği gibi tekrar içeren DNA’lar, uzunluklarına, tekrar eden nükleotit sayısına (ünitesine), genomda bulundukları lokasyona ve biyolojik fonksiyonlarına göre değişik adlar altında toplanabilmektedir. Satellit ve midisatellit DNA’lar daha çok kromozomların yapısı ile ilgili bölgelerde bulunurken minisatellit ve mikrosatellit DNA’lar bütün bir genomda dağılmış ve gen ifadesine (ekspresyona) katkı sağlayabilecek genom alanlarında yer almaktadır.

<i>DNA Tipi</i>	<i>Satellit</i>	<i>Midisatellit</i>	<i>Minisatellit</i>	<i>Mikrosatellit</i>	<i>Nanosatellit</i>
Uzunluk	>100 kb	<100 kb	>100 bp	>6 bp	1 bp
Motif ünitesi	>5	>5	7-50	2-6	1
Lokasyon	Sentro- & Telo-merik Heterokromatin		Genom boyunca, Heterokromatin, Ökromatin		
Biyolojik Fonksiyonları	Kromozom uçlarının korunması, Kromozom eşleşmesi, Hücre yaşlanması		Gen ifadesi (intron & ekson)		

AGGTGGCTTAAAGAGCAAAAACACAAAGCCCTAGGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA

Değişken mikrosatellit dizilerinde ise mikrosatellit motifi içeriğinde tekrar eden nükleotit diziliminde tekrar sayısı boyunca nükleotit değişimleri olarak insersiyon ve delesyon (indel) meydana gelmektedir. Bu tip mikrosatellitlerde tekrar sayılarının korunması nedeni ile PZR çalışmalarında allel farklılığı belirlenememektedir (Karaca vd 2005a) (Şekil 2.2).

**AGGTGGCTTAAAGAGCAAAACACAAAGCCCTAGGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAAGAAGAA**CAT**GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAA
ACCAACTTTGTATGCTAGAAGGAATATATTGAAGTAATGCCGGTCTGA**

Şekil 2.2. Değişken mikrosatellit. Şekilde düzenli trinükleotit [GAA] mikrosatelliti [CAT] nükleotitlerinin eklenmesi ile değişken trinükleotit mikrosatellitine dönüşmüştür

Bileşik (“compound”) mikrosatellit dizileri ise ardı ardına birden fazla sayıda farklı düzenli veya değişken mikrosatellit DNA motifleri bulunması halinde oluşan bir mikrosatellit tipidir. Bu tip mikrosatellitler düzenli bileşik (Şekil 2.3) veya değişken bileşik mikrosatellitler olarak iki alt bölüme ayrılabilir. Bileşik mikrosatellitlerin transkripsiyonu ve translasyonu ile oluşturulan amino asit dizileri özellikle DNA protein interaksiyonlarında önemli olabileceği düşünülmektedir (Karaca vd 2005a).

CGTAGAACTAAAATTACAGAGAAAAAAAAAACTAAAAATGCATTTT**
TATTTT**TATTTT**TATTTT**TATTTT**CACACACACACACACACACACACACA
CACACA**AAGGAA**CACGAGGATGAGCTAGCTTACCAGGAGGGAAAAG**

Şekil 2.3. Bileşik (Compound) mikrosatellit. Şekildeki motif [ATTTTT] tekrarı 4 kez ve [CA] tekrarı ise 17 kez tekrarlanarak düzenli bileşik mikrosatelliti oluşturmuştur

Genomik DNA üzerinde bulunan mikrosatellitlerin ve minisatellitlerin varyasyon oranları karşılaştırıldığında minisatellit DNA sekanslarının mutasyon oranı genellikle yüzbinde bir ile milyonda bir (10^{-5} - 10^{-6}) arasında değişmekte olup bu mutasyon minisatellit DNA sekanslarında genelde tekrar sayısının azalması veya artması şeklinde gerçekleşmektedir (Jeffreys vd 1985, Wright 1994). Bu değişim genel olarak “variable number of tandem repeats (VNTR)” olarak da bilinmektedir.

Mikrosatellitlerin mutasyon oranları ise minisatellitlerden oldukça yüksek olup genellikle yüzde bir ile binde bir (10^{-2} - 10^{-3}) oranları arasında değişmektedir (Jeffreys vd 1985, Wright 1994). Mikrosatellitlerin tersine, minisatellitlerin genomda dağılımları belirli bölgelerde örneğin telomer veya sentromer bölgelerinde toplanmıştır. Bu nedenle mikrosatellit mutasyonu ile fenotipik etkilerin ortaya çıkma şansı minisatellitlere oranla daha yüksektir.

2.2. Mikrosatellitlerin Varlığı ve Dağılımı

Aralarında Schlotterer ve Wiehe (1999)'nin de bulunduğu çok sayıda araştırmacı mikrosatellitlerin genomda dağılımının rastgele olduğu veya büyük olasılıkla rastgelelik gösterdiğini ileri sürmelerine rağmen yapılan yeni çalışmalarda araştırmacılar mikrosatellitlerin genom içerisinde ve genomlar arasında farklılık (frekans farklılıkları) gösterdiğini tespit etmişlerdir (Hamada vd 1982, Casacuberta vd 2000, Morgante vd 2002, Zhang vd 2004).

Farklı bitki genomları mikrosatellit içerikleri (mikrosatellit motif nükleotit dizilimi) yönünden analiz edildiğinde Varshney vd (2005) buğdaygillerde en yaygın %54-78 oranında trinükleotit mikrosatellit motiflerinin bulunduğunu bunu %17.1-40.4 ile dinükleotitlerin takip ettiğini tetranükleotitlerin ise %3-6 oranları arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Trinükleotit mikrosatellit motiflerinin bulunma frekansları incelendiğinde [AAG] mikrosatellit motifi farekulağı bitkisi [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh] ve asmada (*Vitis vinifera* L.) sırasıyla %28.3 ve %42.1 iken buğdaygillerde en yaygın mikrosatellit motifi [CCG] olarak saptanmıştır. Buğdayda (*Triticum vulgare* L.) %32, sorgumda [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] %49 (Varshney vd 2002, Thiel vd 2003) ve şeker kamışında (*Saccharum officinarum* L.) ise %39.3 (Cordeiro vd 2001) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca trinükleotit mikrosatellit motiflerinin genellikle mantar, memeliler ve omurgasız organizma genomlarında da yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Toth vd 2000, Morgante vd 2002).

Tek bir bitki genomunda mikrosatellitlerin dağılımını araştırmak için Zhang vd (2004) *Arabidopsis* genomu sekans verilerini kullanmışlar ve kromozomları mikrosatellit frekansları yönünden karşılaştırdıklarında mikrosatellit frekansı kromozom 11 üzerinde 1.52 mikrosatellit/Mb oranıyla bulunurken kromozom 12 üzerinde 0.89/Mb, kromozom 3 üzerinde ise 0.25/Mb olarak saptamışlardır. Benzer şekilde McNeil vd (2008) insan (*Homo sapiens sapiens*) genomu üzerinde yaptıkları çalışmalarında kromozomlar üzerinde mikrosatellitlerin rastgele dağılım göstermediğini tespit etmişlerdir. Bu veriler genom içerisinde mikrosatellitlerin rastlantısal dağılmadığını göstermektedir.

Çeltik (*Oryza sativa* L.) ve *Arabidopsis* genomu üzerinde Lawson ve Zhang (2006) yaptıkları araştırmada her iki organizmanın da farklı genik bölgelerindeki (transkripsiyona alınan) mikrosatellit yoğunluğunun farklılık gösterdiğini ve 5'-UTR bölgelerinde, ekson, intron ve 3'-UTR bölgelerine oranla daha fazla mikrosatellit bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca her iki genomda da genlerin 5'-UTR bölgelerinde trinükleotit tekrar yoğunluğunun diğer bölgelere oranla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *Arabidopsis* genomunda en çok görülen mikrosatellit motifi mononükleotitler olarak belirlenirken çeltikte trinükleotit motif yoğunluğunun *Arabidopsis*'e göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Her iki bitkide de en fazla yaygın olan mononükleotit mikrosatellit motifi [A/T] iken, dinükleotit mikrosatellit motiflerinden [AG]'nin diğer dinükleotitlere göre daha yüksek oranda bulunduğu ve geri kalan mikrosatellit motiflerinin ise oldukça düşük düzeyde kaldığı bildirilmiştir.

Genler üzerinde mikrosatellitlerin varoluşu karşılaştırıldığı zaman 5'-UTR bölgelerinde basit tekrarlı dizilerin diğer bölgelere oranla daha sık tekrar ettiği belirlenmiştir. Bu gözlem en iyi çeltikte yapılan bir araştırmada [CCG] mikrosatellit motifinin genlerin 5'-UTR bölgelerinde tüm genomik bölgelere göre daha yüksek bir oranda bulunması ile kanıtlanmıştır. İçlerinde *Arabidopsis*, çeltik, soya [*Glycine max* (L.) Merr.], mısır (*Zea mays* L.) ve buğdayında bulunduğu 6 bitki türünden toplamda 25762 adet protein kodlayan ve kodlamayan bölgeleri de ihtiva eden sekans içerisinde mikrosatellit tiplerinden trinükleotit ve hekzanükleotitler haricinde kalan bütün motiflerin önemli derecede az bulundukları vurgulanmıştır (Toth vd 2000, Morgante vd 2002).

Protein kodlayan bölgelerde bazı nükleotit kompozisyonlarında mikrosatellitlerin varlığı günümüze değin yapılan çalışmalarda dikkat çekmektedir. İnsan genomunda 45425 adet protein kodlayan sekans üzerinde bulunan toplam mikrosatellit motifleri içerisinde [A/T] tekrar içeriği oranı %11.8 iken [G/C] tekrar içeriği oranı %0.7 olarak belirlenmiştir (Olivero vd 2003). *Arabidopsis* ve buğdaygillerde bulunan EST'ler üzerindeki eksonlarda [GC/CT] içeriğinin [AT] içeriğinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Morgante vd 2002, Kantety vd 2002). Yu vd (2004) buğday ve çeltik

bitkisinde yaptıkları çalışmalarında trinükleotitlerin protein kodlayan bölgelerde %74, 5'-UTR bölgelerinde %20 ve 3'-UTR bölgelerinde ise %6 oranlarında bulunduğunu belirlemişlerdir. Dinükleotit mikrosatellit motiflerinin oranını ise protein kodlayan bölgelerde %19 olarak belirlerken 5'-UTR bölgelerinde %42 ve 3'-UTR bölgelerinde ise %39 olarak tespit etmişlerdir (Yu vd 2004).

Arabidopsis genomunda protein kodlayan genlerin 5'-UTR bölgesinde en yaygın dinükleotit mikrosatellit motifinin [AG/CT] olduğu belirlenmiştir (Morgante vd 2002). İnsanda ise aynı mikrosatellit motifinin incelendiği 44 mikrosatellit içerisinde %52.3'lük bir oranla genlerin 3'-UTR bölgesinde daha yaygın olduğu saptanmıştır (Wren vd 2000). İnsan genomunda genlerin 3'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerden [A/T] oranı tüm mikrosatellit motifleri içerisinde %27, [G/C] oranı ise %0.7 olarak tespit edilmiştir (Olivero vd 2003). Trinükleotit mikrosatellit motiflerinin ise insan genomunda genlerin 5'-UTR bölgelerinde %31.1 oranıyla bulunurken 3'-UTR bölgelerine %4.6 oranında bulunduğu belirlenmiştir (Wren vd 2000). Trinükleotit mikrosatellit motiflerinin farklı bitki genomlarında ise *Arabidopsis* genlerinin 5'-UTR bölgelerinde %51.4, 3'-UTR bölgelerinde %33.4 (Morgante vd 2002), arpa (*Hordeum vulgare* L.) genomunda bulunan genlerin 5'-UTR bölgelerinde %67 ve 3'-UTR bölgelerinde %26 oranlarında (Thiel vd 2003) bulunduğu tespit edilmiştir.

2.3. Mikrosatellit Varyasyonlarının Genetik Etkileri

Mikrosatellitlerin genomik düzeyde rastgele dağılım göstermediği, varlıklarıyla kromatin organizasyonu, gen regülasyonu, rekombinasyon, DNA replikasyonu, hücre döngüsü ve “mismatch” onarımı [“DNA mismatch repair” (MMR)] gibi olayların düzenlenmesinde etkin rol oynadıklarına dair görüşler *in silico* analiz verilerinin incelenmesi ile yaygınlaşmaktadır.

Mikrosatellitlerin genomda dağılımları (ökromatin veya heterokromatin) ve genler üzerinde (promotör, ekson, intron, 5'-UTR, 3'-UTR veya diğer regülatörler) bulunmalarına bağlı olarak değişik fonksiyonlara sahip oldukları öngörülmüştür. Mikrosatellitlerin evrimsel süreçte görev aldıkları, bazı metabolik enzimler ile yapısal

ve depolama proteinlerinin üretiminde de etkili oldukları düşünülmektedir. Ayrıca transkripsiyon faktörlerinin üretimi ve hastalık sinyalleri üzerinde önemli roller üstlendikleri savunulmaktadır (Tautz ve Renz 1984, Epplen vd 1996, Schlotterer ve Wiehe 1999, Timchenko ve Caskey 1999, Hile vd 2000, Li vd 2002, Raman vd 2006).

Genlerin promotör bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin tekrar sayılarının artması ya da azalması dışında oluşan değişiklikler epigenetik sonuçlar doğurabilmektedir. Özellikle genin promotör bölgesinde bulunan [GG], [CC], [CCG], [GCC] mikrosatellit motifleri metilasyona ve konformasyonel değişikliklere neden olarak epigenetik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Mikrosatellitlerin fonksiyonel rolleri bulundukları bölgede etkili olabileceği gibi lokuslar arası interaksiyonlar ile (DNA-DNA interaksiyonları) organizmanın fenotipinde de değişikliklere neden olabilmektedir (Akai vd 1999, Li vd 2004). Genomda bulunan mikrosatellit varyasyonlarını inceleyen Fondon ve Garner (2004) evcilleştirilen köpeklerde (*Canis lupus*) *Alx-4* ve *Runx-2* genlerinin protein kodlayan bölgelerinde bulunan mikrosatellit motifinin azalması veya artmasının hızlı bir şekilde morfolojik evrime neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

Duval vd (2000) tarafından yapılan bir çalışmada insanda DNA üzerinde hatalı eşleşmeleri düzeltme işlemi yapan MMR geni onyedinci eksonu üzerinde bulunan [A]₉ tekrar sayısında meydana gelen 1 bp'lik bir azalma nedeniyle kodon kayması meydana geldiği belirtilmiştir. [A]₉ mononükleotit mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen azalma C-terminal bağlanma proteininin (TCF) transkripsiyon aktivitesini önleyerek elde edilen proteinin kısalmasına sebep olmaktadır. Oluşan yeni kısa proteinin kolorektal kanser oluşumu ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Duval vd 2000).

Genlerin 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin gen ekspresyonu, gen transkripsiyonu ya da gen regülasyonu üzerinde etki ettiği belirlenmiştir. İnsanda bulunan calmodulin-1 (hCALM 1) geninin 5'-UTR bölgesinde bulunan düzenli

[CAG]₇ mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen bir azalmanın gen ekspresyon seviyesini %45 azalttığı bildirilmiştir (Toutenhoofd vd 1998).

İnsanda fragile X mental retardation-1 (*FMRI*) geninin 5'-UTR bölgesinde trinükleotit [CGG] mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen artışın fragile X sendrom hastalığına neden olduğu bildirilmiştir. Trinükleotit mikrosatellit motifi [CGG]_{≥200} olduğu zaman FMR protein üretiminin durduğu ve hastalığın ortaya çıktığı belirtilmiştir (Kenneson vd 2001).

Nicolis vd (2006) insanda sistik fibrosis (CF) hastalığının nedeni olarak bilinen sistik fibrosis transmembran iletkenlik regülatör ["cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR)] proteini ile en yakın homoloji gösteren *MRPI* geninin yapısını incelemişlerdir. *MRPI* geni 5'-UTR bölgesinde trinükleotit [GCC] mikrosatellit motifi içerdiği ve [GCC] mikrosatellit motifinin genin promotör bölgesini aktif hale getirdiği belirlenmiştir. Özellikle CF hastalığı bulunan ve bulunmayan hastalar arasında [GCC] mikrosatellit motifi 7 ile 14 motif uzunluğu arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Trinükleotit [GCC] mikrosatellit varyasyonu ile hastalık belirtisi arasında doğrudan ilişkinin bulunduğu saptanmıştır.

Iglesiasa vd (2004) yaptıkları çalışmalarında insan genomuna ait açıklanmış tüm genlerin transkripsiyon başlama bölgesinin birinci 10 kb'lık bölümü ve 5'-UTR bölümünde bulunan motif sayısı 2 bazdan 10 baza kadar olan mikrosatellitlerin tamamını içeren veri tabanı üzerinde çalışmışlardır. Promotör bölgesinde mikrosatellit içeren 114 adet mikrosatellit içerisinde 51 adetinin polimorfizm gösterdiği saptanmıştır. Elektroforetik mobiliti taşınma analizi ["Electrophoretic mobility shift assay" (EMSA)] yöntemiyle polimorfik mikrosatellitler içerisinde [CTC/GAG] trinükleotit mikrosatellit motifi çift sarmallı DNA yapısı oluşturarak spesifik protein 1 (SP1) ile tripleks yapı oluşturmuştur. Proteinler içerisinde poliprimidin bağlanma proteini 1 (PTBP1) ile tek sarmallı DNA formatındaki [CTC] trinükleotit mikrosatellit motifi bulunan bölge bağlanarak iki farklı DNA konformasyonunun oluşumuna neden olmuştur. Sonuçlar cis-regülatör element olarak mikrosatellitlerin ya transkripsiyon faktör bağlanma proteinlerini etkileyerek ya da

ikincil DNA formasyonlarına (sekonder yapılara) yol açarak gen ekspresyonunu etkilediğini göstermiştir.

Hammock ve Young (2005) çayır faresi (*Microtus ochrogaster*) üzerinde yaptıkları çalışmada sosyal davranma ile ilgili gen bölgesi olan vasopressin 1a reseptör geninin 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen polimorfizmin genin ekspresyon seviyesini etkileyerek sosyal davranış farklılıklarına yol açtığını belirlemişlerdir.

Hulzink vd (2002) araştırmalarında tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinde polen tüpü gelişiminde görev alan *ntp303* geninin 5'-UTR bölgesinde bulunan [GAA]₈ trinükleotit mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen delesyonların translasyon seviyesinin artışında önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Martienssen ve Colot (2001) çalışmalarında *Arabidopsis* genlerinin 5'-UTR bölgelerinde bulunan [AG] mikrosatellit motiflerinin antisens transkripsiyonunu etkilediğini göstermişlerdir.

Genlerin intron bölgeleri üzerinde bulunan mikrosatellitlerin gen transkripsiyonu, regülasyonu, mRNA siplisini, gen suskunluğu üzerine etkili olduğu bildirilmiştir. Tirosin hidroksilaz geninin birinci intron bölgesinde bulunan düzenli [TCAT]₁₀ tetranükleotit mikrosatellit motifinin değişken [TCAT]₄[CAT][TCAT]₅ mikrosatellit motifine dönüşmesinin transkripsiyon regülatör elementinin hareketini etkilediği belirtilmiştir (Meloni vd 1998). Genlerin intron bölgelerinde bulunan mikrosatellitlerin 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerle birlikte gen ekspresyonunda yardımcı regülatör element rolü üstlendikleri farklı araştırmalarda gösterilmiştir. İnsanda kollojen tip 1 alfa 2 (*COL1A2*) geni üzerinde 5'-UTR bölgesinde bulunan [CA]_n ve birinci intron bölgesinde bulunan [GT]_n dinükleotit mikrosatellit motiflerinin birlikte transkripsiyon aktivitesini arttırdığı herhangi birinin olmadığı durumda ise transkripsiyon üzerinde etkisiz kaldığı tespit edilmiştir (Akai vd 1999).

İnsanda *SCA10* geninin dokuzuncu intronunda bulunan pentanükleotit [ATTCT] mikrosatellit motif sayısının artmasından dolayı spinoserebellar ataksiler tip 10

[“spinocerebellar ataxia type 10” (SCA10)] hastalığı ortaya çıkmaktadır. *SCA10* geni üzerinde meydana gelen mikrosatellit motifinin artması sonucu toksik RNA mekanizması devreye girerek yeni oluşan motif sayısı fazla olan [ATTCT] mikrosatelliti içeren sekonder proteinler organ spesifik patojenisitiye neden olmaktadır (Matsuura vd 2000).

İnsan epidermal büyüme faktörü (*EGFR*) geninin birinci intron bölgesinde bulunan [CA]₂₁ dinükleotit mikrosatellit motifinde meydana gelen artışın *EGFR* geninin transkripsiyon aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Gebhardt vd 1999). Estany vd (2007) tarafından insulin-benzeri büyüme faktörü I (*IGF-I*) genine ait intronik polimorfik [CA] mikrosatellit motifinin gen ekspresyonunu etkilediği belirlenmiştir. Domuz (*Sus scrofa*) *IGF-I* geninin birinci intron bölgesinde bulunan [CA] dinükleotit mikrosatellit motifinin artışı gen ekspresyonunu teşvik ederek plazma içerisindeki insulin konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır. *IGF-I* geni birinci intron bölgesinde bulunan [CA] mikrosatellit motifi artışı ile IGF-I seviyesinin yükseldiği ve büyümeyi ve şişmanlığı hızlandırdığı bildirilmiştir.

Genlerin 3'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin gen suskunluğu ve transkripsiyon akışını etkilediği bildirilmiştir. Örneğin kinaz geni 3'-UTR bölgesinde bulunan [CTG] mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen artışın miyotonik distrophi type 1'e (adelenin genişlememesi nedeniyle kasın spazm geçirmesi) sebep olarak transkripsiyon akışını etkilediği bulunmuştur (Ranum ve Day 2002).

İnsan genomu üzerinde yapılan çalışmalarda mikrosatellit motifleri içerisinde özellikle trinükleotit mikrosatellit motiflerinde meydana gelen motif uzunluğunun artmasının bazı nörolojik hastalıklara sebep olduğu yönünde bulgular mevcuttur. Bu hastalıklar insanda Huntington hastalığı (HD), dentatorubropallidoluysian atrofi [“dentatorubro-pallidoluysian atrophy” (DRPLA)], spinobulbar müsküler atrofi [“spinobulbar muscular atrophy” (SBMA)] ve omurilik kaslarının bozukluğu [“spinocerebellar ataxia” (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 ve SCA8)] gibi nörolojik kaynaklı hastalıklar olarak bilinmektedir.

Bu hastalıkların çoğunluğunun sebebi ilgili genin protein kodlayan bölgesinde bulunan trinükleotit [CAG] mikrosatellit motif içeriğinde meydana gelen artış nedeniyle protein yapısında glisin amino asitinin sayısının artarak protein yapısını değiştirmesi olarak bilinmektedir. Yapısı değişerek mutasyona uğrayan fazla sayıda glisin amino asiti içeren proteinin insanda toksik etki yarattığı ispatlanmıştır (Galvao vd 2001). Ayrıca spinoserebellar ataksiler tip 8 hastalığına *SCA8* geni intron bölgesi üzerinde bulunan trinükleotit [CTG] mikrosatellit motifi üzerinde meydana gelen motif uzunluğu artışının neden olduğu ileri sürülmüştür (Koob vd 1999).

Sharma vd (2007) insanda [TG/CA] dinükleotit mikrosatellit motifi artışının ribozomal protein kodlayan genlerin transkripsiyon cis-modülatör bölgesi ile negatif bir korelasyon içinde olduğunu ve ribozomal protein kodlayan genlerin transkripsiyon seviyesini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ribozomal protein kodlayan genlerin çoğunda yapılan sekans analizi gen ekspresyonunda etkin rol üstlenen mikrosatellitlerden özellikle dinükleotit [TG/CA] mikrosatellit motifinde meydana gelen artışın intron uzunluğunu arttırdığını ve gen fonksiyonunu kontrol ettiğini öne sürmüşlerdir.

Bazı polimorfik dinükleotit mikrosatellit DNA dizilerinin gen transkripsiyonunun regülasyonunda etkili olarak fonksiyonel özellik gösterdikleri Gao vd (2004) tarafından insanda yapılan araştırmada da belirtilmiştir. İnsanda nezle üzerine yapılan çalışmada farklı populasyonlarda transkripsiyon sinyal taşıyıcı ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 [“signal transducer and activator of transcription 6” (*STAT6*)] geninin birinci eksonunda bulunan toplam 7 allelden oluşan [GT] dinükleotit mikrosatellit motifi Amerikalılarda 12 ile 17 motif sayısı arasında değişirken İngilizlerde 13 ile 18 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Farklı populasyonlarda dinükleotit mikrosatellit motif sayısında görülen bu değişimin *STAT6* geninin ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca *STAT6* geni üzerinde yapılan farklı çalışmalarda da dinükleotit mikrosatellit motifi artışının genin ekspresyonunu etkilediği (Gebhardt vd 1999) ve transkripsiyon aktivitesini azalttığı (Okladnova vd 1998, Searle vd 1999) tespit edilmiştir.

Dinükleotit mikrosatellit motiflerinin neden olduğu alternatif DNA yapılarından dolayı (Z-DNA, H-DNA gibi) gen regülasyonu ve transkripsiyon aktivitesini düzenleyici etkinin olduğu öngörülmüştür (Naylor ve Clark 1990, Rich 1993, Rothenburg vd 2001). Mayada *URA3* raportör geni üzerinde bulunan [CAG/CTG] trinükleotit mikrosatellit motifinin transkripsiyon sonucu beklenen uzunluğa göre daha fazla sayıda mikrosatellit motifi oluşturduğu ve bunun RNA polimerazın “strand slippage” olayından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Fabre vd 2002).

2.4. Mikrosatellitlerin Belirlenmesi

Yaygın olarak mikrosatellitlerin belirlenmesi ve analizi küçük insertler içeren genomik DNA kütüphaneleri üzerinde prob olarak kullanılan ardışık tekrarlı oligonükleotitlerin hibridizasyonu ile yapılmaktadır. Kaynak olarak genomik DNA kütüphaneleri kullanılarak geliştirilen mikrosatellit markırları hem transkripsiyona uğrayan hem de transkripsiyona uğramayan bölgelerde bulunan mikrosatellitleri içerdiği için bu markırların fonksiyonel bilgi verme oranı düşüktür.

Son yıllarda alternatif bir yöntem olarak EST sekanslarının bulunduğu veri bankaları mikrosatellitlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ince vd 2007, Ince vd 2008). EST’ler doku, organ ve gelişme dönemine göre aktif olan genlerin belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı ve ucuz yöntemlerin başında gelmektedir. Genomun bir bölümünde transkripsiyona dahil edilen EST’lerden elde edilebilen mikrosatellit markırlar ile doğrudan genlerin haritalanmasında kullanılabilmekte ve potansiyel olarak fonksiyonel özellik göstermektedir (Andersen ve Lubberstedt 2003, Saha vd 2003, Yi vd 2006).

EST sekanslama ve EST’lerin kullanımı ile ilgili projeler bitkilerde ve hayvanlarda hızla yaygınlaşmaktadır. Bu tür projeler intra-genomik (Schlueter vd 2004) ve inter-genomik karşılaştırmalar (Fulton vd 2002), yeni genlerin bulunması (Ewing vd 1999, Ronning vd 2003), moleküler markırların geliştirilmesi (Michalek vd 2002) ve mikroarray (mikro çip) tekniğini geliştirilmesi (Wisman ve Ohlrogge 2000) için etkin kullanılabilecek yöntemler olarak bilinmektedir. EST’ler özellikle Kantitatif Karakter Lokusu Ekspresyon [“Expression Quantitative Trait Locus” (eQTL)]

haritalamalarında spesifik genomik markırları ile transkripsiyon yoğunlukları arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında, Kantitatif Karakter Lokuslarının (QTL) belirlenmesinde, markır yardımıyla seleksiyon [“Marker Assited Selection” (MAS)] çalışmalarında ve tek nükleotit polimorfizm [“Single Nucleotide Polymorphism” (SNP)] markırı geliştirilmesinde kullanılabilecek değerli bir kaynaktır (Close vd 2004, Schmid vd 2003).

Günümüze kadar mikrosatellitlerin belirlenmesinde kullanılan “Tandem Repeats Finder” [TRF] (Benson 1999), “REPuter” (Kurtz vd 2001), “Simple Sequence Repeat Identification Tool” [SSRIT] (Kantety vd 2002), “Simple Sequence Repeat Finder” [SSRF] (Sreenu vd 2003), “Search for TRs IN Genomes” [STRING] (Parisi vd 2003), “Microsatellite Search” [MISA] (Thiel vd 2003), “Tandem Repeats Analyzer 1.5” [TRA] (Bilgen vd 2004) ve “Exact Tandem Repeats Analyzer 1.0” [E-TRA] (Karaca vd 2005a) isimlerinde bilgisayar yazılım programları bulunmaktadır. Bu tekrar bulma programları çok etkin bir şekilde ardışık tekrarların bulunmasında kullanılabilmesine rağmen “Tandem Repeats Analyzer 1.5” [TRA] (Bilgen vd 2004) ve “Exact Tandem Repeats Analyzer 1.0” [E-TRA] (Karaca vd 2005a) haricinde hiçbirisi organizma, organ, doku ya da hücre tipi ve gelişme dönemine göre tekrar içerikleri hakkında bilgi verememektedir.

TRA veya E-TRA programları “Keyword-Finder” ve “Organism Miner” (“Org-Miner”) programları (Ince vd 2008) ile birlikte kullanıldığında organizma, organ, doku, hücre tipi ve gelişme dönemine göre gruplamanın yapılmasının ardından ardışık tekrarlı DNA dizileri ve tekrar içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. TRA ve E-TRA programları ile doku, organ ve gelişme dönemi spesifik mikrosatellitlerin belirlenebilmesi genetik çalışmalar için farklı bir kaynak olarak kullanılabilmektedir. Çevre, stres koşulları, gelişme dönemleri, doku ve organlara göre farklı gen ifadelerinin ortaya çıkması ve protein kodlayan gen bölgelerinde bulunan mikrosatellitlerin gen regülasyonu üzerinde etkilerinin belirlenmesi için biyoinformatiksel yaklaşımların kullanılması etkin bir yöntemdir.

2.5. Biber Genomu ve Mikrosatellit İçeriği

Domates, patlıcan, patates gibi diğer *Solanaceae* familyasına ait bitki türlerinde olduğu gibi biberde de temel kromozom sayısı 12 olarak bilinmektedir. *Capsicum* türleri diploit genoma sahip olup $2n=2x=24$ kromozomludur. Ancak bazı yabani türlerde $2n=2x=26$ kromozom sayısı da tespit edilmiştir (Pickersgill 1991, Tong ve Bosland 2003). *C. annuum* türünün sahip olduğu 24 kromozom için yapılan karyotip analizleri sonucu genellikle 1 ya da 2 kromozomun akrosentrik 10-11 kromozomunun ise metasentrik ya da submetasentrik yapıda olduğu belirlenmiştir (Lanteri ve Pickersgill 1991).

Biber diğer bazı kültür bitkileri ile kıyaslandığında oldukça küçük bir genoma sahiptir. Özellikle 916 Mb büyüklüğünde 0.9 pg (1 C-değeri) domates bitkisi genomuna göre büyük, 16469 Mb büyüklüğünde ve 16 pg (1 C-değeri, 1 pg=965 Mbp) bulunan soğan (*Allium cepa* L.) bitkisine göre ise oldukça küçük genomludur. *C. annuum* DNA miktarı 3.38 pikogram (1 C-değeri) ve 2268 cM genetik uzunluğa sahiptir. Biber genomunun fiziksel büyüklüğü türlere göre değişmekle birlikte 2200 ile 2700 Mb arasında olduğu belirlenmiştir (Arumuganathan ve Earle 1991, Schreiber 2004).

Ince vd (2007) tarafından *Solanaceae* familyası EST verileri kullanılarak yapılan çalışmada biber (*C. annuum* L.) oldukça yüksek oranda (%15.64) ardışık tekrarlı DNA dizisi içeren tür olarak saptanmıştır. GenBank veri tabanından 397548 EST verisinin alınarak düzenli ve değişken mikrosatellit içeriği TRA-1.5 programı kullanılarak doku, organ ve gelişme dönemlerine göre belirlenmiştir.

Biber EST verileri incelendiğinde en fazla gözlenen mikrosatellit motifi mononükleotitlerde [A/T], dinükleotitlerde [CT/GA], trinükleotitlerde [CTT/GAA], tetranükleotitlerde [AAAT/TAAA], pentanükleotitlerde [TTTTC] ve son olarak heksanükleotitlerde [CTGCTC] olarak tespit edilmiştir. Trinükleotit mikrosatellit motifinin dinükleotit tekrar motiflerine göre daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Mikrosatellit motifi ve mikrosatellit yoğunluğunun doku, organ ve gelişme dönemlerine göre birbirinden farklılık gösterdiği *in silico* yöntemler

kullanılarak tespit edilmiştir. EST verileri içerisinde çiçek tomurcuğu dokusuna ait EST'ler üzerinde yüksek oranda düzenli ve değişken mikrosatellit miktarı gözlenmiştir (Ince vd 2007).

2.6. DNA Markır Sistemleri

Günümüzde oldukça farklı DNA markır teknikleri belirlenmiş olup değişik amaçlarla kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan DNA markır teknikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu tekniklerin hemen hemen hepsi, morfolojik ayırım tekniklerine ve diğer moleküler ayırım tekniklerinden olan izoenzim tekniğine oranla daha kolay, ucuz ve güvenilirdir (Zhang ve Stommel 2001, Karaca ve Ince 2008, Karaca vd 2008, Jones vd 2009). Mikrosatellitler diğer markır teknikleri ile karşılaştırıldığında polimorfizm oranının oldukça yüksek olması, kodominant özellik göstermesi, hızlı sonuç alınması ve kolay uygulanabilir olması gibi üstünlükleri ile genetik haritalama, taksonomi ve genetik ilişkilerin belirlenmesi gibi çalışmalarda etkin olarak kullanılabilmektedir (Zietkiewicz vd 1994, Karaca vd 2002, Nicot vd 2004, Crane 2007, Ince vd 2010b).

Portis vd (2007) biberde *C. annuum* türünde 8000 adet EST verisi kullanarak geliştirdikleri 348 primer setinin *C. annuum* tür içi %14.08'lik bir polimorfizm gösterdiğini belirtmişlerdir. Min vd (2008) tarafından yapılan çalışmada yine EST verileri kullanarak geliştirilen primer setleri ile *C. annuum* türüne ait iki çeşit arasında yalnızca %4.3'lük bir polimorfizm saptanmıştır. Yi vd (2006) tarafından yapılan çalışmada ise EST verileri kullanılarak dizayn edilen 850 primer setinin *C. annuum* türünün TF68 hattı ile *C. chinense* türüne ait Habanero hattı arasında %18.7 oranıyla bir polimorfizm gösterdiği tespit edilmiştir. DNA markırları yaygın olarak genetik haritalamalarda kullanılmaktadır. *Capsicum* cinsi üzerinde ilk genetik linkage haritalama çalışması Tanksley (1984) tarafından *C. annuum* ve *C. chinense* türleri arasında izoenzim segregasyonuna dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk RFLP linkage haritalama çalışması Tanksley vd (1988) tarafından 85 lokus kullanılarak chili biberlerinin domates bitkisi ile karşılaştırılmasına dayalı olarak yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Yaygın kullanılan DNA markır sistemleri ve özellikleri

Markır Sistemi	Kısa Adı	Yöntem Özellikleri
Minisatellit ("Variable Number Tandem Repeats")	M-Sat (VNTR)	Bu yöntem DNA markırları arasında ilk geliştirilen sistemdir. Yöntemde ardışık tekrarlı DNA (minisatellit) dizilerinin bir bölümü prob olarak kullanılarak genomlar arasındaki minisatellit farklılığı belirlenmektedir. Southern hibridizasyon, izotop veya flüoresan etiketleme gerektirir. Kaliteli ve bol miktarda genomik DNA'ya gerek duyulur ve bu sistemle genellikle ko-dominant (eş-baskın) markırlar üretir. Bu yöntemin yeni bir versiyonu olan DAMD PZR tabanlı ve Southern hibridizasyon, izotop veya flüoresan etiketleme gerektirmemektedir.
Sınırlandırılmış Kısım Uzunluk Polimorfizmi ("Restriction Fragment Length Polymorphism")	SKUP (RFLP)	Genik veya genik olmayan bir veya daha fazla DNA probu kullanılarak genomlar arasındaki farklılıkları belirler. Southern hibridizasyon, izotop veya flüoresan etiketleme gerektirir. PZR tabanlı olmaması nedeni ile oldukça kaliteli ve bol miktarda genomik DNA'ya gerek duyulur. Bu markır sistemi genellikle ko-dominant markır üretmekle birlikte dominant markırlarda elde edilebilmektedir.
Nokta Hibritleme Analizi ("Dot Blot Analysis")	NH (Dot Blot)	Bu yöntem SKUP yöntemine benzerlik göstermekle birlikte SKUP'daki Southern hibridizasyon ile DNA fragmanlarının büyüklük farkına göre yapmış olduğu sınıflandırma kullanılmaz ancak örnekler nokta şeklinde dağıtılarak çok sayıda örnek kısa bir sürede analiz edilebilmektedir. Bu yöntemle genellikle genomda bulunan özel bir bölgenin varlık ya da yokluğu kıyaslanarak polimorfizmi belirlenir.
Basit Tekrarlı Sekans Polimorfizmi (Mikrosatellit) ("Simple Sequence Repeats (Mikrosatellites)")	BTSP (SSR)	Genomda bulunan ardışık tekrarlı (düzenli veya değişken) mikrosatellit alanlarını (domain) üst ve alttan çevreleyen özel primer çiftleri ile çoğaltarak ardışık tekrar sayısındaki polimorfizmi belirler. Bu yöntem PZR tabanlı olup az miktarda DNA'ya gerek duyar ve oldukça yaygın kullanımı olan ko-dominant markır sistemidir. Bu yöntemde mikrosatellit alanlarındaki polimorfizm markır olarak kullanılmakla birlikte özellikle son dönemlerde bu yöntem kullanılarak mikrosatellitlerin genomdaki dağılımları, fonksiyonları ve gen ifadesi üzerindeki etkileri de çalışılmaktadır.
Çoğaltılmış DNA Parmak İzi ("DNA Amplification Fingerprinting")	ÇDPİ (DAF)	RAPD tekniğine oldukça benzer bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan primerler oldukça kısadır. Poliakrilamit jel, izotop veya gümüş nitrat boyama tekniği gerektiren bir yöntemdir.

Çizelge 2.2. Devamı

Markır Sistemi	Kısa Adı	Yöntem Özellikleri
Basit Tekrarlı Sekanslar Arası Polimorfizmi ("Inter-Simple Sequence Repeats")	BTSAP (I-SSR)	Genomda bulunan ardışık tekrarlı DNA kısımları arasındaki uzunluk farkını belirler. PZR tabanlı olup az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyar ve genellikle dominant markır üretir. Bu yöntemin oluşturduğu polimorfizm iki mikrosatellit alanı arasındaki büyüklük farkıyla ortaya çıkmaktadır. Ancak BTSP kadar güvenilir bir yöntem değildir. Agaroz jel elektroforez ayırım tekniğini kullanması ve üzerinde çalışılan organizmanın genomik sekanslarının bilinmesine gerek duymaması nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir.
Çoğaltılmış Kısım Uzunluk Polimorfizmi ("Amplified Fragment Length Polymorphism")	ÇKUP (AFLP)	Wageningen Üniversitesi araştırmacılar tarafından geliştirilen bu yöntem RAPD ve RFLP yöntemlerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuş bir sistemdir. Bu teknikte genomik DNA genellikle 2 özel restriksiyon enzimleri ile kesilir, kesim noktalarına özel adaptörler bağlanır ve bu adaptör DNA sekanslarına bağlanabilen primer çiftleri ile seçici olarak çoğaltılmış olan DNA fragmanlarının oluşturduğu polimorfizme dayanır. Genellikle poliakrilamid jel elektroforesiz ve gümüş nitrat etiketleme yöntemi ile analiz edilir. Bu yöntem günümüzde Kapilari elektroforez yöntemi ile de kullanılmaktadır. Genellikle dominant markır vermesi ve karmaşık bant (amplikon) patterni oluşturması dezavantajlarındandır.
Yönlendirilmiş Minisatellitli DNA Çoğaltımı ("Directed Amplification of Minisatellite DNA")	YMDÇ (DAMD)	Genomda bulunan minisatellit bölgelerini genellikle tek primer kullanarak çoğaltan ve oluşturulan amplikonların boylarına dayanan PZR tabanlı ve dominant bir markır sistemidir. YMDÇ'de kullanılan primerler minisatellit bölgelerin çoğaltılmasından sorumludur. RÇDP yöntemine göre daha güvenilirdir. Güvenilirlik RÇDP yönteminde kullanılan primerlerden daha uzun primerler kullanılması ve yüksek renatürasyon sıcaklığından kaynaklanmaktadır. Bu yöntem agaroz jel elektroforez kullanımı nedeni ve üzerinde çalışılan organizmaya ait genomik DNA dizisi gerektirmediğinden dolayı tercih edilmektedir.
Rastlantısal Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi ("Random Amplified Polymorphic DNA")	RÇDP (RAPD)	PZR tabanlı ilk geliştirilmiş teknik olup genellikle 10 nükleotit uzunluğundaki primer ve bazı şartlarda primer seti kullanılarak genom üzerinde bu primerlerin hibrit oluşturdukları kısımların çoğaltımı ile polimorfizmi belirler, genellikle dominant markır üretir, kullanımı yeni markır sistemlerinin gelişimi ile birlikte giderek azalmaktadır. Bu yöntem DNA markır sistemleri içerisinde en basit olan yöntem olmakla birlikte özellikle tekrarlanabilirlik sorunundan dolayı günümüzde bazı bilimsel dergiler tarafından kabul edilmemektedir.
Tek Sarmallı Uygunluk Polimorfizmi ("Single Stranded Conformational Polymorphism")	TSUP (SSCP)	Bu yöntem PZR ile çoğaltılmış amplikonların sekans dizileri arasında bulunan farklılıkları ortaya koyan bir yöntemdir. Amplikonların denatürasyon şartlarındaki jeldeki hareketinden yararlanılarak oluşan polimorfizme dayanır. Kapilari veya poliakrilamid jel tabanlı olması nedeni ile fazla kullanım olanağı bulunmamaktadır.

Çizelge 2.2. Devamı.

Markır Sistemi	Kısa Adı	Yöntem Özellikleri
Tek Nükleotit Polimorfizmi ("Single Nucleotide Polymorphism")	TNP (SNP)	Günümüzde giderek kullanımı yaygınlaşan etkin bir yöntem olup alleller arasındaki tek nükleotit polimorfizmini belirlemede kullanılmaktadır. Özellikle otomasyon ve flüoresan tekniklerinin gelişmesi ile mikro çip (mikro-array) yönteminde etkin bir şekilde kullanılmaktadır.
Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kısm Uzunluk Polimorfizmi ("Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism")	PZR-SKUP (PCR-RFLP)	PZR tabanlı bir teknik olup bireyler arasındaki farklılık PZR amplikonlarının restriksiyon enzimler yardımı ile belirlemekte, genellikle ko-dominant markırlar üretmektedir. Bu yöntem ÇKPSP yöntemine çok benzemekte olup bazen aynı isim altında kullanılmaktadır. PZR-SKUP yönteminde genellikle birden fazla amplikon ürünleri denemeler sonucu seçilen restriksiyon enzimlerle kesilerek polimorfizm belirlenirken ÇKPSP yönteminde genellikle tek amplikon ve daha önceden belirlenmiş olan restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfizm ortaya konmaktadır.
Çoğaltılarak Kesilmiş Polimorfik Sekans Polimorfizmi ("Cleaved Amplified Polymorphic Sequence")	ÇKPSP (CAPS)	PZR-SKUP yöntemine çok benzeyen bir yöntemdir. ÇKPSP genellikle RAPD, AFLP, HBAP, SİAP veya SKEA markırlarının restriksiyon enzimleri kullanılarak monomorfik amplikonlardan polimorfizme dönüştürülmesinde kullanılmaktadır.
Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar ("Sequence Characterized Amplified Region")	SKEA (SCAR)	Bu yöntem de genellikle AFLP, RAPD, AP-RAPD yöntemlerinden elde edilen ancak polimorfizm tam olarak saptanamayan veya çoklu amplikon oluşumundan dolayı kesin olmayan monomorfik amplikonlar önce agaroz jelden izole edilir ve sekans dizi analizleri ile yeni primer çiftleri oluşturulur. Bu primer çiftleri kullanılarak PZR analizleri ile polimorfizm araştırılır. SKEA yönteminde dominant ve ko-dominant markırlar elde edilmektedir.
Hedef Bölge Amplifikasyon Polimorfizmi ("Target Region Amplification Polymorphism")	HBAP (TRAP)	Bu yöntemde DNA dizileri bilinen genomik bölgelere özgü primer çiftleri belirlenerek polimorfizm oluşturulmaktadır. Primer setinin biri EST dizilerinden oluşturulmuşken diğer primer ise rastlantısal olarak belirlenmektedir. Hedef bölge ekson, ekson-intron kesişmeleri veya özel gen bölgeleri olarak belirlenmekte ve PZR yöntemi ile bu bölgelerdeki polimorfizm belirlenebilmektedir. HBAP amplikonları poliakrilamid jellerle analiz edilmektedir.
Sekans İlişkili Amplifikasyon Polimorfizmi ("Sequence-related Amplified Polymorphism")	SİAP (SRAP)	Bu yöntemde genellikle 17-20 nükleotit uzunluğunda primer seti kullanılır. Primer çiftlere üzerinde çalışılan organizmanın belirli bir geninin open reading frame (ORF) bölgelerini çoğaltacak şekilde dizayn edilmiştir. Primer çiftlerinin 5'-ucundan başlayan genellikle 10-11 nükleotit kısmı ileri sekansta CCGG ve geri sekansta AATT ile sonlandırılmaktadır. SRAP amplikonları genellikle poliakrilamid jellerle analiz edilmektedir.

Çizelge 2.2. Devamı

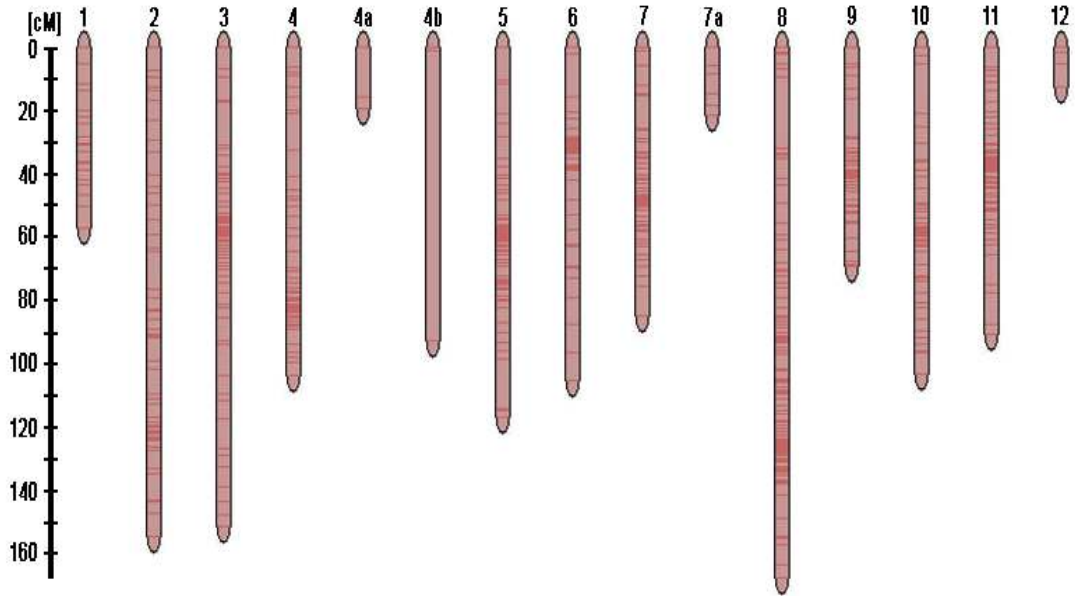
Markır Sistemi	Kısa Adı	Yöntem Özellikleri
Polimorfik Mikrosatellit Lokuslarının Seçici Amplifikasyonu ("Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci")	PMLSA (SAMPL)	Bu yöntem ÇKUP yöntemine oldukça benzer bir yöntem olup ÇKUP yönteminin seçici amplifikasyonunda kullanılan adaptör spesifik primer yerini mikrosatellit tekrarı içeren primer ile diğer adaptöre spesifik primerin PZR reaksiyonunda birlikte kullanımı ile polimorfizm belirlenir. Bu yöntem genellikle dominant markır üretir.
Sekans Spesifik Amplifikasyon Polimorfizmi ("Sequence-specific Amplification Polymorphism")	S-SAP (S-SAP)	AFLP tekniğine oldukça benzer bir yöntemdir. AFLP yönteminde olduğu gibi ilk işlem olarak genomik DNA restriksiyon enzimlerle kesilir ancak AFLP'den farklı olarak tek adaptör kullanılır. PZR çoğaltma işleminde primer setinden biri adaptör spesifik primer iken diğer primer transpozon veya diğer tekrarlı elemanlara spesifik primerdir. Bu yöntemin kullanıldığı bazı çalışmalarda S-SAP yönteminin AFLP yöntemine göre daha polimorfik sonuçlar ortaya koyduğu öne sürülmektedir.
CAPS-mikrosatellit ("CAPS-microsatellite")	ÇKPSP- SSR (CAPS- SSR)	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi araştırmacıları tarafından geliştirilen bu yöntemde özellikle EST tabanlı mikrosatellitlerde splisin, alternatif siplisin olaylarından dolayı çok büyük ve monomorfik mikrosatellit lokuslarının değişik restriksiyon enzimleri kullanılarak oluşturduğu polimorfizme dayanan bir yöntemdir. Bu sistem genellikle ko-dominant markır üretmektedir. Bu yöntem agaroz jel elektroforez ayırıştırma tekniğine uygundur. Ayrıca PZR sonrası amplikonların birleştirilerek analizi (multimix) veya çok sayıda primer setinin aynı PZR'de amplifikasyonu (multiplex) bu yöntemin avantajlarından biridir.
Sekansı Bilinen Diziler ("Sequence Tagged Sites")	SBD STS	Bu yöntemde genomun özel bir bölgesi daha önce tasarlanmış özel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılır. Bu yöntem kloroplast, mitokondri ve nükleusa ait özel dizilerin PZR yöntemi ile çoğaltılmasına dayanır. STS analizleri ile elde edilen amplikonlar diğer yöntemlerle örneğin CAPS, SCAR kullanılarak polimorfizm oranı artırılabilir.
Sınırlanmış Uzunluk Uç Etiketleme ("Restriction Fragment End Labeling")	SKUE (RFEL)	Bu yöntemde PZR uygulamasına gerek duyulmadan genomik DNA seçilmiş restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesilen uçlar flüoresans veya izotoplarla etiketlendikten sonra analiz edilerek restriksiyon enzimlerinin oluşturabileceği polimorfizm belirlenir. Bu yöntem yerini mikro-array yöntemine bırakmıştır.
Rastlantısal Seçmeli Primer Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Random Arbitrarily Primed PCR")	RSP-PZR (RAP- PCR)	Tek sarmallı cDNA'nın rastlantısal primer veya primer seti ile PZR çoğaltılması ve flüoresan veya izotoplarla etiketlendikten sonra poliakrilamid jellerde analizine dayanır. Bu yöntem Differential Display (Karşılaştırmalı Ayırım) yöntemi olarak kullanılmıştır. Az örnekle çalışması nedeni ile yerini mikro-array tekniğine bırakmıştır. Ancak küçük çaptaki analizlerde kullanılmaktadır. Bu sistemde mRNA oligo dT ₁₂ VN primeri (V=A, C veya G; N=A, T, G, veya C) cDNA çoğaltımında ise ikinci rastlantısal primer kullanılır.

Çizelge 2.2. Devamı

Markır Sistemi	Kısa Adı	Yöntem Özellikleri
Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction")	TT-PZR (RT-PCR)	Bu yöntemde ters transkriptaz ve DNA polimeraz enzimleri kullanılarak organ, doku, gelişme dönemi veya farklı organizmalar arasındaki gen ekspresyon farklılıkları belirlenmektedir. TT-PZR yönteminde mRNA gen spesifik veya seçici bir primer kullanılarak tek sarmallı cDNA ve daha sonra tek sarmallı cDNA oluşturmada kullanılan primer ve seçici primer kullanılarak çift-sarmallı DNA amplikonları oluşturularak polimorfizm belirlenmektedir.
İnseriyon Delesyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Insertion Deletion Primed Polymerase Chain Reaction")	INDEL-PZR (INDEL-PCR)	Bu yöntemle genom sekans analizleri tamamlanmış veya bir bölümü tamamlanmış organizmalarda kullanılabilecek bir yöntemdir. Genom analiz bilgilerine dayanarak PZR düzeyinde tespit edilecek insersiyon veya delesyon içeren DNA kısımları polimorfizm için kullanılmaktadır.
Seçici Primerli Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction")	SP-PZR (AP-PCR)	Bu yöntem RAPD yöntemine benzetmekle birlikte genellikle daha uzun primer veya primer çiftleri kullanılarak genomlar arasındaki polimorfizm belirlenmektedir. Ancak genel literatürde RAPD ve AP-RAPD teknikleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır.
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Real Time Polymerase Chain Reaction")	GZ-PZR (RT-PCR)	Tüm GZ-PZR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flüoresan boyadan alınan sinyal miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Flüoresan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flüoresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır. Dizi spesifik Flüoresan Problemler: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Taqman, Molecular Beacons, scorpion primerlerinden oluşmaktadır. Hibridizasyon Problemleri ise Dizi spesifik olmayan flüoresan boyalardır. Örneğin Syber Green I. GZ-PZR'nin en önemli dezavantajı protokol geliştirilmesi yüksek derecede bir teknik yetenek ve /veya destek gerektirir ve yüksek cihaz maliyetine sahiptir.
Mikro Çip ("Mikro-Array")	MÇ (MA)	DNA mikroçip veya DNA çip veya Gen çip veya Genom çip olarak da bilinen bu yöntemde genellikle her biri bir geni temsil eden, ayrı ayrı küçük katı yüzeye kovalent bağlarla sabitlenmiş binlerce veya milyonlarca DNA parçacıkları kullanılmaktadır. Kalitatif veya kantitatif ölçümler özel şartlar altında seçici DNA-DNA veya DNA-RNA etkileşimi ve florofofor tabanlı algılama esaslarına dayanmaktadır. DNA mikroçip teknolojisi çoğunlukla gen ifadesi profilini çıkarmada, yani aynı anda çok sayıda genin ifade düzeyinin gözlemlenmesinde veya karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır.

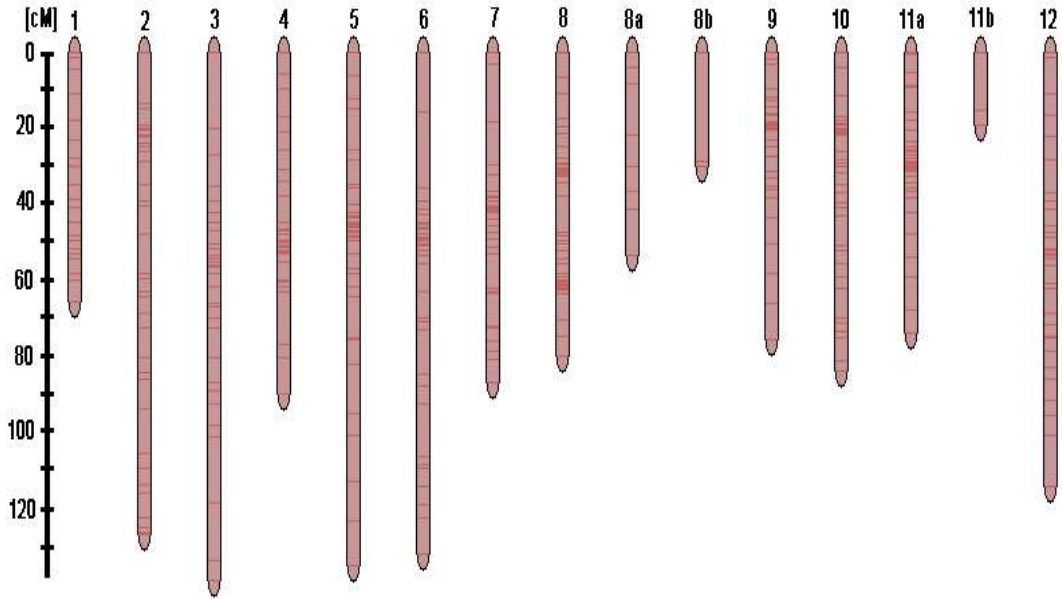
AFLP, RFLP ve SSR markırları kullanılarak tür içi ve türler arası çeşitli haritalama çalışmaları yapılmıştır (Prince vd 1993, Livingstone vd 1999, Kang vd 2001). Tür içi ve türler arası melezleme yapılarak oluşturulmuş 6 populasyon kullanılarak Paran vd (2004) tarafından morfolojik, RFLP, AFLP markırları içeren 2262 adet markır (1832 cM) ile genetik haritalama gerçekleştirilmiştir. Biberde klasik yöntemlerle geliştirilen yaklaşık 180 mikrosatellit markırı bulunmaktadır (Lee vd 2004, Nagy vd 2004, Barchi vd 2006, Minamiyama vd 2006, Lee vd 2009).

Biberde türler arası haritalamada [*C. frutescens* var. BG2814-6 x *C. annuum* cv. NuMex RNaky] 100 adet F₂ bitkisi kullanılarak genetik linkage haritalama çalışması yapılmış (Ben-Chaim vd 2006) ve elde edilen genetik linkage haritası Şekil 2.4'de sunulmuştur. Bu haritalamada toplam 728 adet moleküler markır içerisinde 489 adet SSR markırı, 195 adet AFLP markırı ve 8 adet spesifik PZR markırı ve 36 adet RFLP markırı bulunmaktadır. Çalışmada 1358.7 cM ile 12 adet büyük 4 adet küçük linkage grubu oluşturulmuştur. Yapılan haritalama interspesifik düzeyde bir haritalama olup kromozom 4 (linkage grup 4a ve 4b) ve kromozom 7 (linkage grup 7a ve 7b) yüksek rekombinasyon nedeni ile farklı gruplarda bulunmuştur.



Şekil 2.4. Biber FA03 interspesifik haritalaması. *C. frutescens* var. BG2814-6 x *C. annuum* cv. NuMex RNaky haritalaması

Türler arası yapılan bir başka genetik haritalama çalışmasında ise *C. annuum* cv. NuMex RNaky x *C. chinense* PI159234 melezinden elde edilen 100 adet F₂ populasyonu kullanılmıştır (Şekil 2.5). Toplam 426 moleküler markırın kullanıldığı çalışmada 359 adet SSR markır, 3 adet spesifik PZR markır ve 68 adet RFLP markır bulunmaktadır. F₂ populasyonları arasında 1004.8 cM harita mesafesi ile 11 adet büyük 4 adet küçük linkage grubu belirlenmiştir (Wu vd 2009).



Şekil 2.5. Biber AC99 interspesifik haritalaması. *C. annuum* cv. NuMex RNaky x *C. chinense* PI159234 haritalaması

Kültürü yapılan biber çeşitleri arasında genetik farklılığın çok dar olması nedeni ile haritalama çalışmaları genellikle interspesifik düzeyde gerçekleştirilmektedir. Bitkilerde yapılan çalışmalarda özellikle türler arası yapılan haritalama çalışmalarının yüksek rekombinasyon oranı nedeni ile kullanılabilirliği tartışılmaya başlanmıştır (Bagge ve Lubberstedt 2008). Bu nedenle biber ve diğer ekonomik önemi olan bitkilerin genetik haritalama çalışmalarında kullanılacak yeni polimorfik DNA markırlarının geliştirilmesi önemlilik arz etmektedir.

2.7. DNA Ekstraksiyon Yöntemleri

DNA parmak izi (fingerprinting), moleküler filogenetik ve evrimsel çalışmalarda ve genetik haritalama çalışmalarda kullanılabilecek yüksek moleküler ağırlıkta, saf, temiz ve bir bütün halinde DNA eldesi oldukça önemlidir (Williams vd 1993, Vos vd 1995, Zhang vd 1999, Caranta vd 2002, Budak vd 2004).

Moleküler markır tekniklerinin etkin bir şekilde uygulanabilmesi uygun miktar ve kalitede DNA kullanılması ile doğrudan ilişkilidir. Bununla birlikte yüksek polisakkarit içeriğine sahip, sekonder metabolik miktarı yoğun, fenolik bileşiklerce zengin olan bitki türlerinde kaliteli ve yeterli miktarda DNA ekstraksiyonu güçleşmektedir (Loomis 1974, Jobes vd 1995, Suman vd 1999, Karaca vd 2005b).

Kullanılan bitki parçacıklarının fizyolojik yaş farklılığı, farklı yaprak tüylülüğü veya damar oranı, ekolojik şartlar, toplanma dönemleri ve doku bileşiminde bulunan fenolik bileşikler veya karetoneitler, DNA ekstraksiyonunda elde edilen nükleik asitlerin yapısını ve saflığını etkileyen önemli unsurlardır. Bu nedenle bütün bitki türlerinde etkin bir şekilde DNA ekstraksiyonunu gerçekleştiren tek bir yöntem günümüze değin geliştirilememiştir (Karaca vd 2005b).

Kullanılacak bitki parçacığında bulunan sekonder metabolitler ve fenolik bileşikler DNA'nın çözülmesini engelleyerek DNA ekstraksiyonu sırasında büyük miktarda DNA kayıplarına neden olmakta ve aynı zamanda analizlerde kullanılan enzimlerin (restriksiyon enzimleri, modifikasyon enzimleri ve DNA polimeraz enzimi gibi) çalışmasına engel olmaktadır (Karaca vd 2005b). Ayrıca bir bitki grubunda çalışan bir yöntem, diğer bitki gruplarında çoğunlukla başarısızlığa uğramakta, bitki ve bitkinin sekonder metabolitlerinin farklılığı nedeniyle her zaman başarılı DNA izolasyonu sağlanamamaktadır (Doyle ve Doyle 1988). Mevcut bazı DNA izolasyon yöntemleri ve ticari kitler, farklı bitkilerde farklı kalite ve miktarda izolasyon sonuçları vermektedir (Weishing vd 1995, Karaca vd 2002).

Başarılı bir DNA ekstraksiyonu için bitkide hücre duvarının, hücre içi madde ve organellerinin uzaklaştırılması ve nükleik asitlerin ayrıştırılması için parçalanması

gerekmektedir. Bu işlem için yaygın olarak sıvı azot yardımıyla dondurma ya da ekstraksiyon çözeltisi ile havan içerisinde ezme işlemleri kullanılmaktadır. DNA'nın ekstraksiyon çözeltisine geçmesi için hücre duvarlarının parçalanması, protein ve polisakkaritlerin denatüre edilmesi işlemi genellikle SLS ("Sodyum lauril sarkosil"), SDS ("Sodyum dodesil sülfat") veya CTAB ("Cetyl methyl tri-ammonium bromide") gibi deterjanlar kullanılmaktadır. DNA'nın hücre içinde açığa çıkan nükleazlardan korunması için EDTA ("Ethylene di-amin tetra acetic acid") veya proteazlar kullanılmaktadır. EDTA, nükleazların çalışması için kofaktör olarak görev yapan $MgCl_2$ iyonlarını (Mg^{+2}) bağlayıp şelatlaştırarak uzaklaştırmaktadır. DNA'dan proteinlerin uzaklaştırılması ve proteinlerin parçalanması için kloroform veya fenol çözeltisi içerisinde ya da ikisi kombinasyon halinde uygulanmaktadır (Williams vd 1993, Vos vd 1995).

DNA kalite ve miktarını etkileyen en önemli faktörlerden biride bitki dokusunun yaşı olarak bilinmektedir. Büyüme sezonunun sonlarına doğru, olgun yapraklardan elde edilen DNA'nın saflaştırılması, kalın hücre duvarı, yüksek oranda endonükleaz, polisakkarit, fenolik bileşik içeriği nedenleriyle oldukça zordur (Karaca vd 2005b). Etkili bir DNA ekstraksiyonunu etkileyen faktörlerin başında gelen polifenoller ve polisakkarit kalıntısı dikkat çekmektedir. Polifenoller ekstraksiyondan sonra DNA'nın saklanması aşamasında okside olarak DNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. Polisakkaritler ise, DNA ile birlikte çökerek DNA'nın çözünmesini tamamen engelleyebilmekte ya da DNA çözünse bile, diğer aşamalarda enzim aktivitesini engellemektedirler. Polisakkaritlerin bu olumsuz etkileri doğrudan kirlilik yapan madde olmaları, kirlilik yapan diğer maddeleri de bünyesine bağlayarak dolaylı olarak DNA'nın temizlenmesine engel olmaları ve analizler sırasında kullanılan enzimlerin aktivitesine engellemeleri veya tamamen durdurmaları olarak bilinmektedir (Loomis 1974, Jobes vd 1995, Weishing vd 1995, Karaca vd 2002, Karaca vd 2005b). Çalışmada kullanılacak DNA ekstraksiyon yönteminin seçilmesinde çalışmanın amacına göre belirlenmesi ve uygulanan yöntemin diğer araştırmacılar tarafından kullanılabilecek şekilde açıkça ortaya konması önemlidir (Karaca vd 2005b).

2.8. RNA Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkilerde transkripsiyonel, fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin doğru bir şekilde yürütülebilmesi için bir diğer kritik aşama da yüksek kalitede ve tekrarlanabilirliği yüksek olan güvenilir RNA ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesidir. Farklı bitki türlerinin farklı doku ve organlarında yeterli miktarda ve yüksek kalitede RNA ekstraksiyonu için günümüze değin geliştirilmiş çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler içeriklerinde bulundurdıkları etkin kimyasal maddelere göre adlandırılmaktadır (Carra vd 2007, Wang vd 2008, Ince ve Karaca 2009).

Tıpkı DNA ekstraksiyonunda olduğu gibi RNA ekstraksiyonunda da ana problem hücrelerde bulunan polisakkaritler, nişasta, fenolik bileşikler ve flavonoidler olarak sıralanabilmektedir. DNA ekstraksiyonundan farklı olarak çoğu bitki türünde mevcut içsel ribonükleaz (RNaz) aktivitesi nedeniyle bütün, kırılmamış, degrades olmamış RNA elde etmek oldukça güç bir işlemdir (Almarza vd 2006). Bazı RNA izolasyon yöntemlerinde aktif olarak yüksek konsantrasyonlarda guanidin thiosiyanat (guanidine thiocyanate) ve CTAB, LiCl, üre (urea) gibi RNazları inaktif eden farklı denatürant kimyasallar ve kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Carra vd 2007, Wang vd 2008).

Çoğu RNA ekstraksiyon protokolünde genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için asitik fenol-kloroform veya kloroform aşamasından sonra DNaz (DNase) uygulaması yapılmaktadır (Almarza vd 2006, Portillo vd 2006, Chomczynski ve Sacchi 2006, Manickavelu vd 2007, Wang vd 2008, Karaca vd 2002, Carra vd 2007, Chen vd 2003).

Günümüzde TRIZOL ve TRIZOL LS (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), TRI Reagent (Molecular Research Center, INC, Ohio, USA), EZ-RNA (Biological Industries, Israel), RNeasy (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) ve RNAqueous (Ambion, Inc., Austin, USA) isimler altında ticari kitler bulunmaktadır (Chomczynski ve Sacchi 2006, Manickavelu vd 2007, Karaca vd 2004, Santiago-Vazquez vd 2006). Bazı makalelerde mevcut ticari kitlerin problemli olmayan dokularda toplam RNA ekstraksiyonu için harcanan zamanı kısalttığı belirtilmiş olsa

da (Karaca vd 2004) ekstraksiyon yapılması zor olan dokularda RNA ekstraksiyonunun 10-20 saatin üzerinde bir zamanda yapılabildiğinin belirtildiği kaynaklarda mevcuttur (Ince ve Karaca 2009). Ayrıca mevcut RNA ekstraksiyon kitlerinin büyük çoğunluğunun pahalı olduğu, çevre dostu olmadığı ve gelişmekte olan ülkeler için kit bulabilmenin kolay olmadığı bilinmektedir.

Wang vd (2008) 16 bitki türünün birkaç doku ve organında RNA ekstraksiyonu için geliştirdikleri CTAB-PVPP tabanlı modifiye edilmiş metotlarında verim ve diğer kalite kriterlerinin olgun ve kuru tohumlarda yeteri kadar elde edilemediğini belirtmişlerdir. Camacho-Villasana vd (2002) biber dokuları üzerinde yaptıkları RNA ekstraksiyon metodu çalışmalarında çok daha uzun süre alan ve fazla GITC konsantrasyonunun kullanıldığı protokollerinde RNA miktarını maksimum 250 µg/g elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında RNA ekstraksiyonu için EZ-RNA kiti denenmiş ancak çoğu biber dokusunda oldukça yüksek polisakkarit RNA ile birlikte izole edilebilmiş elde edilen RNA'lar çalışmada kullanılacak kalite ve miktarda olmadıkları tespit edilmiştir. Ayrıca Hot Borate metodu ve CTAB tabanlı başka bir yöntem denenmiş ve bu yöntemlerinde çalışmada RNA ekstraksiyonunda etkin bir şekilde kullanılamayacağı belirlenmiştir (Ince ve Karaca 2009).

Günümüze değin yapılan mevcut çalışmalar içerisinde MAGi RNA ekstraksiyon protokolü ile çoğu bitki türünde çalışabilen ve bitkinin tüm doku, organ ve gelişme dönemlerinde etkin şekilde yüksek kalite ve kantitede RNA elde edildiği belirtilmiştir. *C. annuum* biber türü Demre Sivrisi çeşidine ait 16 farklı doku, organ ve gelişme dönemine özgü toplam RNA izolasyonu aralarında bezelye, pamuk, kabak gibi 16 farklı bitki türüne ait olgun tohumlardan etkin bir şekilde RNA ekstraksiyonu gerçekleştiren The MAGi RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak biberde zor olan RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Ince ve Karaca 2009).

3. MATERİYAL ve METOT

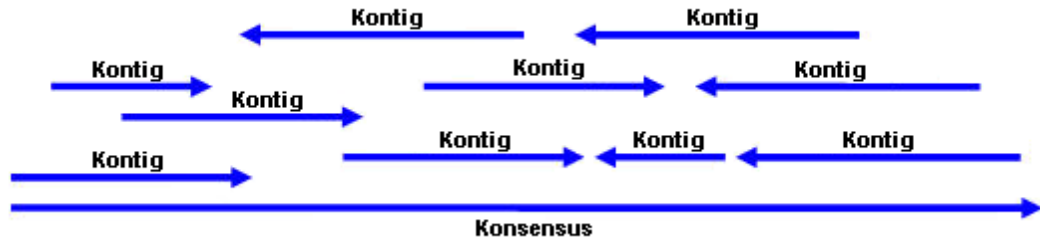
3.1. *In silico* Analizler

In silico çalışmalarda kullanılmak üzere GenBank [National Center for Biotechnology Information (NCBI, <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/dbEST/>)] veri tabanından *Capsicum annuum* L.'ye ait 20738 EST verisi alınmıştır. Çalışmada yaprak dokusuna ait 5145, çiçek tomurcuğuna ait 3524, kılcal kök dokusuna ait 1926, genç kök dokusuna ait 1893, plasenta dokusuna ait 3903, 0.5-2 cm uzunluktaki genç meyve dokusuna ait 3681 ve anter dokusuna ait 666 EST verisi kullanılmıştır.

3.1.1. Kontig analizleri

Çalışmada kullanılan EST'ler Sequencher 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) biyoinformatik yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kontig analizlerinde %95'in üzerinde homoloji gösteren EST verileri aynı sekans olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada analiz parametresi olarak iki EST sekansı arasında en az %95'lik homoloji ve iki EST'nin uç kısımlarında en az 50 nükleotitin bire bir eşleşerek uyumu kriterleri uygulanarak EST'ler analiz edilmiştir (Şekil 3.1). Bu analiz yardımı ile birbirlerine çok benzeyen EST'ler belirlenmiş ve istatistik analizleri için uygun veriler elde edilmiştir. Şekil 3.1'de gösterildiği üzere EST'ler Sequencher programı kullanılarak konsensus veya diğer bir isimlendirme ile devamlı diziler bütününe (DDB) dönüştürülmüştür. Homoloji göstermeyen EST'ler ise singletons veya teksel diziler (TD) olarak gruplandırılmıştır. Organ, doku ve gelişme dönemine özgü kontig ve singletonlar daha sonra mini veri bankasına dönüştürülmüştür.



Şekil 3.1. Kontig analizleri ile konsensusların belirlenmesi

3.1.2. Mini veri bankasının (MVB) oluşturulması

Çalışmada kontig analizleri ile kullanılan EST'lerin 7009 adedi diğer EST'ler ile homoloji göstermemesi nedeni ile TD grubunda yer almıştır. 13729 EST ise analiz kriterlerine dayanılarak 2984 adet DDB haline çevrilmiştir. Her bir TD ve DDB bu çalışmada entry anlamına gelen kalem olarak isimlendirilmiştir. Kalemler Doç. Dr. Mehmet Bilgen (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) tarafından geliştirilen bir yazılım programı kullanılarak GenBank EST dosya formatında dönüştürülmüştür.

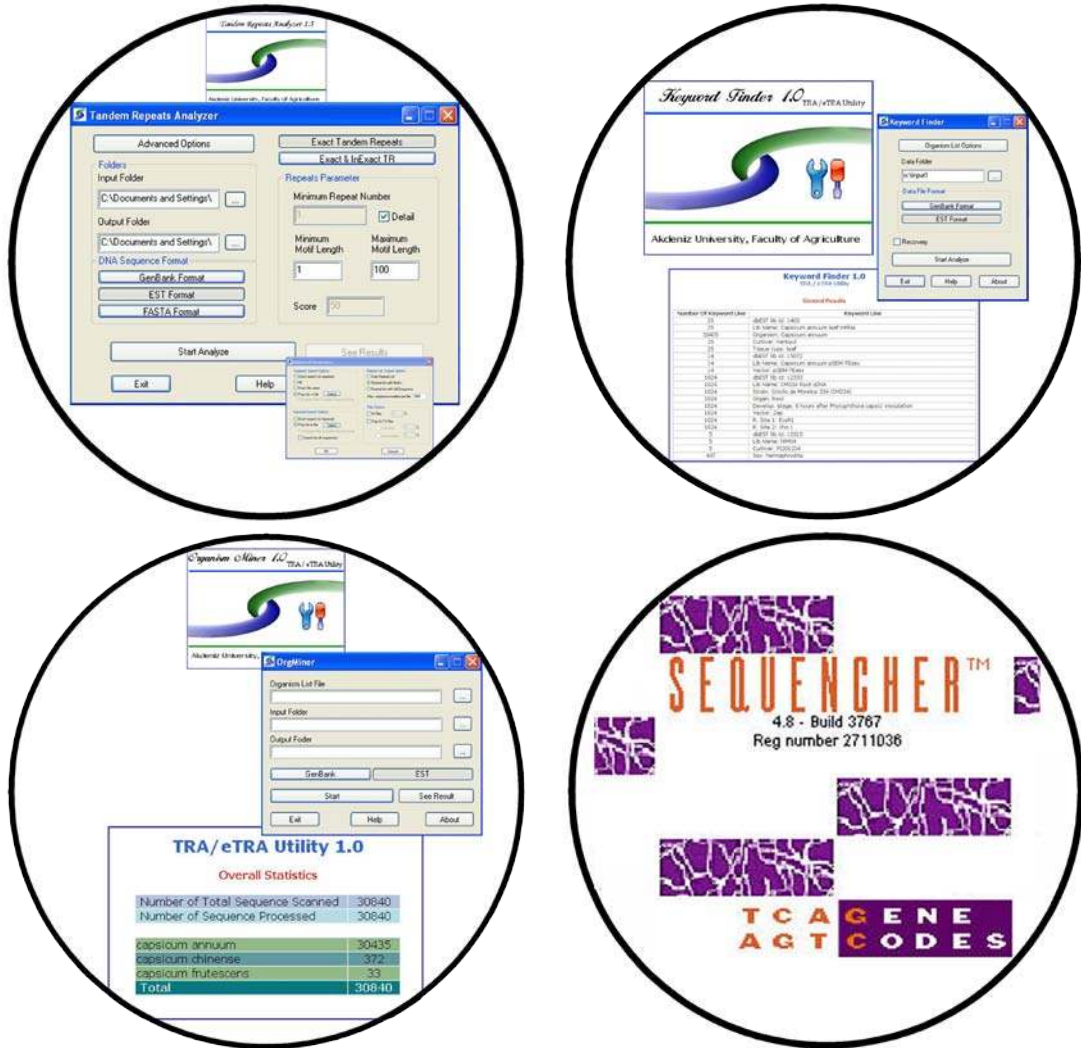
GenBank EST formatına dönüştürülen TD ve DDB kalemleri OrgMiner programı (Ince vd 2008) yardımıyla ayrı ayrı dosya adları altında toplanmıştır. OrgMiner çıktıları kullanılarak her bir doku veya gelişme dönemine özgü DDB ve TD'ler 3 tip veya grup altında incelenmiştir. Birinci gruba sadece tek bir doku veya gelişme döneminde bulunan EST'lerden elde edilen TD'ler dahil edilmiş ve diğer gruplardan ayırmak için TD özel bir dokuya özgü anlamına gelen spesifik [S] grubu altında toplanmıştır.

İkinci grup ise sadece tek bir doku veya gelişme döneminde bulunan DDB'lerden veya konsensustan oluşturulmuş ve doku veya gelişme dönemine spesifik konsensus veya DDB anlamına gelen konsensus spesifik [KS] adı altında gruplanmıştır. Her bir doku veya gelişme dönemine özgü konsensus oluşturan EST'ler bu grupta yer almıştır.

Üçüncü grup en az iki veya daha fazla doku veya gelişme döneminde ortak bulunan DDB'lerden oluşturulmuştur. Bu gruba giren kalemler ortak DDB anlamına gelen Konsensus ortak [KO] adı altında gruplandırılmıştır. Bu çalışmada toplam 7 doku veya gelişme dönemi kullanılmış olup her doku veya gelişme dönemine ait kalemler S, KS ve KO adı altında gruplandırıldıktan sonra düzenli ve değişken mikrosatellit frekansları ve dağılımları belirlenmiştir.

3.2. Düzenli Mikrosatellitlerin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan S, KS, KO kalemleri sekanslarında var olan düzenli tekrar gösteren mikrosatellitler “Tandem Repeats Analyzer 1.5” (Bilgen vd 2004) biyoinformatik programının “Exact” modülü kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada birden fazla biyoinformatik programı kullanılmış ve bazıları Şekil 3.2 gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bazı biyoinformatik yazılım programları

Mikrosatellit motif uzunluğu olarak 1 ile 6 nükleotit uzunluğundaki düzenli tekrarlar incelenmiştir. Mononükleotit mikrosatellitler en az 18 Adenin [A], veya Timin [T] veya Guanin [G] veya Sitozin [C] bazından oluşturulmuştur. Dinükleotit

mikrosatellitler için en az 9, trinükleotit en az 7, tetranükleotit ve pentanükleotit en az 5 ve hekzanükleotit mikrosatellitler en az 4 tekrarlı bazlardan oluşturulmuştur.

GenBank verilerinde bulunan DNA verilerinin kural olarak her zaman 5' → 3' yönünde olduğu kabul edilmektedir. Ancak kontig analizlerinde EST verilerinin oluşturduğu eşlemelerde bazı EST ileri (5' →) sekanslar ile diğer bazı EST'lerin geri (3' ←) sekanslarının kontig oluşturdukları tespit edilmiştir. Mikrosatellitlerin baz içerikleri yönünden sınıflandırılmasında Lawson ve Zhang (2008) tarafından da belirtildiği gibi yönü belirtilmemiş bir DNA üzerinde bulunan bir mikrosatellitin tekrar yönünün bilinmesi mümkün değildir. Bu nedenle örneğin [AGAGAGAGAG] tekrarı ile [GAGAGAGAGA] tekrarı birbirinin aynısı olabilir. Diğer taraftan DNA molekülünün çift sarmallı oluşu ve her bir sarmalın birbirine zıt ve komplementer olan iki iplikten oluşması nedeniyle [AGAGAGAGAG] tekrarı ile [TCTCTCTCTC] tekrarı aynı tekrarlardır (Lawson ve Zhang 2008).

3.3. Değişken Mikrosatellitlerin Belirlenmesi

Çalışmada oluşturulmuş olan S, KS ve KO kalemli sekanslarında var olan değişken mikrosatellitler Tandem Repeat Analyzer 1.5 (Bilgen vd 2004) biyoinformatik programının “InExact” modülü kullanılarak saptanmıştır. Mikrosatellit motif uzunluğu olarak ise yine 1 ile 6 nükleotit uzunluğundaki değişken mikrosatellitler incelenmiştir.

3.4. *In silico* Veri Analizleri

3.4.1. MVB bulunan S, KS ve KO kalemlerin analizleri

3.4.1.1. Dokuya özgü ve diğer altı dokuda ortak mikrosatellitlerin frekans analizleri

MVB üzerinde bir dokuya özgü ve o doku haricinde kalan altı dokuda ortak kalemlerde bulunan mikrosatellit bulundurma frekanslarının analizleri yapılmıştır (Şekil 3.3). Şekil üzerinde A harfiyle adlandırılan doku (bu alan bu dokuya özgü S ve KS kalemlerinden oluşturulmuş olan sekans verilerini kapsamaktadır) ile AB, AC, ABC harfleriyle gruplandırılan (bu bölüm KO kalemlerinden oluşturulmuş olan

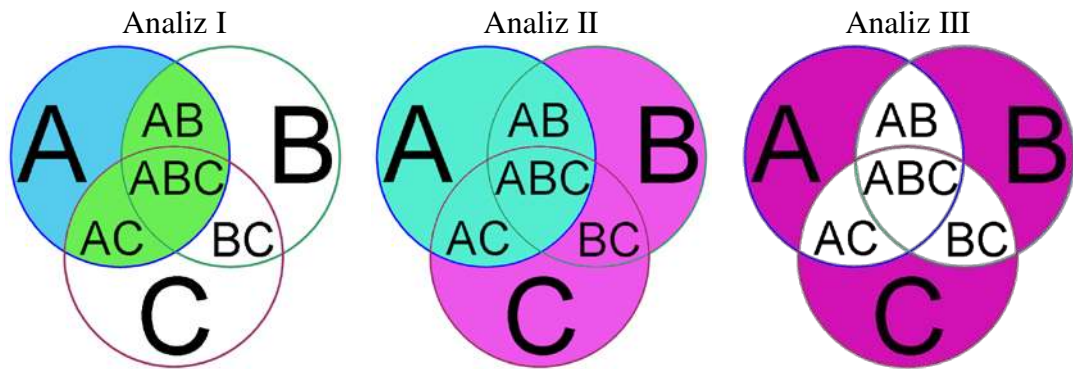
sekans verilerini kapsamaktadır) dokular arası ortak kalemelerde bulunan mikrosatellit yoğunlukları karşılaştırılmış ve bu tür karşılaştırmalar Analiz I olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.3).

3.4.1.2. Dokular arası mikrosatellit frekans analizleri

Dokular arası analiz yönteminde bir dokuya veya gelişme dönemine özgü S, KS ve KO kalemelerde yer alan sekans verileri ile diğer toplam altı doku veya gelişme dönemlerine ait S, KS ve KO kalemelerde bulunan sekanslar karşılaştırılmış ve bu tür karşılaştırmalar Analiz II olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.3). Şekilde A, AB, AC, ABC bölgelerinin kapsadığı tüm kalemeler (bir dokuya ait S, KS ve KO kalemelerini) ile B, C, BC (diğer dokuya ait S, KS ve KO) bölgelerinin kapsadığı tüm alan içerisinde kalan kalemelerde bulunan mikrosatellit yoğunlukları belirlenerek analizleri yapılmıştır (Şekil 3.3).

3.4.1.3. Dokuya özgü mikrosatellit frekans analizleri

MVB kullanılarak uygulanan son analiz olarak salt bir dokuya veya gelişme dönemine özgü olan gen gruplarına ait kalemeler (S ve KS) birebir birbirleriyle kıyaslanarak analizleri yapılmış ve bu tip analizler Analiz III olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.3). Şekil üzerinde sadece A ile B bölgesinin arasındaki ya da sadece A ile C bölgesi içerisinde kalan kalemelere ait mikrosatellit yoğunlukları tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Çalışmada mikrosatellitlere uygulanan analizlerin grafiksel gösterimi

3.4.2. Ki-Kare uygunluk testi ile mikrosatellit yoğunluğunun analizi

Çalışmada belirlenmiş olan S, KS ve KO kalemlerinde yer alan mikrosatellit sıklıkları (densiteleri veya frekansları) arasında farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek amacıyla ki-kare (χ^2) testi serbestlik derecesi (SD) “1” alınarak uygulanmıştır. Mikrosatellit densitesi (frekansı veya yoğunluğu) her bir Mega baz (Mb) uzunlukta bulunan mikrosatellit sayısı olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz olarak Ki-Kare (χ^2) testi uygulanırken S, KS ve KO kalemleri yeniden isimlendirilerek Tip I ve Tip II grupları olarak adlandırılmıştır. Düzenli ve değişken mikrosatellit densitesi veya frekansı (sıklığı veya yoğunlukları) 3 farklı analiz (Analiz I, II ve III) kullanılarak belirlenmiştir. Her bir analizde Tip I ve Tip II farklı gen gruplarını nitelemekte olup Tip I ile Tip II genleri arasında H_0 hipotezi olarak farklılık bulunmadığı ve H_1 hipotezi olarak farklılığın önemli olduğu varsayılmıştır. χ^2 değerlerinin önemli olup olmadığı ise GraphPad yazılım programı kullanılarak internetten (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/pvalue1.cfm>) hesaplanmıştır. P değerinin 0.01’e eşit veya küçük olması durumunda mikrosatellit içerikleri arasında farkın istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Analiz I’de 7 farklı çalışma gerçekleştirilerek tek bir dokuya özgü kalemlerle (S, KS) diğer altı dokuda bulunan KO karşılaştırılmıştır. Bu analizlerde Tip I bir doku veya gelişme dönemine özgü S ve KS kalemlerini, Tip II ise KO kalemlerini nitelemektedir. Analiz II’de de 7 farklı analiz yapılarak tek bir dokuya ait S, KS, KO kalemleri (Tip I) ile diğer altı dokuya ait S, KS ve KO kalemlerinin (Tip II) tamamı analiz edilmiştir. Analiz III’de ise salt dokuya özgü S ve KS kalemleri (Tip I) ile diğer bir salt dokuya özgü S ve KS kalemleri (Tip II) mikrosatellit frekansları yönünden incelenerek 21 farklı analiz gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada beklenen (expected) mikrosatellit sayısı Lawson ve Zhang (2008)’e göre aşağıda verilen formüle göre belirlenmiştir.

$$B_i = \frac{N}{L} * L_i$$

B_i : Tip I veya Tip II kalemlerinde beklenen mikrosatellit sayısı
 N : Tip I ve Tip II kalemlerinde gözlenen toplam mikrosatellit sayısı
 L : Tip I ve Tip II kalem sekanslarının baz toplamı (Mb)
 L_i : Tip I veya Tip II kalem sekanslarının baz toplamı (Mb)

χ^2 analizleri mikrosatellitlerin doküman farklılık gösterip göstermediklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i}$$

G_i : Tip I veya Tip II’de gözlenen mikrosatellit sayısı
 B_i : Tip I ve Tip II’de beklenen mikrosatellit sayısı
 n : analiz edilen unsur sayısı (bu çalışmada 2)
 χ^2 : Ki-Kare

3.5. Mikrosatellit Primer Setlerinin Dizaynı

Çalışmada belirlenmiş olan düzenli tekrarlı mikrosatellitlerin polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılabilmesi için mikrosatellit alanı veya domaininin sağ (üst veya ileri) ve sol (alt veya geri) uç veya kenarlarında bulunan DNA dizilerinden primer çiftleri belirlenmiştir. Primer çiftlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan Primer3 yazılım programı (<http://frodo.wi.mit.edu/>) kullanılmıştır (Rozen ve Skaletsky 2000).

Primer çiftleri veya setleri dizayn edilirken özellikle mikrosatellit bölgelerinin dışında kalan sekans bölgelerinden sağ ve sol dizi alanlarından primer dizayn yapılmıştır. Primer dizayn kriterlerinin başında dizayn edilen primer uzunlukları için uygulanan 18 ile 24 baz arasında değişen primer uzunluğu kriter olarak kullanılmıştır. Dizayn edilen primerlerin renatürasyon sıcaklıkları (T_m) dizayn esnasında 52°C ile 62°C arasında tutulmuş ancak seçim aşamasında 59°C ve 60°C’lik renatürasyon (annealing) sıcaklıklarına sahip primer setleri tercih edilmiştir.

Primer setleri belirlenirken diğer bir kriter olarak oluşabilecek ürün uzunluğu aralığı (amplikon büyüklüğü) 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000 bp olarak verilmiştir. Sekans üzerinde çoğaltılması hedeflenen mikrosatellit alanı belirtilirken köşeli parantez “[]” işareti ile hedef bölge gösterilirken primer dizayn edilmesi istenmeyen sekanslar ise sınırlandırma işaretleri “<>”

kullanılarak belirlenmiştir. Örneğin ATCT[CGCC]TCAT bölgesi özellikle primer setlerinin CGCC bölgesinin sağından ve solundan primer dizaynı hedeflenmişken, ATCT<TGCT>TCAT sekansında TGCT bölgesinden herhangi bir primerin dizayn edilmemesi gerektiği ifade edilmiştir.

Dizayn edilen primer setlerinin % Guanin-Sitozin (GC) oranı ise en az %40 ve en fazla %80 arasında değişim aralığında tutulmuştur. Primer dizaynı için GC oranının yüksek tutulmasıyla primerin renatürasyon sıcaklığı doğru orantılı olarak yüksek olacağından spesifik olmayan bölgelerin çoğaltılmasının önlenmesi planlanmıştır.

Dizayn edilen primerler için önemli diğer bir kriter ise dizayn edilen primerlerin kendi üzerinde komplementeri olmayan sekanslardan yararlanılmaktır. Bu çalışma için toplam 24 bazlık bir primer için en fazla 3 bazın aynı primerde komplementeri riski (sekonder DNA yaplanması) göz önüne alınmıştır. Dizayn edilen primer çiftlerinin birbirleri üzerinde komplementer sekansları bulundurma sınırı yine 3 baz olarak sınırlandırılmıştır. Bu değerin üzerinde genellikle primer dimer yapı oluşturma riski bulunmaktadır. Bu çalışmada 24 bazlık iki primer arasında en fazla 3 bazın komplementerisinde bağlanabilme olasılığına izin verilmiştir.

3.6. *In vitro* Analizleri

Araştırmanın *in vitro* analizleri 2006-2009 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Tarla Bitkileri Bölümü ve Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi uygulama arazisi ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. *In vitro* analizler ile ilgili çalışmalar sırasıyla DNA analizleri, RNA analizleri ve cDNA sentezi olmak üzere gruplanarak aktarılmıştır.

3.7. DNA Analizlerinde Kullanılan Bitki Materyalleri

Araştırmada model bitki materyali olarak ülkemizin önemli standart biber çeşitlerinden olan Demre Sivrisi biber çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşit Antalya ve çevresinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Bitkileri orta güçlü ve yarı açık habitüslü, ortalama meyve ağırlığı 40-50 g, meyve boyu 11-20 cm, meyve çapı 2.5-3.5 cm, meyve rengi yeşil, tohum bin tane ağırlığı 6.5-7.5 g, meyve tadı çevresel faktörlere

bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle acı, meyve verimi 60-80 ton/ha olan bu çeşit sofralık ve turşuluk olarak tüketilmektedir. Bütün bu özelliklerinin yanında ülkemizin yerli standart çeşitlerinden birisi olması nedeniyle de ıslah çalışmaları için önemli bir kaynak niteliğindedir (Ince vd 2010c).

DNA analizi aşamasında Demre Sivrisi biber çeşidi ile birlikte Hindistan'da yerel bir populyondan elde edilmiş ve *Xanthomanas vesicatoria* bakteriyel hastalığına, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica* kök ur nematodlarına dayanıklı bir hat olan PM687 ve *C. frutescens* türüne ait SA36 aksesyonu kullanılmıştır. Bu bitkiler DNA analizleri *in silico* yöntemler kullanılarak dizayn edilen primerlerin etkin bir şekilde çalışıp çalışmadığının teyidinin yanı sıra bu primer çiftlerinin tür içi (intraspesifik) (*C. annuum*) ve türler arası (interspesifik) (*C. annuum* ve *C. frutescens*) kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada Demre Sivrisi, PM687 ve SA36 yanı sıra BP225, BYE6788, C13 (*C. annuum* L.), SA219 (*C. baccatum* L.), SA426, SA184 (*C. chacoense* L.), BP605 (*C. chinense* L.), SA218 (*C. frutescens* L.)'in genomik DNA'ları kullanılmıştır. Ayrıca *Solanaceae* familyasına ait patlıcan (*Solanum melongena* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), patates (*Solanum tuberosum* L.) ve domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkilerinden de farklı örnekler alınarak çalışma kapsamında geliştirilmiş olan mikrosatellit primer setlerinin kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Demre Sivrisi biber çeşidi ve PM687 biber hattının melezlenmesi yoluyla elde edilen F₁ bitkisinin kendilenmesi ile elde edilmiş olan F₂ bitkilerinden değişik sayıda örnek belirlenerek F₂ bitkileri üzerindeki mikrosatellit lokuslarının segregasyon paternlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

In vitro çalışmalarında kullanılmak üzere *C. annuum*'a ait Demre Sivrisi biber çeşidi, geleneksel üretim sistemlerine tabi olarak ve açık alanda saksılarda 144 bitki yetiştirilmiştir (Şekil 3.4). Yetiştirmede tohumlar fide dönemine kadar sera şartlarında büyütülmüş ve daha sonra her bir bitki 60 litrelik saksılara şaşırtılmıştır. Saksılar 1/3 oranında torf, 1/3 oranında toprak ve 1/3 oranında perlit eklenerek hazırlanmıştır.

Gübreleme ve sulama düzenli olarak uygulanmıştır. Örnek toplamadan en az 20 gün önce gerekli olan durumlarda kırmızı örümceğe ve beyaz sineğe karşı kimyasal mücadele yapılmıştır.

PM687 çeşidi Ayer Tarım Şirketinden, diğer *Capsicum* cinsine bağlı türlere ait aksesyonlar ise İngiltere Reading Üniversitesi'nden temin edilmiştir. DNA çalışmaları için her bir örnek toplama işlemi için sağlıklı bitkilerin 15. boğumundaki sağlıklı yapraklarından 50 ml'lik steril test tüplerine sıkıştırmadan toplanarak buz üzerinde bekletilmiş etiketlenen örnekler DNA ekstraksiyonu işlemine kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Demre Sivrisi (DS) biber çeşidinin yetiştirilmesi. Toplam 144 adet bitki açık alanda yetiştirilmiş ve çalışmada DNA ve RNA izolasyonlarında kullanılmıştır

3.8. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Bitkilerde DNA izolasyonu, moleküler düzeyde yapılacak analizlerin başlangıç noktasıdır. DNA izolasyon yöntemleri bitki türleri, doku tipleri veya kullanılacak örneklerin hücresel özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir. DNA'ya bağlı yapılan

tüm analizlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu etkileyen faktörlerin başında DNA kalitesi, saflığı ve miktarı yer almaktadır.

Bu araştırmada kullanılan bütün bitki materyaline ait DNA'lar laboratuvarımızda kullanılan ve çok sayıda türde başarı ile çalıştığı tespit edilen CTAB tabanlı DNA ekstraksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforesiz yöntemlerle elde edilen DNA'nın kalite ve kantitesi belirlenmiştir (Karaca vd 2005b).

3.8.1. Ekstraksiyon çözeltisi

Ekstraksiyon çözeltisinin hazırlanması için gerekli stok solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

2 M D-Sorbitol stoğu (MA 182.18, Amresco) hazırlanırken 36.436 g sorbitol tartılarak 60 ml distile steril su ilave edilerek ısıtılarak çözölmüş ve hacmi 100 ml'e tamamlanıp, 0.42 mikron çapında filtre ile sterilizasyonu yapılmış ve 4°C de saklanmıştır.

2 M TRIS-HCl stoğu (pH 7.5) (MA 121.14, Amresco) için 242.28 g TRIS-HCl tartılıp 600 ml distile steril su ilave edilerek ısıtılarak çözölmüştür. Çözöldükten ve sıcaklığı düştükten sonra 980 ml'ye kadar su ilave edilmiş, pH metre ile hidroklorik asit (%37.2, HCl) kullanılarak pH 7.5'a ayarlanmış, hacim 1000 ml'ye tamamlanıp, otoklavda 121°C 20 dk süre ile sterilize edilmiştir.

0.5 M EDTA stoğu (pH 7.5) (MA 372.2, Amresco) için 186.1 g EDTA tartılmış ve 600 ml distile steril su ilave edildikten sonra yaklaşık 16 g sodyum hidroksit (NaOH) pelleti ilave edilmiş ve ısıtılarak çözölmüştür. Çözöldükten sonra uygun sıcaklıkta 980 ml'ye kadar steril distile su eklenmiş ve NaOH pelleti atılarak pH 7.5'e ayarlanmış ve hacmi 1000 ml'e tamamlanıp, otoklavda 121°C 20 dk süre ile sterilizasyon yapılmıştır.

DNA ekstraksiyonu iki ana çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk çözelti ekstraksiyon çözeltisi olarak isimlendirilmiş ve bir örnek için toplam 10 ml

kullanılacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Çizelge 3.1’de belirtildiği sıra ile çözeltiler ilave edilerek stok ekstraksiyon çözeltisi içerisinde β -merkapto ethanol (β -mercapto-ethanol, BME) eklenmeden hazırlanmış ve magnetik bir karıştırıcı üzerinde 15 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan DNA ekstraksiyon çözeltisinden çalışılacak örnek sayısına uygun miktar steril Pireks cam şişe içerisine ölçülerek uygun oranda %1’lik BME olacak şekilde ilavesi ise çalışmaya başlamadan hemen önce yapılmıştır. BME ilavesi yapılmadan bu DNA ekstraksiyon çözeltisi 1 ay süre ile muhafaza edilebilmektedir.

Çizelge 3.1. DNA ekstraksiyon çözeltisinin bileşimi

<i>Kimyasal</i>	<i>Stok</i>	<i>Final</i>	<i>Miktar*</i>
Sorbitol	2 M	0.35 M	17.5 ml
TRIS-HCl (pH 7.5)	2 M	100 mM	5 ml
EDTA (pH 7.5)	0.5 M	5 mM	1 ml
Triton X-100	%100	%2	2 ml
Tween-20	%100	%1	1 ml
BME	14.4 M (%100)	%1	1 ml
Steril-H ₂ O			72.5 ml
Toplam Hacim			100 ml

*: Bu hacim 10 farklı DNA ekstraksiyon için gerekli miktar olup örnek sayısı fazlalığında artırılarak uygulanmıştır

3.8.2. Lezyon çözeltisi

Ekstraksiyon metodunda kullanılan ikinci çözelti ise lezyon çözeltisi olarak isimlendirilmiştir. Bu çözeltinin hazırlanabilmesi için gerekli stok solüsyonların hazırlanışı sırasıyla aşağıda verilmiştir.

2 M TRIS-HCl stoğu (pH 8.0) (MA 121.14, Amresco) için 242.28 g TRIS-HCl tartılıp 600 ml distile steril suda magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözülmüştür. Çözöldükten sonra sıcaklığının düşmesi için bekletilmiş ve 980 ml’ye kadar su ilave edilmiş, HCl kullanılarak pH 8.0’e ayarlanmış ve hacmi 1000 ml’ye tamamlanıp, 121°C 20 dk sürede otoklav ile sterilizasyonu yapılmıştır.

0.5 M EDTA stoğu (pH 8.0) (MA 372.2, Amresco) için 186.1 g tartılmış 600 ml distile steril su ilave edildikten sonra 16 g NaOH pelleti konup ısıtılarak çözülmesi sağlanmıştır. Çözülünce ısısının düşmesi için bekletilmiş 980 ml'ye kadar steril distile su eklenmiş ve NaOH pelleti ilave edilerek pH 8.0'e ayarlanmış, hacmi 1000 ml'e tamamlanıp, otoklavda 121°C 20 dk süre ile sterilize edilmiştir.

5 M Sodyum klorür ["Sodium chloride" (NaCl), MA 58.44, Amresco] stoğu hazırlanırken 146.1 g tartılıp 300 ml distile steril su ilave edilmiş ve çözülmesi için magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak karıştırılmıştır ve hacmi 500 ml'e tamamlanıp, otoklavda 121°C 20 dk süre tutularak sterilize olması sağlanmıştır.

8 M Lityum klorür ["Lithium chloride" (LiCl), MA 42.39, Amresco] stoğu için 339.12 g LiCl tartılıp 600 ml steril distile su ilave edilmiş ve karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözülmüştür. Hacmi 1000 ml'e tamamlanıp, otoklavda 121°C 20 dk sürede sterilizasyon yapılmıştır.

%5 Sodyum lauil sarkosil ["Sodium lauryl sarcosinate" (SLS), MA 293.38, Amresco] stoğu hazırlanırken 5 g SLS tartılıp 80 ml'de karıştırılarak çözülmüş ve toplam hacmi 100 ml'e tamamlanıp, 0.42 mikron çapında filtre ile sterilize edilmiştir.

Saf etil alkol saf %99.5'luk etil alkol (Merck) direkt kullanılırken %70'lik ethanol toplam 100 ml hacimde 70 ml Saf ethanol içerisine 30 ml steril su ilave edilerek hazırlanıp kullanılmıştır.

Kloroform:Izoamil alkol (CIA 24:1 (Choloroform:Isoamyl alcohol), Amresco) karışımı için 240 ml Kloroform mezur ile ölçülerek üzerine 10 ml Izoamil alkol ilave edilerek hazırlanmıştır.

3 M sodyum asetat ["Sodium acetate" (NaOAc), pH 5.2, MA 82.03, Amresco] stoğu hazırlanırken 24.609 g tartılıp 60 ml'de çözülmüştür. Glasiyel asetik asit (glacial acetic acid) ile pH 5.2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'e tamamlanıp, 121°C 20 dk sürede otoklav edilmiştir.

İki farklı pH değerinde TRIS-EDTA çözeltisi TRIS ve EDTA stokları kullanılarak T₁₀E₁ (10 mM TRIS ve 1 mM EDTA, pH 7.5) ve T₁₀E₁ (10 mM TRIS ve 1 mM EDTA, pH 8.0) çözeltileri şeklinde hazırlanmıştır. 50 ml T₁₀E₁ (pH 7.5) için 500 µl 1 M TRIS (pH 7.5) ve 200 µl 0.25 M EDTA (pH 7.5) ve 49.3 steril su ilave edilerek hazırlanmıştır. T₁₀E₁ (10 mM TRIS ve 1 mM EDTA, pH 8.0) çözeltisi ise aynı miktarlarda ancak pH 8.0 olan TRIS ve EDTA solüsyonlarından yararlanarak hazırlanmıştır.

Lezyon çözeltisi stok solüsyonlar kullanılarak çalışmaya başlamadan önce hazırlanmış ve her bir örnek için toplam 4 ml kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Lezyon çözeltisi 100 ml'lik steril Pireks şişe içerisine öncelikle 2 g CTAB tartılmış üzerine 2 g PVPP tartılarak eklenmiş ve Çizelge 3.2'de belirtilen sıra ile diğer solüsyonlar ilave edilmiş ve lezyon çözeltisi kullanılıncaya kadar 65°C sıcaklıkta olan su banyosunda inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.2. Lezyon çözeltisi bileşimi

<i>Kimyasal</i>	<i>Stok</i>	<i>Final</i>	<i>Miktar*</i>
CTAB	MBA, toz	%2	2 g
PVPP	MBA, toz	%2	2 g
TRIS-HCl (pH 8.0)	2 M	200 mM	10 ml
EDTA (pH 8.0)	0.5 M	50 mM	10 ml
NaCl	5 M	2 M	40 ml
Triton X-100	%100	%2	2 ml
BME	14.4 M (%100)	%2	2 ml
Steril-H ₂ O			30 ml
Toplam Hacim**			100 ml

*: Bu hacim 25 farklı DNA ekstraksiyon için gerekli miktar olup örnek sayısı fazlalığında artırılarak uygulanmıştır. **: toplam hacim 100 ml olacak şekilde steril su ilave edilerek hazırlanmıştır

Çözelti 65°C inkübe edilerek olgunlaştırıldıktan sonra örnek sayısına göre steril Pirekslere bölünmüş ve %2'lik BME ilavesi ise çalışmaya başlamadan hemen önce yapılmıştır.

3.9. DNA Ekstraksiyon Protokolü

1. Mekanik olarak ve dondurarak hücre duvarlarının parçalanması ve ekstraksiyon çözeltisinin kolay işlemesi için doku yüzeyinin arttırılması amacıyla sıvı azot ile dondurarak ezme işlemi yapılmıştır. Ezme işleminde havan içerisine 100 mg toz halinde ve suda çözünmeyen özelliğe sahip PVPP eklenerek üzerine -80°C’de muhafaza edilmiş olan taze yaprak parçacıklarından 4 g tartılıp havaneli ve sıvı azot aracılığıyla toz haline gelene kadar öğütülmüş, öğütülen doku sıvı azot yardımıyla 28 ml’lik bir “Nalgene Oak Ridge” tüpe dökülerek aktarılmıştır. Havan içerisine başlangıçta eklenen PVPP ezme esnasında ortaya çıkan fenolik bileşiklere bağlanarak enzimsel aktivitelerden kaynaklanabilecek oksidasyonun önlenmesi için kullanılmıştır.
2. Sıvı azotun tamamen buharlaşması için tüp 10 dakika granüle buz üzerinde bekletilmiştir. Bu aşamada sıvı azotun tam olarak buharlaşmaması durumunda çözelti ilave edildiği anda buzlanabilmekte ve ezme işlemi zorlaşabilmektedir.
3. Sıvı azot tamamen buharlaştıktan sonra tüp içerisine 10 ml DNA ekstraksiyon çözeltisi (Çizelge 3.1) eklenmiş, 5 dakika vorteks cihazında kuvvetlice karıştırılarak toz halindeki doku parçacıklarının çözelti içerisinde tam olarak dağılmaları sağlanmıştır. Bu aşamada kimyasal yolla Sorbitol, Tween-20 ve Triton X-100 yardımıyla hücre duvarlarının parçalanması sağlanırken BME’de ortaya çıkan enzimsel faaliyetleri engelleyerek oksidasyonu önlemek amacı ile antioksidan olarak kullanılmıştır.
4. Tüp 4°C sıcaklıkta 9000 xg hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice dökülmüş ve sıvı fazda çözünmüş olan atıklar uzaklaştırılmıştır.
5. Tüp tabanına yapışmış durumdaki çökelti üzerine kullanmadan önce taze olarak hazırlanan ve 65°C’de bekletilen toplam 8 ml’lik lezyon [4 ml lezyon çözeltisi (Çizelge 3.2) ve 4 ml 8 M LiCl] çözeltisi eklenmiştir. Çökelti steril pipet ucu ya da cam çubuk kullanılarak solüsyon içerisinde dağıtılmış ve kuvvetlice vortekslenerek dokunun sıvı ile etkileşimi arttırılmıştır. Bu karışım üzerine daha sonra 2 ml %5’lik SLS solüsyonu ilave edilmiş ve vorteks cihazı yardımıyla kuvvetlice karıştırılmıştır. Bu aşamada güçlü bir deterjan olan CTAB ve bitki dokularında daha etkin bir deterjan olan SLS kullanılarak

hücre duvarları, hücre agregatları ve hücre içi organellerinin kimyasal yolla parçalanması, polisakkaritlerin uzaklaştırılması sağlanarak DNA'nın ortaya çıkartılması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda LiCl kullanılarak polisakkaritlerin ve küçük RNA'ların uzaklaştırılması ile ortaya çıkacak DNA'nın temiz olması sağlanmıştır.

6. Vorteksleme işleminden sonra tüp 65°C su banyosunda 30-35 dakika ve her 10 dakikada bir kez vorteks cihazında karıştırılmak suretiyle inkübe edilmiştir. Bu aşama uygulanan sıcaklık inkübasyonu ile hem kullanılan kimyasalların daha etkin çalışması sağlanmış hem de hücre membran yapıları, polisakkarit ve yağların çözülmesi ve nükleik asitlerin bağımsız olarak ortaya çıkması sağlanmıştır. Bu yöntemin polisakkaritlerce zengin dokularda ve kuru herbal örneklerinde inkübasyon süresinin 2 saate çıkarılması önemlidir.
7. Su banyosunda yapılan inkübasyon sonrası örnek tüpü granüle buz üzerine alınmış ve üzerine 10 ml CIA (24:1 h/h) eklenmiş ve nazikçe ters düz edilerek CIA'nın süspansiyonuna iyi bir şekilde karışımı sağlanmıştır.
8. Tüp 4°C sıcaklıkta 9000 xg hızda 10 dakika santrifüj edilerek oluşan 3 katmanın (faz) en üstteki süpernatantı 8 ml yeni bir 28 ml'lik steril "Nalgene Oak Ridge" tüpe dikkatlice transfer edilmiştir. Bu aşama yüksek santrifüj gücü uygulanarak faz ayırımından yararlanılmış, üst fazlarda nükleik asit, orta fazda protein, polisakkarit ve en alt fazda hücre kalıntılarının birikimi sağlanmıştır.
9. Sekiz mililitre olarak kurtarılan üst faz üzerine eşit hacimde yani 8 ml CIA eklenerek tekrar nazikçe ters düz edilmiş ve 4°C'de 5000 xg hızda 5 dakika santrifüj edilerek DNA'nın daha saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır.
10. Oluşan süpernatantın 6 ml'si yeni bir 28 ml'lik steril "Nalgene Oak Ridge" tüpe dikkatlice alınarak eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiş, üzerine 5 M NaCl stoğundan elde edilen toplam hacmin 1/20 oranında eklenmiştir. NaCl ilavesiyle elde edilen DNA'nın çözülerek çökmesi ve proteinlerden ayrılmasına yardımcı olunmuştur.
11. Örnek tüpünün 4°C'de 5000 xg hızda 3 dakika santrifüj edilmesiyle nükleik asitler tüpün tabanında toplanmıştır. Bu aşamayla nükleik asit çökeltilmiş ve

geri kalan polisakkarit ve protein gibi atıklar sıvı fazla birlikte uzaklaştırılmıştır.

12. Süpernatant pipet ile dikkatlice çekilerek uzaklaştırılmış tüp tabanında toplanmış olan nükleik asit çökeltisinin üzerine 1 ml TE pH 7.5 (10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 7.5) çözeltisi ve 0.1 ml 3 M NaOAc (pH 5.2) eklenerek nükleik asitlerin çözülmesi sağlanmıştır. Üzerine RNA moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla 10 µl RNaz (1 µg/µl) enzimi eklenerek 37°C de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Burada nükleik asitlerin pH 7.5 TE ile çözülmesiyle RNaz enziminin aktivitesi ve çalışma etkinliğinin sağlanması amaçlanmıştır. İlave edilen NaOAc nükleik asitlerin çözünürlüğünü arttırmak ve hızlandırmak için kullanılmıştır.
13. İnkübasyon sonrası tüpe 3 ml Saf ethanol eklenerek DNA çökeltilmiş ve 4°C'de 5000 xg hızda 3 dakika santrifüjlenerek tüpün tabanında tutturulmuş ardından süpernatant pipet ile uzaklaştırılmıştır. DNA pelleti üzerine %70'lik ethanol ilave edilerek yıkanmış ve 4°C'de 5000 xg hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir.
14. Süpernatant pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra DNA çökeltisi saç kurutma makinesi yardımıyla kurutularak 1 ml TE pH 8.0 (10 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. DNA pelleti çözüldükten sonra kalite ve kantitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforez metotları kullanılmış, DNA'nın uzun süreli muhafazası için -20°C'de saklanmıştır.

3.10. DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kantite ve kalitesi yaygın olarak kullanılan iki yöntemle, spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforesiz yöntemleriyle belirlenmiştir.

3.10.1. Spektrofotometrik yöntem

Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kantite ve kalitesi belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 50 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın analizinde

absorbans 190 nm ile 1100 nm arasında tam tarama yapılmış ve A_{230} , A_{260} ve A_{280} değerleri üzerinden DNA konsantrasyonu, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır (Sambrook ve Russell 2001). Spektrofotometri ışık kaynağı ile prizma arasına kuartz içerisinde yerleştirilen sıvı maddenin miktarına ve konsantrasyona göre ışığı absorbe etmesi sistemini temel almaktadır. DNA miktarı aşağıda verilen formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = A(260) * SF * \epsilon$$

Formülde nükleik asitler için miktar tayini yapılırken A_{260} nm’de nükleik asit absorbans değeriyle, o nükleik asitin varoluş katsayısının (ϵ) (DNA için 50) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla nükleik asit miktarı mililitrede mikrogram olarak hesaplanmaktadır. Absorbans değeri okuma değerinin yapıldığı dalga boylarında çözeltinin içinden geçen ışığın ne kadarının soğurulduğunun bir göstergesidir.

3.10.2. Agaroz jel elektroforesiz

Agaroz jel elektroforesiz yöntemiyle RNA kontaminasyonu, polisakkarit varlığı ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA’nın varlığı araştırılmıştır. Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA’nın kantite ve kalitesinin TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforesiz yöntemi ile belirlenmesi için %1.2’lik agaroz jel, 1X TBE çözeltisi (89 mM TRIS-HCl, 89 mM Borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.0) kullanılarak hazırlanmıştır. Jel içerisine 0.5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda olacak şekilde etidium bromit (10 mg/ml, ethidium bromide) ilave edilmiştir.

DNA örneklerinden 1 μg hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6X yükleme çözeltisi [(loading dye, Amresco), 50 mM TRIS-HCl, (pH 7.6), 0.025 mg bromofenol blue (bromophenol blue), 6.45 M gliserol (glycerol)] ile karıştırılmıştır. DNA örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5 V/cm uygulanmış ve 110 dakika süre ile yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra DNA ultra viole (UV) aracılığıyla görüntülenmiş UVpro programıyla bilgisayar ortamında kaydedilmiştir.

TBE yürütme çözeltisi 20X TBE konsantre çözelti olarak hazırlanmış ve 216 g TRIS-HCl tartılarak steril 1 L'lik Pireks şişe içerisine alınmış, 600 ml steril distile su ilave edilerek magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak karıştırılmıştır. TRIS-HCl çözüldüğünde üzerine 110 g borik asit tartılarak ilave edilmiş ve 80 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) çözeltisi eklenerek karıştırılmaya devam edilmiştir. TBE çözelti hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış 120°C de 20 dakika süre ile otoklav edilmiş ve 4 °C de korunmuştur.

3.11. Mikrosatellit DNA Analizleri

3.11.1. PZR

Gelişme dönemlerine özgü cDNA'lara ait primer çiftlerinin genomik DNA düzeyinde teyit edilmesi amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 96 örneklik (8x12) Px2 termal-döngü cihazı (96-Well-Px2 Thermal Cycler) (Thermo Hybaid) kullanılmıştır. Kullanılan genomik DNA, primer seti, enzim ve diğer kimyasallar ve konsantrasyonlarına ait bilgi Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

PZR'da kullanılan bileşenlerden kalıp olarak kullanılan genomik DNA'lar 8.5 µl'sinde 120 ng (~14 ng/µl) olacak şekilde normalleştirilmiştir.

MVG ve Iontek firmalarına sentezletilen her bir primer seti (AGi) ana stok olarak 200 µM olarak hazırlanmıştır. Ana stoklardan çalışmada kullanılmak üzere 20 µM'lık ara stoklar hazırlanarak geri kalan primer stokları -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada her primer ara stoğundan bir PZR çalışması için 0.5 µM olacak şekilde kullanılmıştır.

Her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP ve dCTP (Larova) ana stoklarından 10 mM'lık çalışma stoğu kullanılmak üzere dNTP karışımı hazırlanmıştır. Bu 10 mM'lık dNTP karışım stoğundan bir örnek için 0.28 mM olacak şekilde kullanılmıştır. PZR toplam 25 µl reaksiyon haciminde 0.2 ml'lik 8 dizinli PZR tüpleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları

<i>Kullanılan Kimyasallar</i>		<i>Stok</i>	<i>Miktar</i>	<i>Final</i>
Genomik DNA			8.5 µl	120 ng
Steril-H ₂ O			5.25 µl	
İleri Primer (Forward)		20 µM	0.625 µl	0.5 µM
Geri Primer (Reverse)		20 µM	0.625 µl	0.5 µM
Steril-H ₂ O			2.89 µl	
10X Reaksiyon Çözeltilisi	TRIS-HCl (pH 8.8)	670 mM	3 µl	80 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM		19 mM
	Tween-20	%0.1		%0.009
MgCl ₂		25 mM	3 µl	3 mM
dNTP		10 mM	0.7 µl	0.28 mM
Taq DNA polimeraz		5 ünite/µl	0.41 µl	2.05 ünite
Toplam Hacim			25 µl	

3.11.2. Amplifikasyonunda kullanılan PZR profilleri

Mikrosatellit lokuslarının çoğaltımında 3 farklı PZR profili kullanılmıştır. Bu PZR profilleri Amplifikasyon Profili A (Çizelge 3.4), Amplifikasyon Profili B (Çizelge 3.5) ve Amplifikasyon Profili C (Çizelge 3.6) olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.4. Amplifikasyon Profili A

<i>PZR Profili</i>		<i>Zaman</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Aşama</i>
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	60°C→55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Çizelge 3.5. Amplifikasyon Profili B

<i>PZR Profili</i>		<i>Zaman</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Aşama</i>
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	64°C→59°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	59°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Çizelge 3.6. Amplifikasyon Profili C

<i>PZR Profili</i>		<i>Zaman</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Aşama</i>
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	66°C→61°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	61°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Amplifikasyon Profili A, B, C için renatürasyon sıcaklığı 60°C, 64°C ve 66°C olmak üzere 3 farklı renatürasyon sıcaklığı uygulanarak her primer seti için en uygun renatürasyon sıcaklıkları optimize edilmiştir. Mikrosatellit lokuslarının çoğaltımı için bütün PZR profillerinde spesifik olmayan ampikonların oluşumunu önlemek amacı ile indirgemeli PZR (touch-down PZR) profili kullanılmıştır. Bu yöntemle başlangıçtaki 10 döngüde asıl reaksiyonun devam ettiği renatürasyon sıcaklığından en az 5°C yüksek sıcaklıkla primer çiftinin çoğaltılacak DNA sarmallarına bağlanması

sağlandıktan sonra her döngü başına renatürasyon sıcaklığı 0.5°C düşürülmüştür. İndirgemeli PZR profilleri uygulamaları ile PZR çalışmalarında spesifik olmayan bölgelerin amplifikasyonları önlenmeye çalışılmıştır.

3.11.3. Agaroz jel elektroforesiz

PZR çalışmaları tamamlanan 25 µl ürüne 5 µl yükleme çözeltisi (6X) eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra 8 ile 12 µl değişen miktarlarda PZR ürünü jele yüklenmiştir. Kullanılan jel, içerisinde %3.0 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü MetaPhor ve %1 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü Serva agaroz ile hazırlanmıştır.

Elektroforesiz işleminde 5 V/cm, sabit amperde elektriksel akım uygulanmış ve en az 8 saat veya gece boyu 1X TBE çözeltisinde yürütülmüştür. PZR ürünleri elektroforez işlemi sırasında jelin içerisinde 0.5 µg/ml bulunan etidium bromit (10 mg/ml) çözeltisi ile boyandıktan sonra UV transilluminatör yardımıyla görüntülenerek UVpro görüntüleme yazılım programı ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.12. *In vitro* Veri Analizleri

Tez kapsamında geliştirilmiş ve AGi primer setleri olarak isimlendirilen mikrosatellit primer setlerinin polimorfizm gücünü analiz etmek ve mikrosatellit primer setlerinin F₂ bireyleri üzerinde oluşturmuş oldukları amplikonların açılımını belirlemek (segregasyon analizi) ve dominant veya ko-dominant özellikte olduklarını tespit etmek amacıyla değişik testler uygulanmıştır. Segregasyon analizi ve amplikonların dominant veya ko-dominant özelliklerinin belirlenmesi amacı ile F₂ popülasyonunda beklenen amplikon sayısı belirlenirken tek gen tarafından kontrol edilen dominant özellik için 3:1 oranı, ko-dominant özellik için 1:2:1 oranı kullanılmıştır. Ki-kare uygunluk testi formülü aşağıda verilmiştir.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i}$$

G_i: Gözlenen amplikon sayısı

B_i: Beklenen amplikon sayısı

n : Analiz edilen unsur sayısı (bu çalışmada 2)

χ²: Ki-kare

Ayrıca tasarlanan primerlerin seçilen F₂ ve türler arası örnekler üzerinde oluşturduğu polimorfizm bilgi içeriklerini (PIC) belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Portis vd 2007).

$$PIC = \sum_{i=1}^n (P_{ij})^2$$

P_i: i. allelde gözlenen ampikon frekansı
P_j: j. allelde gözlenen ampikon frekansı
n : Analiz edilen unsur sayısı
PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

3.13. RNA Analizleri

3.13.1. RNA ekstraksiyonunda kullanılan bitki materyalleri

Biber bitkisinde toplam RNA Çizelge 3.7’de gösterilen sağlıklı Demre Sivrisi doku, organ ve gelişme dönemlerine özgü materyallerden elde edilmiştir. Genel olarak bitki materyali yaprak, sap, kök, plasenta, perikarp ve tohumlar ve bunlara ait farklı gelişme dönemleri kullanılmıştır (Çizelge 3.7, Şekil 3.5). Çalışmada kullanılan bitki kısımlarının seçiminde öncelikle gelişme dönemlerini doğru bir şekilde ayırt etmek için tek bir biber meyvesinin belirli bir döneminde toplanması ile perikarp, plasenta ve tohumların fizyolojik yaşlarının aynı olması sağlanmıştır.

Genç yapraklar bitkilerin altı yapraklı olduğu dönemde, olgun yapraklar ise tohumların ekimden 90 gün sonra bitkilerin 15. boğumdan alınmıştır. Bitkilerde çiçeklerin görüldüğü gün çiçeklenme gün 1 olarak etiketlenmiş ve çiçeklenmeden sonraki 15, 36 ve 65. günlerinde (11, 13 ve 14 cm) meyve kabuğu (perikarp), yine aynı materyallerin plasenta ve tohumları toplanmıştır. Meyveler toplanırken aynı boyda olmalarına özen gösterilerek aynı fizyolojik dönemde olmaları sağlanmaya çalışılmıştır. Kök materyali bitkilerin altı yapraklı olduğu dönemde saksılarından sökülen bitkilerden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan sap materyali ise tohumların ekiminden 4 ay sonraki bitkilerden alınmıştır (Şekil 3.5).

RNA çalışmaları için örnek toplama işlemi için sağlıklı bitkiler üzerinde düzenli olarak açan her çiçeğin çiçek açma günü birinci gün olarak kabul edilerek etiketleme yapılmıştır. Etiketlenen çiçekler günlük takip edilerek meyve gelişme dönemlerine

göre steril bir şekilde eldiven kullanılarak buz üzerinde bekleyen 50 ml'lik steril test tüplerine sıkıştırmadan toplanmış, sabah 07: 00 ile 08: 20 arasında toplama işlemi tamamlanarak örnekler buz üzerinde taşınmıştır.

Laboratuvara getirilen örneklerden meyveler buz üzerine hazırlanmış olan kesme sehpası kullanılarak steril bistüri, jilet ve pens yardımıyla perikarp, plasenta ve tohum kısımlarına ayrılmış ve toplanan diğer örnekler (yaprak, sap, kök, tomurcuk ve çiçek) ile birlikte etiketli tüplere seri bir şekilde aktararak RNA ekstraksiyon aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.7. RNA izolasyonu için kullanılan bitki doku ve gelişme dönemleri

<i>Organ</i>	<i>ID*</i>	<i>Gelişme Dönemi</i>
Perikarp	Ca01	15 ÇGS
	Ca02	36 ÇGS
	Ca03	65 ÇGS
Plasenta	Ca04	15 ÇGS
	Ca05	36 ÇGS
	Ca06	65 ÇGS
Genç Yaprak	Ca07	6 yapraklı fide dönemi
Olgun Yaprak	Ca08	90 ÇGS 15. boğumlarında bulunan yapraklar
Tomurcuk	Ca09	Sepallerin görülmediği aşama
Çiçek	Ca10	1 ÇGS
Kök	Ca11	6 yapraklı fide dönemi
Sap	Ca12	4 aylık olgun bitkilerden
Olgunlaşmamış Tohum	Ca13	15 ÇGS
	Ca14	36 ÇGS
	Ca15	65 ÇGS
Olgun Tohum	Ca16	5 yıllık

*ID: Kütüphane Kayıt No, Ca: *Capsicum annuum* L., ÇGS: Çiçeklenmeden Sonraki Gün Sayısı



Şekil 3.5. RNA ekstraksiyonunda kullanılan bitki materyalleri. Biber organ, doku ve gelişme dönemlerine ait görüntüler sunulmuştur

3.13.2. RNA ekstraksiyonu

Yüksek kaliteli RNA ekstraksiyonu bitkilerde yapılan fonksiyonel genomik analizlerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği açısından önemlidir. Bitkilerde kaliteli RNA izolasyonu ile ilişkilendirilmiş ana problem öncelikle flavonoidler, fenolik bileşikler, nişasta ve polisakkaritlerin varlığı ya da beraber çöktürülmesine dayandırılmıştır. Intact (bozulmamış) RNA izolasyonu çoğu bitki türünde yüksek miktardaki içsel ribonükleazların (RNaz) varlığı nedeni ile oldukça zordur.

Bu çalışmada toplam RNA (mRNA, rRNA, tRNA ve smRNA) ekstraksiyonu “MAGi” RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plastik ve bazı cam malzemeler %0.1 oranında DEPC (Diethyl pyrocarbonate) ile muamele edilmiş ve 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Havan, havanelleri ve bazı cam malzemeler 200°C de en az 2-4 saat boyunca yüksek sıcaklık altında tutularak sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.13.3. Ekstraksiyonda kullanılan kimyasallar ve stokları

TRIS-HCl-EDTA (2 M TRIS-HCl - 0.5 M EDTA pH 7.5) stoğu için 31.52 g TRIS-HCl tartılarak 60 ml’ye kadar steril su ilave edilerek karıştırılıp ısıtılarak çözülmüş ve 18.61 g EDTA tartılarak üzerine eklenmiş, 8 adet NaOH pelleti solüsyon içine atılmış, karıştırılıp ısıtılarak EDTA’nın tam anlamıyla çözülmesi sağlanmıştır. Çözelti soğutulduktan sonra pH ölçümü yapılarak pH 7.5’e birkaç NaOH pelleti daha ilave edilerek ayarlanmıştır. Son hacmi 100 ml’ye tamamlanan çözelti 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

4 M D-Sorbitol stoğu için 50 ml’lik steril test tüpü içerisine 36.436 g tartılarak 40 ml’ye kadar steril distile su ilave edilmiş ve çözünmesi için su banyosu içerisinde 65°C de bekletilmiştir. Çözündükten sonra hacmi 50 ml’ye tamamlanarak 0.42 mikron çapındaki filtre ile sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

% 20 SLS stoğu için 50 ml’lik steril test tüpü içerisine 10 g SLS tartılarak 40 ml’ye kadar steril distile su ilave edilmiş ve çözünmesi için su banyosu içerisinde 65°C de

inkübe edilmiştir. Solüsyonun çözüldükten sonra hacmi 50 ml'ye tamamlanarak 0.42 mikron çapındaki filtre ile sterilizasyonu yapılmıştır.

RNA ekstraksiyon için MAGi solüsyonu 50 örnek için toplam 195 ml olacak şekilde sırasıyla 25 ml TRIS-HCl-EDTA (2 M TRIS-HCl ve 0.5 M EDTA pH 7.5), 50 ml Gliserol (10.75 M), 50 ml sorbitol (4 M), 50 ml sarkosil (%20), 10 ml Triton-X 100 (1.55 M) ve 10 ml Tween-20 (0.82 M) sırası ile ilave edilerek hazırlanmıştır.

MAGi solüsyonunda final konsantrasyon olarak 256 mM TRIS-HCl, 64 mM EDTA, %25.64 gliserol, 1.026 M sorbitol, %0.5 sarkosil, %0.5 Triton-X 100 ve %0.5 Tween-20 bulunmaktadır. MAGi solüsyonu oda sıcaklığında 8 aydan daha uzun süre bozulmadan kullanıma uygun olarak muhafaza edilebilmektedir. Kullanmadan önce iyice karıştırılarak oluşan köpük ve kabarcık katmanının uzaklaşması gerekmektedir. Eğer acil kullanımı gerekiyorsa solüsyon santrifüj yardımı (50 ml tüplerin 3000 xg de 2 dk) ile kısa bir sürede kullanıma hazır hale getirilebilmektedir.

RNA ekstraksiyon için guanidin izotiosiyanit-sodyum sitrat [(GITC-NaCT, 8 M, 0.25 mM), (guanidine isothiocyanate-sodium citrate, Amresco)] solüsyonunu hazırlamak için 50 ml'lik tüp içerisinde toplam 15 ml olacak şekilde küçük hacimlerde hazırlanmıştır. GITC'den 14.18 g tartılarak üzerine 0.375 ml sodyum sitrat (1 M, pH 7.0) ilave edilmiş daha sonra final hacmi 4 ml RNA kalite su eklenerek 15 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpün ağzı kapatılıp parafilm ile sarıldıktan sonra 65°C'de tamamen çözülene kadar inkübe edilmiştir. Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlık ortamda saklanmış ve kullanmadan önce 65°C'de bekletilerek sıvı hale gelmesi sağlanmıştır.

RNA ekstraksiyon solüsyonu (REKS) her bir ekstraksiyon için ayrı ayrı hazırlanmıştır. 1X (bir örnek için gerekli miktar) REKS solüsyonu 3.9 ml MAGi solüsyonu, 1.75 ml GITC-NaCT solüsyonu, 1 ml su ile doyurulmuş Fenol (5 hacim phenol: 1 hacim su, pH 4.5, Amresco) ve 0.1 ml 14.4 M β -merkaptoethanol (BME, Amresco) katılarak kuvvetlice vortekslenmiş ve hazırlandıktan sonra hemen kullanılmıştır.

2 M Sodyum asetat solüsyonu (pH 4.0) hazırlanırken 16.41 g sodyum asetat (su içermeyen, Amresco) tartılmış üzerine 40 ml RNA kaliteli su ilave edilmiştir. Solüsyonun pH'sını 4.0'a ayarlamak için 40 ml Glasiyel asetik asit (Amresco) katılmış ve RNA kaliteli su ile final hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavlanmıştır.

RNA ekstraksiyonu için gerekli olan diğer solüsyonlardan Fenol:Kloroform (1:1) (phenol (5:1 su ile sature edilmiş, pH 4.5, Amresco) chloroform (Amresco) taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır.

İzopropanol (isopropanol, Merck), saf (%99.5'luk) etil alkol (Saf ethanol) %80'lik etil alkol (80 ml etil alkol ve 20 ml steril su karıştırılarak hazırlanmış) kullanılmıştır.

RNA kalite su hazırlığı ise 999 ml steril distile su içerine 1 ml DEPC (Diethyl pyrocarbonate) katılarak çeker ocak içerisinde 26-28°C karanlık ortamda 2 saat bekletildikten sonra DEPC 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavlanarak inaktive edilmiştir.

3.13.4. MAGi RNA ekstraksiyon protokolü

1. Dokuların parçalanması (öğütülmesi) işleminden önce 15-30 dakika süreyle kullanılacak olan havan ve havaneleri -80°C'de bekletilerek ön-soğutma işlemi yapılmıştır. Çizelge 3.7'de gösterilen bitki doku, organ ve gelişme dönemlerinden olgun tohumdan 0.25 g, -80°C'de muhafaza edilmiş olan taze doku parçacıklarından 0.5 g tartılarak havan içerisinde havaneli ve sıvı azot yardımıyla öğütülmüştür. Havan içerisinde az miktarda sıvı azot kalmış ve tam olarak buharlaşmadan önce 6.75 ml REKS eklenerek öğütme işlemine örnekler tam anlamıyla ezilene kadar devam edilmiştir.
2. Havan içerisinde bulunan örnek ve solüsyon karışımı üzerine 0.75 ml 2M NaOAc (pH 4.0) eklenerek havaneliyle hemen ve hızla karıştırılarak üzerine vakit kaybetmeksizin 7.5 ml Fenol:Kloroform (1:1) (3.75 ml phenol ve 3.75 ml kloroform) ilave edilmiş ve koyu suluri yapıdan sıvı hale gelene kadar karıştırılarak oda sıcaklığında (25°C) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında

sıvılaşmayı hızlandırmak için ara sıra havaneliyle karıştırma işlemine devam edilmiştir.

3. Oluşan homojenat 28 ml'lik steril "Nalgene Oak Ridge" (plastik vida kapaklı ve yuvarlak tabanlı) santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve tüp 15 saniye çalkalanmış ve 15 saniye vortekslenmiştir. Örnekler tamamen karıştırıldıktan sonra 12000 xg, 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı faz yeni bir 28 ml'lik steril "Nalgene Oak Ridge" (plastik vida kapaklı ve yuvarlak tabanlı) santrifüj tüpüne alınmıştır. Kurtarılan hacim kadar ilave edilen isopropanol ile RNA yoğunlaştırılması için tüp ters-düz ederek karıştırılmış ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 10000 xg, 4°C'de 20 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
5. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dikkatlice atılmıştır, RNA pelleti 0.9 ml 10 mM TRIS-HCl (pH 7.5) içerisinde çözülerek protein, polisakkarit ve tuz kalıntıları gibi moleküler kalıntıların uzaklaştırılması hedeflenmiş ve daha sonra üzerine 0.1 ml 2 M KOAc (pH 5.5) eklenerek pozitif yüklü polisakkaritler, kalıntı proteinler, pigmentler ve diğer materyalin uzaklaştırılması sağlanmıştır.
6. RNA tamamen çözüldükten sonra oluşan hacmin 3 katı olacak şekilde 3 ml Saf etil alkol eklenerek yoğunlaştırılmıştır. Santrifüj tüpü ters-düz edilerek çalkalanıp karıştırıldıktan sonra 10000 xg, 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
7. Süpernatant yine uzaklaştırılmıştır ve pellet 2 mL of %80'lik ethanol ile yıkanmıştır. Eğer pellet santrifüj tüpünün duvarına yapışarak kaldıysa steril bir pipet ucu yardımı ile çıkartılmış tam anlamıyla yıkanmasını sağladıktan sonra 10000 xg, 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Santrifüj sonrasında süpernatant dökülerek tüp steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrilmiştir. Etil alkolün buharlaştırılarak uzaklaştırılması için ılık ve hafif sıcak hava üfleyen ayarda steril saç kurutma makinesi kullanılmıştır.
9. Tamamen etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelleti 0.25-0.5 ml RNA kaliteli su içerisinde çözülmüştür. RNA pelleti çözüldükten sonra kalite ve kantitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik, formamit agaroz jel elektroforez ve TT-PZR (RT-PCR) metotları kullanılmıştır.

3.14. DNaz I Uygulaması

Toplam RNA elde edilen örnekler TT-PZR ve ilk sarmal cDNA sentezi aşamasına geçmeden önce olası DNA kalıntısını uzaklaştırmak için DNaz I (RNaz içermeyen) (Deoxyribonuclease I, RNase free, Fermentas) uygulaması yapılmıştır. Toplam 25 µl'lik DNaz I reaksiyonunda 10 µg toplam RNA miktarı kullanılmış ve DNaz I enziminin etkin çalışması için 2.5 µl 10X DNaz I reaksiyon çözeltisi (100 mM TRIS-HCl pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) ve 1 ünite/µl DNaz I enzimi ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 0.2 ml'lik tüplerde hazırlandıktan sonra karıştırılmış, kısa süreli santrifüjlenmiş ve 37°C de 30 dakika inkübe edildikten sonra 70°C de 5 dakika bekletilerek enzimin aktivitesi durdurulmuş ve örnekler kullanılabilecek kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

3.15. RNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

3.15.1. Spektrofotometrik metot

Ekstraksiyonu tamamlanmış olan RNA'nın kantite ve kalitesi belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 50 kat seyreltilmiş olan toplam RNA'nın analizinde 190 nm ile 1100 nm arasında tam spektral tarama yapılmıştır. Ayrıca A₂₃₀, A₂₆₀ ve A₂₈₀ nanometrelerde ölçüm değerleri üzerinden RNA konsantrasyonu, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı varlığı araştırılmıştır (Sambrook ve Russell 2001). RNA miktarını belirlemek için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$\text{RNA}(\mu\text{g/ml}) = A(260) * SF * \epsilon$$

Ribonükleik asit miktar tayini yapılırken A₂₆₀ nm'de absorbans değeriyle, RNA varoluş katsayısının (ε) (RNA için 40) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla saptanmıştır.

3.15.2. Formamit-Agaroz jel elektroforesiz

RNA'nın kalitesini TRIS-Borik asit EDTA (TBE)/formamit (Formamide, Amresco) agaroz jel elektroforez yöntemi ile araştırmak için RNA ayarı 1X TBE

çözeltisi kullanılarak %1.2'lik MetaPhor agaroz jel hazırlanmıştır. Jel hazırlanırken içerisine 0.5 µg/ml etidium bromit (10 mg/ml) ilave edilmiştir.

Elektroforez öncesi tüp içerisinde 21 µl deiyonize formamit (13.33 mM) ile 5 µl RNA örneği karıştırılmıştır. Hazırlanan RNA örnekleri 65°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve 4 µl 6X yükleme çözeltisi ilave edilerek jel kuyucuklarına yüklenmiştir. RNA örnekleri için 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5 V/cm uygulanarak 160 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işleminin sonunda UV transliminatör ile görüntülenmiş ve elde edilen jel görüntüsü UVpro bilgisayar programı ile bilgisayar ortamına aktarılmış kaydedilmiştir.

TBE çözeltisi RNA ayarı su ile 20X TBE konsantre çözelti olarak hazırlanmış ve RNA çalışmalarına uygun şekilde 121°C 20 dakika süre ile otoklavlanarak steril edilmiştir. TBE çözeltisi içerisinde bulunan TRIS-HCl kimyasalının amino grubu ile DEPC kimyasal etkileşime girdiği için TBE hazırlığı RNA ayarı steril su ile yapılmış, DEPC kimyasalı kullanılmamıştır.

3.15.3. TT-PZR (RT-PCR)

RNA'nın kalitesinin belirlenmesi için kullanılan üçüncü yöntemde ise her RNA örneği için ters transkriptaz enzimi kullanılarak (TT-PZR) ve kullanılmayarak (Ters transkriptazsız-PZR) 2 deneme kurulmuştur. Bu yöntem ile elde edilen RNA'nın genomik DNA'dan ari, saf ve kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

Toplam da 1 µg RNA kullanılarak ubiquitin (UBIF 5'-GAAAACCCTAACGGGGAAG-3', UBIR 5'-GCCTCCAGCCTTGTTGTAAA-3') primer setinden 0.5 µM olacak şekilde toplam 20 µl'lik hacimde ters transkriptaz (RevertAid™ M-MuLV Reverse transcriptase, Fermentas) enzimi ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada TT-PZR ayrıca gliser aldehit 3 fosfat dehidrogenaz [glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPC)] primer seti (5'-CTGTCAACGACCCCTTCATC-

3' ve 5'-CCTGTTGTCGCCAACGAAGTC-3') kullanılarak RNA kalitesi teyit edilmiştir.

Reaksiyona ayrıca enzimin etkin çalışması için 5X reaksiyon çözeltisi (250 mM TRIS-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, (Fermentas)), ribonükleaz inhibitör (Ribolock™ Ribonuclease inhibitor, Fermentas) ve dNTP karışımı (Fermentas) ilave edilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. TT-PZR'da kullanılan kimyasallar ve uygulama protokolü

	<i>Kullanılan Kimyasallar</i>		<i>Ana Stok</i>	<i>Miktar</i>	<i>Konsantrasyon</i>
Karışım 1	Toplam RNA			5 µl	1 µg
	Steril-H ₂ O			3 µl	
	UBI İleri Primer		10 µM	1 µl	0.5 µM
	UBI Geri Primer		10 µM	1 µl	0.5 µM
70°C’de 5 dakika inkübasyon ile denatürasyon					
Karışım 2	Steril-H ₂ O			1.5 µl	
	5X Reaksiyon Çözeltisi	TRIS-HCl pH 8.3	250 mM	2 µl	25 mM
		KCl	250 mM		25 mM
		MgCl ₂	20 mM		2 mM
		DTT	50 mM		5 mM
	Ribolock		20 ünite/µl	0.5 µl	0.5 ünite/µl
	dNTP		10 mM	1 µl	0.5 mM
37°C’de 5 dakika inkübasyon ile annealing					
Karışım 3	Steril-H ₂ O			2 µl	
	5X Reaksiyon Çözeltisi	TRIS-HCl pH 8.3	250 mM	2 µl	25 mM
		KCl	250 mM		25 mM
		MgCl ₂	20 mM		2 mM
		DTT	50 mM		5 mM
	Ters Transkriptaz		200 ünite/µl	1 µl	10 ünite/µl
42°C’de 60 dakika cDNA sentezi					
Toplam				20 µl	

Toplam 20 µl'lik hacimde gerçekleşen reaksiyonda toplam RNA'ya primerlerin bulunduğu Karışım 1'in eklenmesinden sonra olası DNaz I kalıntısının uzaklaştırılması ve denatürasyon işleminin gerçekleştirilmesi için 70°C'de 5 dakika inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda reaksiyon üzerine Karışım 2 ilave edilerek primer bağlanmasının teşvik edilmesi için 37°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Son aşama olarak Karışım 3 eklenerek 42°C'de 60 dakika bir sürede mRNA cDNA formuna dönüştürülmüştür (Çizelge 3.8).

Ters transkriptaz (TT) enzim reaksiyonu tamamlandıktan sonra reaksiyon üzerine 80 µl Steril-H₂O ilave edilmiş ve bu reaksiyondan 5 µl alınarak Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi TT-PZR profili ile gerçekleştirilmiştir. PZR sonunda yine agaroz jel elektroforez yöntemiyle sonuçlar kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.9. TT-PZR Profili

	<i>Sıcaklık</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Aşama</i>
TT-PZR	42°C	60 dakika	1 döngü	RNA amplifikasyonu
PZR	95°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
	95°C	30 saniye	27 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	45 saniye		Sentez
	72°C	5 dakika	1 döngü	Final Sentez

3.16. cDNA Sentezi İçin Gerekeli Bileşenler

İlk sarmal cDNA sentezi kit (First Strand cDNA Synthesis Kiti (Fermentas)) kullanılarak toplam RNA tek sarmallı DNA (cDNA) formuna dönüştürülmüştür. Poli [A] kuyruğu olan mRNA'lar için oligo(dT)₁₈ primeri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Oligo(dT)₁₈ primeri (0.5 µg/µl): 18 adet dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') bazından oluşturulmuştur. Miktarı 0.5 µg/µl olan oligo(dT)₁₈ primer konsantrasyonu 57.61 µM olarak hesaplanmıştır. 20 µl'lik bir TT-PZR reaksiyonu için 2.88 µM oligo(dT)₁₈ primer stoğundan 1 µl kullanılmıştır.

5X cDNA reaksiyon çözeltisi ters transkriptaz enziminin etkin şekilde çalışmasını sağlayan 250 mM TRIS-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT (Fermentas) oluşmaktadır. Toplam 20 µl'lik bir reaksiyonda 4 µl yani 50 mM TRIS-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

Ribolock RNaz inhibitörü (RibolockTM Ribonuclease inhibitor) (20 ünite/µl) reaksiyon içerisinde herhangi bir nedenle gelişebilecek RNaz aktivitesinin RNA'ya dolayısıyla elde edilecek cDNA'ya zarar vermemesi için eklenmiştir. 20 µl'lik bir reaksiyonda 1 µl yani 1 ünite/µl konsantrasyonda kullanılmıştır.

dNTP karışımı yeni sentezlenecek cDNA sarmalında baz kaynağı olarak 20 µl'lik bir reaksiyonda 2 µl (1 mM) dNTP karışım stoğundan kullanılmıştır.

Ters Transkriptaz Enzimi (RevertAidTM M-MuLV Reverse transkriptase, Fermentas) (20 ünite/µl): RNA bağımlı DNA sentezi için ters transkriptaz enzimi 20 µl'lik bir reaksiyonda 5 ünite/µl olacak şekilde kullanılmıştır.

3.17. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezinde uygulanan protokol Çizelge 3.10'da özetlendiği şekilde yapılmıştır. İlk aşamada 5 µl toplam RNA içerisine Karışım 1 ilave edilerek 70°C'de 5 dakika süre ile denatürasyon yapılmıştır. Süre sonunda buz üzerinde 2 dakika bekletilmiş ve tüpe içerisine Karışım 2'den 7 µl ilave edilerek 37°C'de 5 dakika annealing işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise 5 µl ters transkriptaz enzimi eklenmiş ve 42°C'de 60 dakika sürede cDNA sentezi tamamlanmıştır. Ters transkriptaz enziminin aktivitesi 70°C'de 10 dakika süre bekletilerek sonlandırılmıştır (Çizelge 3.10).

cDNA sentezi tamamlandıktan sonra 20 µl'lik toplam reaksiyon hacmi üzerine 180 µl steril moleküler biyoloji ayarı su ilave edilmiştir. 16 farklı doku, organ ve gelişme döneminden elde edilen cDNA'ların optimizasyonu ve normalleştirilmesi için TT-PZR çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 3.10. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve protokolü

	Kullanılan Kimyasallar		Ana Stok	Miktar	Konsantrasyon
Karışım 1	Toplam RNA		10 µg/25 µl	5 µl	2 µg
	RNA ayarı Steril-H ₂ O			2 µl	
	Oligo (dT) ₁₈ Sekans Primeri		57.61 µM	1 µl	2.88 µM
70°C’de 5 dakika denatürasyon					
Karışım 2	5X Reaksiyon Çözeltisi	TRIS-HCl pH 8.3	250 mM	4 µl	50 mM
		KCl	250 mM		50 mM
		MgCl ₂	20 mM		4 mM
		DTT	50 mM		10 mM
	Ribolock		20 ünite/µl	1 µl	1 ünite/µl
	dNTP		10 mM	2 µl	1 mM
37°C’de 5 dakika annealing					
Ters Transkriptaz			20 ünite/µl	5 µl	5 ünite/µl
42°C’de 60 dakika cDNA sentezi ve 70°C’de 10 dakika enzim eliminasyonu					
Toplam				20 µl	

3.18. cDNA Agaroz Jel Elektroforesiz

cDNA ürününe 5 µl DNA yükleme çözeltisi eklenerek içerisinde %2.0 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü MetaPhor agaroz içeren jele 25 µl yüklenmiştir. Elektroforesiz işleminde 5 V/cm, sabit amperde elektriksel akım uygulanmış ve 4 saat 1X TBE çözeltisinde yürütülmüştür. Jel içerisinde bulunan 0.5 µg/ml ethidium bromit çözeltisi aracılığıyla UV transilluminatör ile görüntülenmiş, UVpro programıyla bilgisayara kaydedilmiştir.

3.19. cDNA Optimizasyonu

TT-PZR tamamlandıktan sonra UBI primer seti kullanılarak analiz edilmiş (Çizelge 3.11) ve cDNA örneklerinin normalleştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. PZR ürünleri UBI primer seti kullanılarak amplifikasyonları tamamlanıp agaroz jel elektroforez analizlerine dayanarak her bir cDNA kütüphanesinden

kullanılacak cDNA miktarı belirlenmiştir. Burada ilk olarak her bir cDNA kütüphanesinden alınan 5 µl (20 µl TT-PZR ürünü + 180 µl steril su) Bioron firmasının *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak Çizelge 3.12’de verilen amplifikasyon profili ile çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.11. PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar			Ana Stok	Miktar	Konsantrasyon
İlk Sarmal cDNA			200 µl	5 µl	
Karışım 1	Steril-H ₂ O			5 µl	
	UBI İleri Primer		10 µM	2.5 µl	1 µM
	UBI Geri Primer		10 µM	2.5 µl	1 µM
Karışım 2	Steril-H ₂ O			2.89 µl	
	PZR 10X Reaksiyon Çözeltisi	TRIS-HCl (pH 8.8)	670 mM	3 µl	80 mM
		(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM		19 mM
		Tween-20 (g/h)	%0.1		%0.009
	MgCl ₂		25 mM	3 µl	3 mM
	dNTP		10 mM	0.7 µl	0.28 mM
	Taq DNA polimeraz		5 ünite/µl	0.41 µl	2.05 ünite
Toplam				25 µl	

Çizelge 3.12. cDNA PZR profili

<i>PZR Profili</i>		<i>Zaman</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Aşama</i>
Hot Start	95°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
PZR	95°C	30 saniye	27 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	45 saniye		Sentez
Final	72°C	5 dakika	1 döngü	Final Sentez
Saklama	5°C	9 saat	1 döngü	Saklama

UBI primer setinin 16 cDNA kütüphanesinde oluşturduğu ampikon yoğunlukları dikkate alınarak amplifikasyon ürünü çok olan, PZR’da kalıp olarak kullanılacak

cDNA'lara steril su eklenmiş ve mikrosatellit analizlerinde kullanılacak cDNA kütüphanelerine ait örneklerden 3 µl (50 ng) kullanılmasına karar verilmiştir.

3.20. cDNA Mikrosatellit Analizleri

Çalışmada cDNA kütüphanelerinde bulunan mikrosatellitlerin varlığı, polimorfizm düzeyleri ve amplifikasyon düzeylerinin PZR analizleri ile belirlerken PZR'da kullanılacak farklı kaynaklardan elde edilen *Taq* DNA polimerazlardan kaynaklanabilecek hataların önlenmesi amacı ile Bioron firmasının enzimi ile Fermentas firmasının enzimleri karşılaştırılmıştır. Enzimsel kaynakların karşılaştırılması çalışmalarında ubiquitin primer seti (UBI) ve AGi primer setleri kullanılmıştır. Farklı kaynaklı DNA polimeraz enzim karşılaştırma çalışmaları ve bütün PZR çalışmaları için çok kanallı mikropipetler kullanarak ölçüm hataları önlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. PZR çalışmalarından bir görünüm. PZR çalışmalarında steril şartlar ve çok kanallı mikropipetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir

3.20.1. *Taq* DNA polimeraz cDNA-PZR (Bioron)

Bioron firmasına ait *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilmiş olan *Taq* DNA Polimeraz enzimi ile deneme yapılmıştır. Enzimin etkin çalışması için aynı firmanın ürettiği PZR reaksiyon (10X, MgCl₂ içermeyen) çözeltisi tercih edilmiştir. Bir örnek için 80.4 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 19.2 mM (NH₄)₂SO₄, %0.009 Tween-20 (h/h) kullanılırken *Taq* DNA Polimeraz enziminden 2.05 ünite kullanılmıştır.

3.20.2. *Taq* DNA polimeraz cDNA-PZR (Fermentas)

Fermentas firmasına ait *Thermus aquaticus* bakteri kaynağından alınan *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve PZR reaksiyon ($MgCl_2$ içermeyen 10X) çözeltisi kullanılmıştır. PZR reaksiyon çözeltisi içerisinde bulunan kimyasallardan bir örnek için 12 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 60 mM KCl, %0.0096 Nonident P-40 (h/h) hesaplanmıştır. Çalışmada *Taq* DNA Polimeraz enziminden 25 µl'lik bir reaksiyonda 2.05 ünite kullanılmıştır.

3.20.3. *Pfu* DNA polimeraz cDNA-PZR (Fermentas)

Fermentas firmasına ait *Pyrococcus furiosus*'tan izole edilmiş *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılmış ve etkin çalışması için aynı firmanın ürettiği 10X PZR reaksiyon ($MgSO_4$ içermeyen) çözelti tercih edilmiştir. Bir örnek için 20 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, %0.1 Triton X-100 (h/h), 0.1 mg/ml BSA ve 1 ünite *Pfu* DNA Polimeraz enziminden kullanılmıştır. *Pfu* DNA polimeraz enzimi *Taq* DNA polimeraz enzimi ile aynı göreve yani polimerizasyon aktivitesine sahip ancak *Taq* DNA polimeraz enziminde bulunmayan proofreading özelliği ile hata düzeltme işlemini gerçekleştirebilmesi nedeni ile denemeye alınmıştır.

3.21. cDNA-PZR Profilleri

Genomik DNA'lar üzerinde yapılan tarama aşamasında 60°C, 64°C ve 66°C olmak üzere 3 farklı renatürasyon sıcaklığı uygulanarak her primer seti için uygun amplifikasyon sıcaklıkları optimize edildiği için 16 farklı cDNA kütüphanesi için her primer seti için genomik DNA analizlerinde belirlenen optimum sıcaklıklar da PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.22. cDNA-Mikrosatellit Agaroz Jel Elektroforesiz

Toplam 25 µl PZR ürününe 5 µl 6X yükleme çözeltisi eklenerek ve pipetle karıştırıldıktan sonra 8 ile 12 µl değişen miktarlarda, içerisinde %3.0 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü MetaPhor, %1 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü Serva agaroz ve 0.5 µg/ml EtBr içeren jelle yüklenmiştir.

Elektroforez işleminde 5 V/cm, sabit amperde elektriksel akım uygulanmış ve en az 8 saat veya gece boyu 1X TRIS-Borik asit EDTA çözeltisinde yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrası UV transilluminatör yardımıyla görüntülenmiş ve UVpro programıyla dijital ortamda bilgisayara kaydedilmiştir.

3.23. Mikrosatellit Amplikonların Ekstraksiyonu ve Saflaştırma

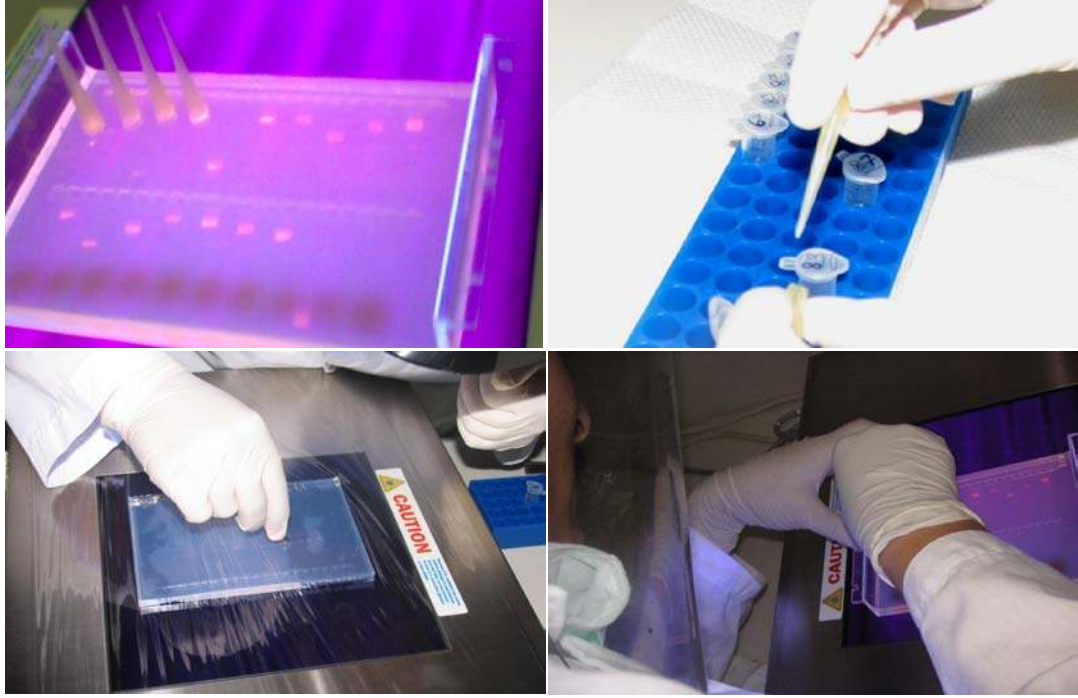
cDNA kütüphaneleri AGi primer setleri kullanılarak taranmış ve öncelikle polimorfizm gösteren amplikonlar ile seçilmiş bazı monomorfik amplikonlar belirlendikten sonra klonlanması düşünülen mikrosatellit lokusları 4 tekerrürlü olacak şekilde tekrar PZR çalışmaları yapılmıştır. Jelden amplikonların izolasyonu çalışmalarında Qiagen jelden DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır.

Amplikon büyüklüğü küçük olanlar (100-300 bp) steril bistüri ucu ile kesilerek, büyük olanlar (300 bp'den büyük) ise steril pipet ucu ters batırılarak jelden içerisinde 1 ml QX1 çözeltisi bulunan 1.5 ml'lik Ependorf tüpü içerisine alınmıştır (Şekil 3.7). Tüpler nazikçe vortekslenerek ve 50°C'de 5 dakika bekletilerek jelin çözünmesi sağlanmıştır.

Jel çözündükten sonra içerisine hafifçe vortekslenerek süspanse edilmiş olan QIAEX II çözeltisinden 10 µl eklenerek nazikçe karıştırılmış ve tüp 50°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada her 2 dakikada bir kez nazikçe vortekslenmiştir.

Sürenin sonunda 12000 xg hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlenip süpernatant dikkatlice pipet kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 750 µl QX1 çözeltisi eklenerek nazikçe vortekslenmiş ve 12000 xg hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlenip süpernatant dikkatlice atılmıştır.

Pellet üzerine 750 µl PE çözeltisi eklenmiş ve nazikçe vortekslenerek 12000 xg hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlenerek süpernatant dikkatlice hiçbir kalıntı kalmayacak şekilde uzaklaştırılmış ve pellet beyaz renk alıp tamamen kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.



Şekil 3.7. Agaroz jelden amplikonların klonlanması için izole edilmesi

Pellet üzerine 50 µl TE pH 8.5 çözeltisi eklenmiş ve DNA'nın silikadan ayrılarak çözelti içinde çözünmesi için oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve tüp 12 000 xg hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlenerek süpernatant dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Jelden alınan ve kit ile saflaştırılan amplicon içerisinde istenilen gen parçasığının varlığı teyit etmek için amplicona ait primer setine uygun PZR protokolü kullanılmıştır. Jelden kurtarılan ampliconlardan 2.5, 5 ve 10 µl kullanılarak Bioron firmasına ait olan *Taq* DNA polimeraz enzimi ile PZR yapılmıştır.

3.24. Transformasyonda Kullanılan Bakteri ve Kültürü

3.24.1. Bakteri kaynağı

Kompetant hücre kaynağı *Escherichia coli* bakterisinin JM107 ırkı kurutularak dondurulmuş (freeze dried) ve bu çalışmada bakteri kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.24.2. Luria Brouth sıvı bakteri kültür ortamı

Luria Brouth (LB) sıvı bakteri kültür ortamında 10 g tripton (triptone), 5 g maya ekstraktı (yeast extracte) 10 g NaCl tartılarak 980 ml steril su ile çözülmüştür. Çözeltinin pH'sı 0.8 ml 5 M NaOH kullanılarak 7.0'ye ayarlanmıştır. Toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır.

Bakteri kültür ortamı kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.8). Çalışmada hazırlanan petri kaplarının kullanımından önce gözle incelenerek agar ortamında herhangi bir mikroorganizma faaliyetinin olmadığı teyit edildikten sonra ileri aşamalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan katı ve sıvı kültürlerin hazırlanması

3.24.4. Amfisilin stoğunun hazırlanması

Bakteri kültüründe antibiyotik kullanarak seçici bir ortam oluşturulmuş ve sadece bu antibiyotiğe dayanıklılığı sağlayacak olan pTZ57R plazmit vektörünü taşıyan *E.*

coli bakterisi JM107 ırkının bu ortamda gelişimi, taşımayanların ise elimine edilmesi amacıyla amfisilin antibiyotiği kullanılmıştır. Stok solüsyon hazırlanırken 1 g amfisilin (Amresco) tartılarak 5 ml steril su ile çözülmüş ve üzerine 4.5 ml daha ilave edilip 10 ml'ye tamamlanarak 100 mg/ml stok solüsyonu hazırlanmıştır. Sterilizasyonu için 0.42 mikron çapında membran filtre kullanılmıştır. Hazırlanan stok solüsyonu küçük hacimlere bölünerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.24.5. İzopropil β tiogalaktopiranosid stoğunun hazırlanması

Çalışmada kullanılan vektörün çoklu klonlama bölgesinde β -galaktosidaz [β -galactosidase (*lacZ*)] geni bulunmaktadır. Çoklu klonlama bölgesine ligasyon işlemi ile gen parçacığı aktarımı gerçekleştirilmiş ise *LacZ* geninin çalışması inhibe edilmektedir. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, MA 238.302, Amresco) kimyasalı ortama ilave edilerek *lacZ* geninin transkripsiyonu teşvik edilmiştir. Bu çalışmada IPTG *LacZ* geni promotör bölgesini RNA polimeraz enzimine açarak transkripsiyon için “inducer” (teşvik edici) olarak kullanılmıştır.

IPTG stok solüsyonu 0.3 g IPTG tartılarak 5 ml steril su ile çözülmüş ve üzerine 7.2 ml daha ilave edilip 12.5 ml'ye tamamlanarak 0.1 M stok hazırlanmış ve 0.42 mikron çapında membran filtre ile sterilizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan stok solüsyonu 1 ml'lik küçük hacimlerde -20°C'de saklanmıştır.

3.24.6. X-galaktoz stoğunun hazırlanması

5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside [X-galactose (Xgal), MA 408.629, Amresco] kimyasalı β -galaktosidaz enzimi tarafından parçalanmakta ve mavi renk oluşmaktadır. β -galaktosidaz enziminin aktif olmadığı durumlarda (insersiyonal inaktivasyon) ise Xgal parçalanmamakta ve beyaz renk meydana gelmektedir. Çalışmada vektör üzerinde bulunan *LacZ* geninin IPTG kimyasalı kullanılarak transkripsiyonu teşvik edilmiştir. Transkripsiyon ve translasyon sonucu oluşan β -galaktosidaz enzimi ortamda bulunan Xgal kimyasalını parçaladığı zaman mavi renkli koloniler ortaya çıkmıştır. Ancak *LacZ* geninin üzerinde bulunan çoklu

klonlama bölgesine DNA parçacığı girdiğinde *LacZ* geninin aktivasyonu durmakta ve beyaz renk meydana gelmiştir.

Xgal stok solüsyonu 0.25 g Xgal tartılarak 6.25 ml Dimethyl sulfoxide (DMSO) içerisinde tamamen çözüldükten sonra 6.25 ml steril su (RNaz ve DNaz'lardan ari) ile 12.5 ml'ye tamamlanarak 20 mg/ml stok hazırlanmıştır. Xgal DMSO ile reaksiyona girdiği zaman ekzotermik bir reaksiyon oluşturduğu için ağzı sıkıca kapatılmadan soğumaya bırakılmış ve 0.42 mikron çapında membran filtre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonu 1 ml'lik hacimlerde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.24.7. Amfisilin-LB sıvı bakteri kültür ortamı

Sıvı bakteri kültür ortamında 1 litrelik solüsyon için 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 10 g NaCl tartılarak 980 ml steril su ile çözümlenerek 1 ml 5M NaOH ile pH'sı 7.5'ye ayarlanarak hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 20 dakika sürede otoklavlanarak sterilize edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

Seçilen tek bir koloninin çoğaltımı için 100 ml'lik erlenmayer içerisinde 10 ml LB pH 7.5 ortamına 5 µl amfisilin (100 µg/µl) ilave edilerek kullanılmıştır.

3.24.8. Amfisilin-LB katı bakteri kültür ortamı

Katı bakteri kültür ortamında 1 litrelik solüsyon için 10 g Tripton, 5 g Maya ekstraktı 10 g NaCl tartılarak 980 ml steril su ile çözümlenerek 1 ml 5 M NaOH ile pH'sı 7.5'ye ayarlanarak hacmi 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika sürede otoklavlanmıştır.

Otoklav sterilizasyonu tamamlanınca hazırlanan ortamın sıcaklığı 55-60°C'ye düştükten sonra 0.5 ml Amfisilin (100 µg/µl), 1.2 ml IPTG (0.1 M) ve 1.2 ml Xgal (20 mg/ml) ilave edilerek karıştırılmıştır. Steril tek kullanımlık 12 cm'lik petri kaplarına 35 ml ortam dağıtılarak steril şartlarda soğumaya bırakılmıştır. Ortamlar petri kaplarında soğuyup donduktan sonra kapakları kapatılmış, streçfilm ile sarılmış ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

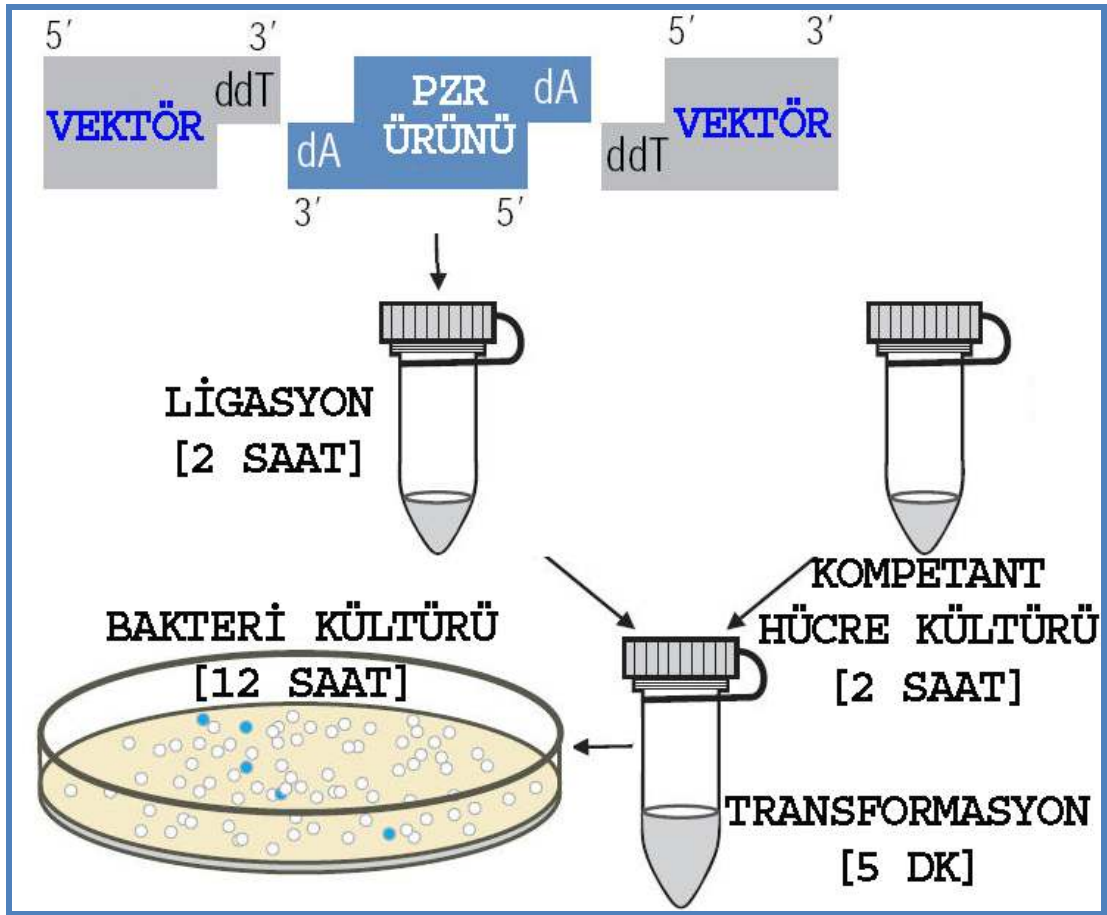
3.24.9. Bakteri ana stoğu

E. coli JM107 bakteri ırkı ana stoğu hazırlanırken kurutularak dondurulmuş kompetant hücrelerin bulunduğu tüpe 0.5 ml sıvı LB-Sıvı (pH 7.0) kültür ortamı ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. İki yöntemle bakteri ana stoğu çoğaltılmıştır. Birinci yöntemde LB-Katı (pH 7.0) plakanın (petri kabı) üzerine hazırlanan kompetant hücre stoğundan 20 µl ve 80 µl alınarak plakanın 5 bölgesine pipetle yerleştirilmiş ve L-Baget yayma çubuğu ile solüsyon plaka üzerini tamamen eşit oranda kaplayacak şekilde dağıtılmıştır. Bu dağıtma işleminin ardından 100 µl LB-Sıvı (pH 7.0) kültür ortamı plaka üzerine eşit oranda eklenmiş ve tüm yüzeye yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan plakalar sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan bir etüv içerisinde düz bir konumda 12 saat süre ile inkübe edilmiştir.

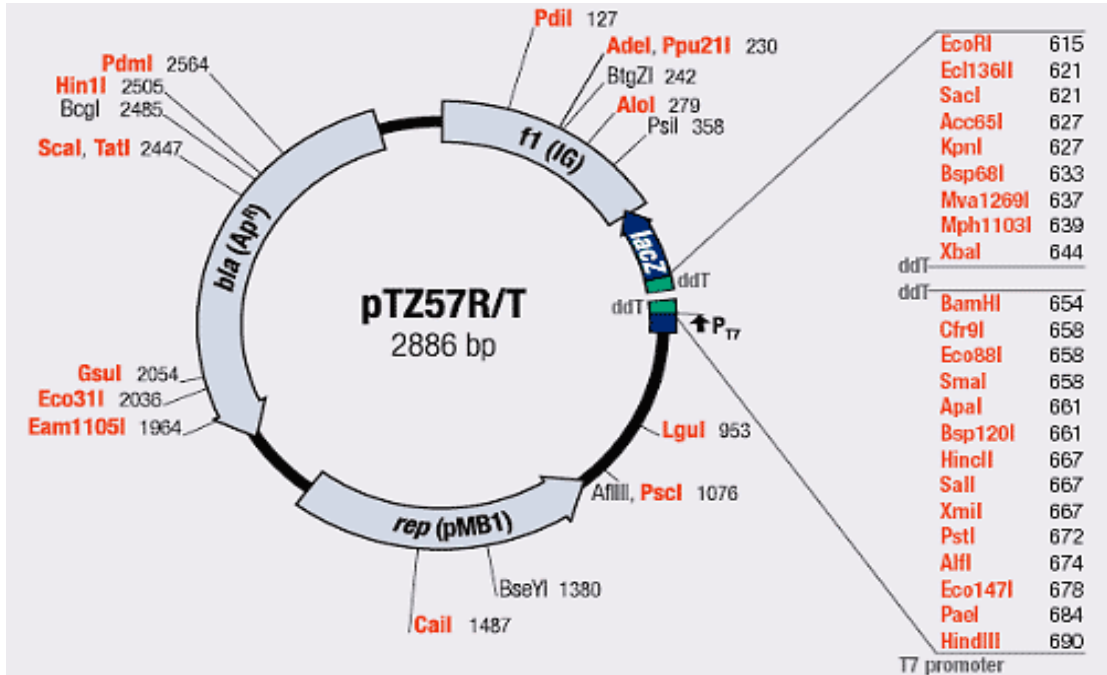
İkinci yöntemde ise bakteri ana stoğu için 100 ml'lik erlenmayer içerisinde 10 ml LB-Sıvı pH 7.0 ortamı eklenmiş ve içerisine kompetant hücre stoğundan 20 µl ilave edilerek nazikçe karıştırılmış, erlenmayerin ağzı parafilm ile sarıldıktan sonra 37°C'ye ayarlanmış olan bir orbital çalkalayıcı içerisinde 250 RPM hızda 12 saat sürede kültürü yapılarak sıvı bakteri stoğu elde edilmiştir. Bu aşamada yürütülen çalışmaların tamamı steril ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

3.25. Amplikonların Sekanslama Vektörüne Aktarılması

Klonlama işlemi Fermentas firmasının bir ürünü olan InsTAclone™ Cloning Kit kullanılarak Ligasyon, Transformasyon ve Rekombinant klonların teyit edilmesi olarak 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Yapılan ligasyon ve transformasyon işlemlerinin şekilsel gösterimi Şekil 3.9'da sunulmuştur. InsTAclone™ Cloning Kiti 0.055 µg/µl konsantrasyonunda 2886 bp uzunluğunda pTZ57R/T vektörü içermektedir (Şekil 3.10). Kit içerisinde ligasyon işleminde enzimin etkin çalışması için gerekli olan 5X ligasyon çözeltisi ve 30 µl olan *T4* DNA ligaz (5 ünite/µl) enzimi 20 mM TRIS-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA ve %50 gliserol bulunan koruma çözeltisi içerisinde bulunmaktadır. Kontrol PZR fragmenti büyüklüğü 953 bp olan 0.042 µg/µl konsantrasyonunda klonlama işleminin kontrol edilmesi amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Kullanılan ligasyon ve transformasyon işlemlerinin şematik gösterimi



Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan pTZ57R/T vektörün genetik haritası

Süper kıvrımlı yapıda 3838 bp büyüklüğünde kontrol DNA fragmenti içeren pTZ57R vektörü (0.1 µg/µl) ve süper kıvrımlı yapıda 2886 bp büyüklüğünde DNA parçası içermeyen pTZ57R vektör DNA (0.1 µg/µl) transformasyonun kontrolünde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Transformasyon çalışmalarında 0.22 µm filtre ile sterilize edilmiş su, TransformAid™ bakteriyel transformasyon sistemi C-Ortamı (C-Medium), T-Solüsyonu A (T-Solution A) ve T-Solüsyonu B (T-Solution B) kullanılmış olup tüm stok solüsyonlar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.25.1. Ligasyon

Ligasyon reaksiyon 0.2 ml’lik PZR tüplerinde gerçekleştirilmiş, vektör ve 5X ligasyon çözeltisi karışım halinde hazırlanarak PZR ürünü üzerinde ilave edildikten sonra *T4* DNA Ligaz enzim eklenerek hafifçe vortekslenip, kısa süreli santrifüjlenmiş ve 4 saat 22°C’de termal döngü cihazında inkübe edilmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan kimyasal konsantrasyonları

<i>Kullanılan Kimyasallar</i>	<i>Stok</i>	<i>Miktar</i>	<i>Final</i>
Vektör	4.95 µg	2 µl	0.95 µg
PZR Ürünü		21 µl	
5X Ligasyon Çözeltisi	5X	6 µl	1X
<i>T4</i> DNA Ligaz	5 ünite/µl	1 µl	5 ünite
Toplam Reaksiyon Hacmi		30 µl	

3.25.2. Transformasyon ve protokolü

Klonlama işleminde kullanılan InsTAclone™ Cloning Kit içerisinde bulunan C-Ortamı’ndan steril kabinde 50 ml’lik steril test tüpü içerisine 1.5 ml eklenmiştir. Daha sonra 37°C’ye ayarlanmış olan orbital çalkalayıcı içerisinde 30 dakika bekletilmiştir.

Transformasyon işlemleri aşağıda özetlenmiştir;

1. Bekleme süresinin sonunda daha önce LB agar pH 7.0 ortamında büyütülmüş olan kompetant hücreleri taşıyan plakadan 4x4 mm'lik bir alandan öze ile bir koloni alınarak 37°C'de bekletilmiş olan 1.5 ml'lik C-Ortamı içerisine daldırılmış ve iyice karıştırıldıktan sonra tekrar orbital çalkalayıcı içerisine konularak 250 RPM hızda tam 2 saat boyunca büyütülmüştür.
2. Bu sürenin tamamlanmasına 20 dakika varken kullanılacak olan LB-Amfisilin Katı (pH 7.5) plakalar ön ısıtma yapmak için 37°C'ye ayarlanmış olan etüv içerisinde ters konularak bekletilmiştir.
3. Transformasyonda kullanılacak bütün solüsyonlar ve ligasyon yapılmış olan vektör granül buz üzerine çıkartılmıştır. T-Solüsyonunu hazırlamak için 425 µl T-Solüsyonu A ve 425 µl T-Solüsyonu B alınarak bir tüpte karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir.
4. C-Ortamının ve kompetant hücrelerin çalkalama süresi tam 2 saati doldurunca orbital çalkalayıcıdan alınmış pipet ile 2 ml'lik Ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 12000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek oluşan üst fazı uzaklaştırılmış ve pellet bırakılmıştır.
5. Granül buz üzerinde bekletilmekte olan T-Solüsyonundan 300 µl ile pellet tekrar süspanse edilmiş ve buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada hem T-Solüsyonu ile kimyasal etki yaratılarak hücre zarı porlarının açılması hem de C-Ortamı kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sürenin sonunda oda sıcaklığında 12000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek oluşan üst fazı pipet ile uzaklaştırılmıştır.
6. Oluşan pellet 120 µl T-Solüsyonu ile tekrar çözülmüş ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada kimyasal etki ile hücre zarları üzerinde bulunan porların açılması sağlanmıştır. Bekleme aşamasında 5 µl ligasyon yapılmış olan vektör ve PZR DNA ürünüden alınarak 1.5 ml'lik Ependorf tüpünün tabanına konulmuş ve 2 dakika bekletilmiştir.
7. Toplam 5 dakika olan sürenin sonunda 120 µl T-Solüsyonu ile süspanse edilmiş ve granül buz üzerinde bekletilmiş olan süspanse hücrelerden 50 µl alınarak granül buzda bekleyen 5 µl ligasyon ürününe karıştırılmıştır. Tam 5

dakika granül buz üzerinde inkübe edilmiştir. Bu aşamada açılmış olan hücre porlarından vektör+DNA'nın bakteri hücrelerine girmesi sağlanmıştır.

8. Sürenin sonunda steril kabin içerisinde bu 50 µl'lik solüsyon ön ısıtma yapılmış LB-Amfisilin Katı (pH 7.5) plakalar üzerine ekilmiştir. Ekme işlemi sırasında plakanın 5 bölgesine pipetle yerleştirilmiş ve L-Baget yayma çubuğu ile solüsyon plaka üzerini tamamen eşit oranda kaplayacak şekilde dağıtılmıştır. Bu dağıtma işleminin ardından 100 µl LB Sıvı (pH 7.5) kültür ortamı plaka üzerine eşit oranda eklenmiş ve tüm yüzeye yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan plakalar sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan etüv içerisinde düz bir şekilde 15-18 saat süre ile inkübe edilmiştir.

3.25.3. Rekombinant klonların analizi

Transformantları taşıyan rekombinant kolonilerin seçiminde LB Amfisilin Katı (pH 7.5) ortamına ilave edilen IPTG ve Xgal kimyasallarından yararlanılmıştır. Ekme işleminin ardından plakalar üzerinde koloni gelişimi gözlenmiştir. Koloni büyüklüğü arttıkça mavi ve beyaz renk ayırt edilmiştir. Beyaz renkli koloniler rekombinant bakteri hücrelerinin seçiminde kullanılmıştır.

Onbeş veya 18 saatlik sürenin sonunda beyaz renkteki tek koloniden (rekombinant vektör taşıyan koloniler) lup ile bir kez dokunarak alınmış ve steril ortamda 100 ml'lik erlenmayer içerisinde 10 ml LB Sıvı (pH 7.5) ortamı konulup içerisine 5 µl Amfisilin (100 µg/µl) ilave edilerek hazırlanmış olan ortam içerisine lup daldırılarak erlenmayerin ağzı parafilm ile sarılmış ve hücrelerinin çoğaltımı yapılmıştır. Çoğaltım için 37°C'ye ayarlanmış olan orbital çalkalayıcı üzerinde 12 saat 250 RPM hızda çalkalanmıştır. Oniki saatlik çoğaltma süresinin sonunda bakterilerden plazmit DNA ekstraksiyonu aşamasına geçilmiştir.

3.26. Plazmit DNA Ekstraksiyonu

Plazmit DNA ekstraksiyonu Roche Applied Science firmasının "High Pure Plasmid Isolation Kit" plazmit DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.26.1. Kimyasallar ve çözeltiler

Süspansiyon çözeltisi olarak 50 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) kullanılmıştır. RNaz A (2.5 mg) içeren 1 ml süspansiyon çözeltisi kullanılarak çözülmüş ve süspansiyon çözeltisinin içerisine ilave edilerek hazırlanmıştır. Lezyon çözeltisi 0.2 M NaOH ve %1 SDS içermektedir. Bağlama çözeltisi 4 M guanidin hidroklorit [guanidine hydrochloride (GHCl)] ve 0.5 M potasyum asetat [potassium acetate (KOAc), pH 4.2] içermiştir.

Yıkama çözeltisi I içerisinde 5 M GHCl, 20 mM TRIS-HCl (pH 6.6) bulunmakta olup toplam 33 ml'lik hacmi olan çözelti içerisine 20 ml Saf etil alkol eklenerek kullanılmıştır. Bu yıkama çözelti özellikle yüksek oranda nükleaz aktivitesi olan bakteri ırkları için tercih edilmektedir. Yıkama çözeltisi II içerisinde 20 mM NaCl, 2 mM TRIS-HCl (pH 7.5) içermekte olup 10 ml solüsyona 40 ml Saf etil alkol eklenerek kullanılmıştır. Elüsyon çözeltisi olarak 10 mM TRIS-HCl (pH 8.5) kullanılmıştır.

3.26.2. Plazmit DNA ekstraksiyon protokolü

1. 50 ml Erlenmayer içerisinde 10 ml'lik LB Amfisilin (pH 7.5) sıvı ortamında 37°C'de 250 RPM hızda 12 saatlik kültür sonrası çoğaltılmış olan bakteri kolonisi steril kabin içerisinde 50 ml'lik steril test tüpleri içerisine aktarılmıştır.
2. Test tüpleri 6000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet 1 ml LB Sıvı (pH 7.0) ortamında çözülmüştür.
3. Çözülme işlemi tamamlandıktan sonra 2 ml'lik Ependorf tüplerine transfer edilmiştir. Ardından santrifüj içerisinde 12000 xg de 1 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır.
4. Pellet üzerine RNaz içeren süspansiyon çözeltisinden 250 µl ilave edilerek karıştırılarak süspanse edilmiş sonra üzerine 250 µl lezyon çözeltisinden eklenerek 6 kez ters düz edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5. Sürenin sonunda üzerine 350 µl bağlama çözeltisi ilave edilmiş ve 6 kez ters düz edilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 13000 xg de 10 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz koleksiyon tüpüne alınmıştır.
6. Koleksiyon tüpü 13000 xg de 1 dakika santrifüjlenmiş santrifüj sonrası tüp kartuşu kaldırılarak alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır. Üzerine 500 µl Yıkama çözeltisi I ilave edilmiş ve koleksiyon tüpü 13000 xg de 1 dakika mikrosantrifüj sonrası tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır. Koleksiyon tüp kartuşu üzerine 700 µl yıkama çözeltisi II ilave edilmiş ve koleksiyon tüpü 13000 xg de 1 dakika santrifüjlenerek sonrasında tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır. Kartuş boş şekilde koleksiyon tüpü son kez 13000 xg de 1 dakika santrifüjlenerek sonrasında tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık kalıntıları da uzaklaştırılmıştır.
7. Kartuş yeni steril tüpün üzerine konularak 100 µl elüsyon çözeltisi tam silika tabanın üzerini kaplayacak şekilde ilave edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 13000 xg de 1 dakika santrifüjlenerek kartuş tüp üzerinden alınmış ve örnek etiketlenerek -20°C’de saklanmıştır.

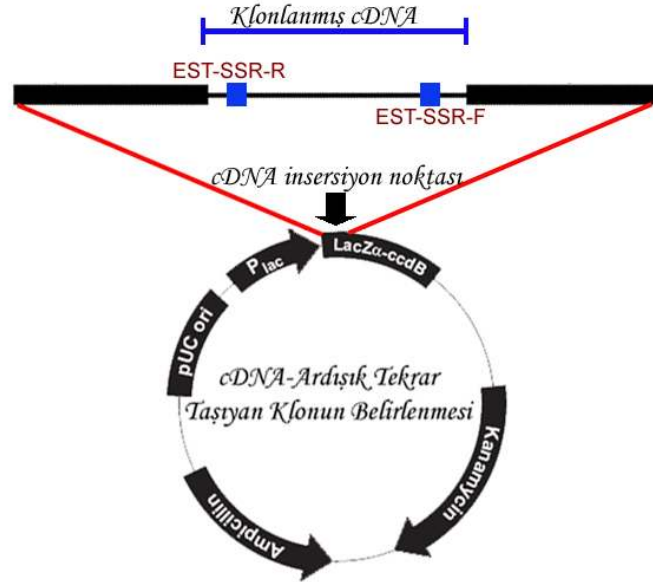
3.27. Rekombinant Vektörlerin Teyidi

3.27.1. PZR yöntemi

Pozitif klonların (amplikon taşıyan vektörlerin) PZR yöntemiyle teşhisinde kullanılan yöntemde klonlara ait mikrosatellit primer setleri kullanılmış ve strateji Şekil 3.11’de özetlenmiştir. PZR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen teyit çalışmalarında Fermentas *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılmış ve vektöre entegre edilen mikrosatellit lokusuna özgü AGi primer setleri kullanılmıştır.

Plazmit DNA ekstraksiyonu yapıp 100 µl elüsyon çözeltisi içerisinde çözülen vektör DNA örneğinden PZR için 5 µl kullanılmıştır. PZR reaksiyonunda diğer tüm kullanılan çözeltilerin ve primerlerin konsantrasyonları değiştirilmemiştir. PZR sonucunda metafor agaroz jel elektroforez yöntemiyle alınan amplikonlar ve onlarla

beraber kontrol yürütülen her bir allele ait PZR fragmenti ile büyüklükleri kıyaslanarak hedeflenen bölgenin transfer edilip edilmediği tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Pozitif klonların PZR yöntemiyle belirlenmesi

3.27.2. Restriksiyon enzimleri (RE) ile kesim yöntemi

Restriksiyon enzimleriyle (RE) kesim yönteminde vektör üzerinde çoklu klonlama bölgesinin uç kısımlarında kesim bölgesi bulunan *EcoR* I ve *Hind* III restriksiyon enzimleriyle kesim yapılmıştır. Ligasyon içermeyen toplam plazmit büyüklüğünün 2886 kb olduğu bilindiği için kesim yapıldığı zaman beklenen büyüklükte ampikon içerip içermediğine göre değerlendirme yapılmıştır.

3.28. Amplikonların Sekans Analizleri

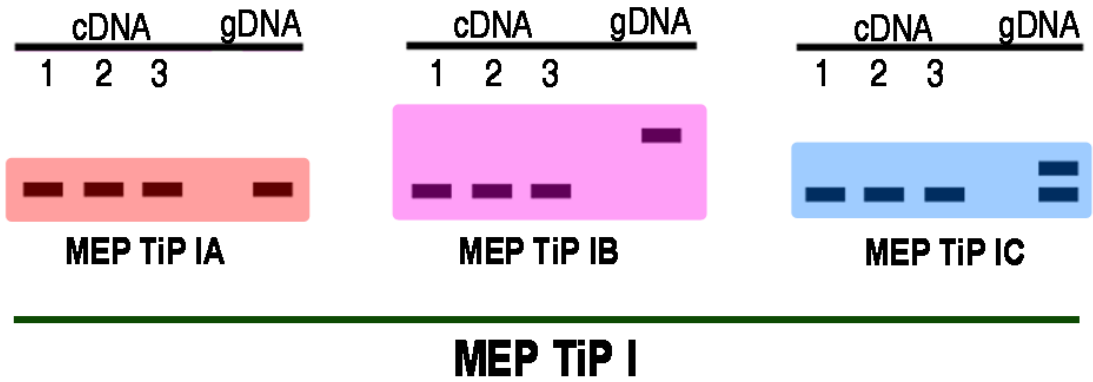
Sekanslama (DNA Dizi Analizi) DNA üzerinde bulunan baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Çalışmada DNA Dizi Analizi Macrogen (Güney Kore) Firmasına yaptırılmıştır. Sekanslama işlemi Sanger metodu temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Toplam 48 örnek olan plazmit sayısı çift tekerrürlü olarak gönderilmiş yani 96 örnek üzerinde DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sekanslama işleminde universal M13F-pUC primer seti (İleri sekans: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC, Geri sekans: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC) kullanılmıştır.

3.29. Sekans Verilerinin Analizi ve Mikrosatellit Ekspresyon Profilleri

Mikrosatellit lokuslarının 16 cDNA kütüphanesi üzerinde oluşturdıkları amplikonların büyüklüklerine ve yoğunluklarına göre yapılan değerlendirmede doku, organ ve gelişme dönemine özgü ifade gösteren mikrosatellit lokusları tespit edilerek mikrosatellit ekspresyon profilleri (MEP) oluşturulmuştur.

Mikrosatellit ekspresyon profilleri (MEP) MEP TiP I, II, III, IV ve V olarak gruplandırılmıştır. Genomik DNA ve 16 cDNA kütüphanesi arasında meydana gelen monomorfik veya polimorfik amplikon profillerine göre oluşturulan MEP TiP I grubu 3 ayrı alt gruba bölünmüştür (Şekil 3.12). Mikrosatellit lokuslarında cDNA kütüphaneleri ve genomik DNA üzerinde aynı büyüklükte amplikon alındığı zaman MEP TiP IA alt grubunda değerlendirilmiştir.

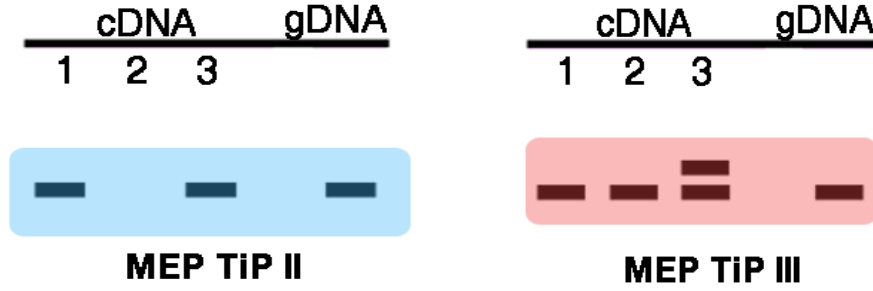
MEP TiP IB alt grubunda ise mikrosatellit lokusuna ait cDNA kütüphanelerinde aynı, genomik DNA üzerinde ise büyük bir amplikon oluşturuyorsa bu alt grupta yer almıştır. MEP TiP IC grubuna ise cDNA kütüphaneleri üzerinde aynı büyüklükte ve paternde amplikon oluştururken genomik DNA üzerinde iki amplikon oluşturan mikrosatellit lokusları dahil edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. MEP TiP I grubu ekspresyon profillerinin şekilsel anlatımı

Mikrosatellit lokusuna ait amplikon paterninin genomik DNA üzerinde aynı büyüklükte varlığı ancak 16 cDNA kütüphanesi içerisinde varlığı ya da yokluğu durumunda MEP TiP II grubu oluşturulmuştur. MEP TiP II grubuna dahil edilen mikrosatellit lokuslarında cDNA amplikonları doku, organ ve gelişme dönemine özgü

amplifikasyon gösterdikleri için bazı dokulara ait cDNA’larda mikrosatellit lokusunun varlığı bazılarında ise yokluğu markır olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.13).

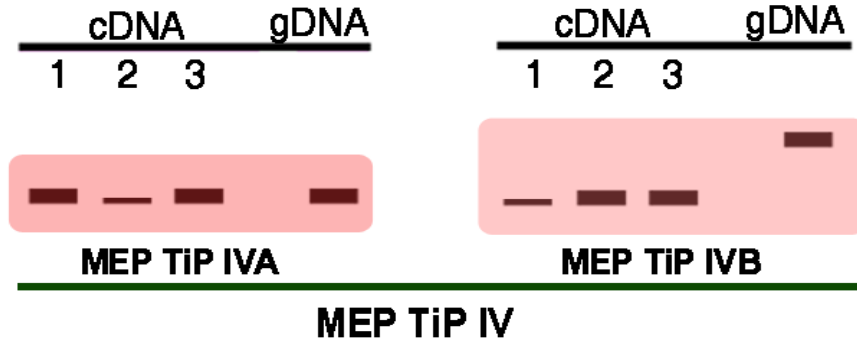


Şekil 3.13. MEP TiP II ve III gruplarında ekspresyon profillerinin gösterimi

MEP TiP III grubu mikrosatellit lokusuna ait ampikon paternin yine genomik DNA üzerinde cDNA bant paterni ile aynı büyüklükte olduğu ancak 16 cDNA kütüphanesi içerisinde bulunan bazı cDNA kütüphanelerinde ekstra bant oluşması durumu MEP TiP III olarak adlandırılmıştır. Bu grupta değerlendirilen mikrosatellit lokuslarında cDNA ampikonları doku, organ ve gelişme dönemine özgü amplifikasyon gösterdikleri için bazı dokulara ait cDNA’larda mikrosatellit lokusunda bulunan ekstra bant doku, organ veya gelişme dönemine özgü markır olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).

MEP TiP IV grubunda yer alan mikrosatellit lokuslarına ait ampikonlar arasında meydana gelen yoğunluk farklılıkları dikkate alınmıştır. Kullanılan mikrosatellit lokusuna ait bant paternlerinde cDNA ve genomik DNA ampikon büyüklükleri aynı boyda ancak cDNA kütüphaneleri arasında elde edilen ampikonlar üzerinde yoğunluk farkı olanlar MEP TiP IVA olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.14).

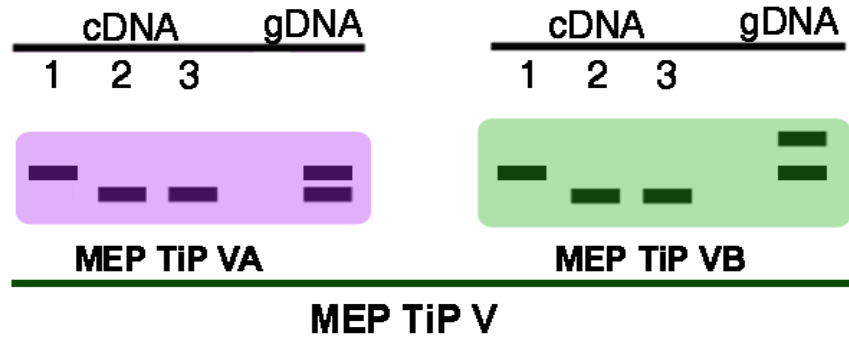
Mikrosatellit ekspresyon profiline göre her dokuda ampikon oluşturmaya rağmen dokular arasında ampikon yoğunlukları arasında fark bulundurarak bu gruba giren primer çiftlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları ampikon büyüklükleri farklı olanlar MEP TiP IVB alt grubuna dahil edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. MEP TiP IV grubunda ekspresyon profillerinin gösterimi

Mikrosatellit lokusuna ait bant paterninde 16 cDNA kütüphanesi içerisinde meydana gelen polimorfik amplikon profili nedeni ile MEP TiP V grubu oluşturulmuştur (Şekil 3.15).

İki alt grupta incelenen MEP TiP V grubunun ilk alt grubu olan MEP TiP VA içerisinde yer alan primer çiftlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri aynı ama bazı dokulara özgü ve genomik DNA’da bir lokus bandının varlığı veya yokluğu dikkati çekmiştir. MEP TiP VB alt grubu ise yer alan mikrosatellit lokusları üzerinde meydana gelen cDNA ve genomik DNA üzerinde amplikon büyüklüklerinin birbirinden farklı olduğu durumda oluşturulmuştur (Şekil 3.15).

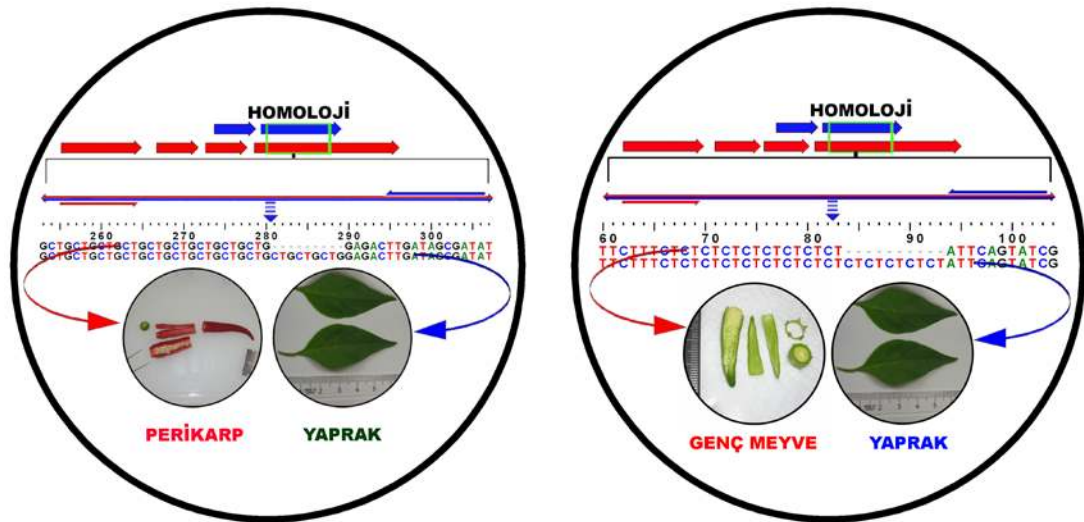


Şekil 3.15. MEP TiP V grubunda ekspresyon profillerinin gösterimi

MEP gruplarının oluşturulmasının yanı sıra mikrosatellit lokuslarının amplifikasyonunda kullanılan primerlerin dizayn edildikleri EST’ler tekrar analiz edilerek mikrosatellit alanların kodlayan yada kodlamayan (UTR) bölgelerde bulunmalarına göre de değerlendirilmiştir.

Sequencher 4.8 programı kullanılarak 83 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokuslarına ait DNA dizileri ile yapılan kontig analizi sonucu gen veya gen parçasına ait bölgelerin üzerinde bulunan mikrosatellit tekrarlarının yerleri ve oluşturabilecekleri amino asit dizilimleri BioEdit ve ExPasy programları ile belirlenmiştir.

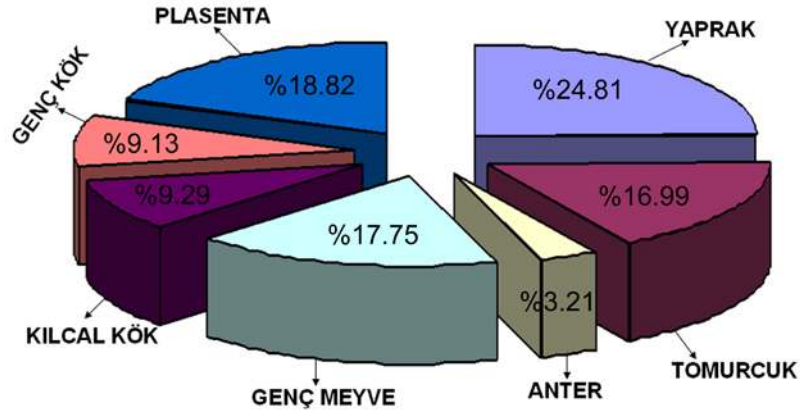
Elde edilen sekans verileri GenBank veri tabanı kullanılarak bu sekansların fonksiyonlarını homoloji testleri ile belirleyebilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılmıştır. Homoloji testlerinde özellikle mikrosatellit alanlarında var olan sekans farklılıkları dikkate alınmıştır. Şekil 3.16'da örneği gösterilen bu tür yaklaşımlarla aynı genin farklı sayıda mikrosatellit içeriklerinin fonksiyonlarını belirleyebilmek mümkün olmaktadır (Ince vd 2008).



Şekil 3.16. Homoloji analizlerinde mikrosatellit varyasyonunun gösterilmesi

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada *in silico* yöntemler uygulanarak yedi farklı organ, doku veya gelişme dönemine ait EST verilerinin analizleri sonucu GenBank veri tabanında biber bitkisi ile yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin büyük çoğunluğunun genç meyve, plasenta, çiçek tomurcuğu ve yapraklardan elde edilen EST verilerinden oluştuğu belirlenmiştir. Şekil 4.1’de gösterildiği üzere çalışmada kullanılan EST verilerinin büyük çoğunluğu yaprak cDNA kütüphanesinde bulunurken en az EST verisi ise yaklaşık %3 ile anter cDNA kütüphanesinde saptanmıştır. cDNA kütüphanelerine ait EST verilerinin toplam nükleotit sayısı 9 927 817 (9.3 Mb) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Veriler ortalama EST uzunluklarına göre değerlendirildiğinde en kısa EST uzunluğu genç kök cDNA kütüphanesinde (398.60 nükleotit) belirlenirken en uzun EST uzunluğu anter dokusu cDNA kütüphanesinde (602.37 nükleotit) kaydedilmiştir. Diğer dokularda ortalama EST büyüklüğü 435.92 ile 545.19 nükleotit sayısı arasında değişmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan EST verilerinin organ, doku veya gelişme dönemlerine göre dağılımı

Analiz edilen cDNA kütüphaneleri içerisinde EST’lerin minimum baz uzunluğu yaprak, çiçek tomurcuğu, anter ve genç meyve cDNA kütüphanelerinde 150 baz olarak saptanırken genç kök cDNA kütüphanesinde 152 baz, plasenta ve kılcal kök cDNA kütüphanelerinde ise 153 baz sayısı olarak tespit edilmiştir. cDNA kütüphanelerinde bulunan EST’lerin maksimum baz uzunluğu incelendiği zaman 666 baz sayısı ile 850 baz sayısı arasında değişmiştir. Genç kök cDNA kütüphanesinde

bulunan EST'ler maksimum 666 baz sayısına sahip olduğu görülürken kılcal kök cDNA kütüphanesinde bulunan EST'lerin maksimum 688 baz sayısı olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan kütüphaneler arasında kök dokusuna ait EST'lerin baz sayısının diğerlerine oranla daha düşük olduğunu görmüştür.

Maksimum EST büyüklüğü plasenta dokusuna ait cDNA kütüphanesinde 699 baz sayısı, genç meyve cDNA kütüphanesinde 757 baz sayısı, anter cDNA kütüphanesinde 800 baz sayısı, tomurcuk cDNA kütüphanesinde 809 baz sayısı olarak tespit edilmiştir. cDNA kütüphanelerinde bulunan EST'lerin maksimum baz uzunluğu en yüksek 850 baz sayısı ile yaprak cDNA kütüphanesinde saptanmıştır.

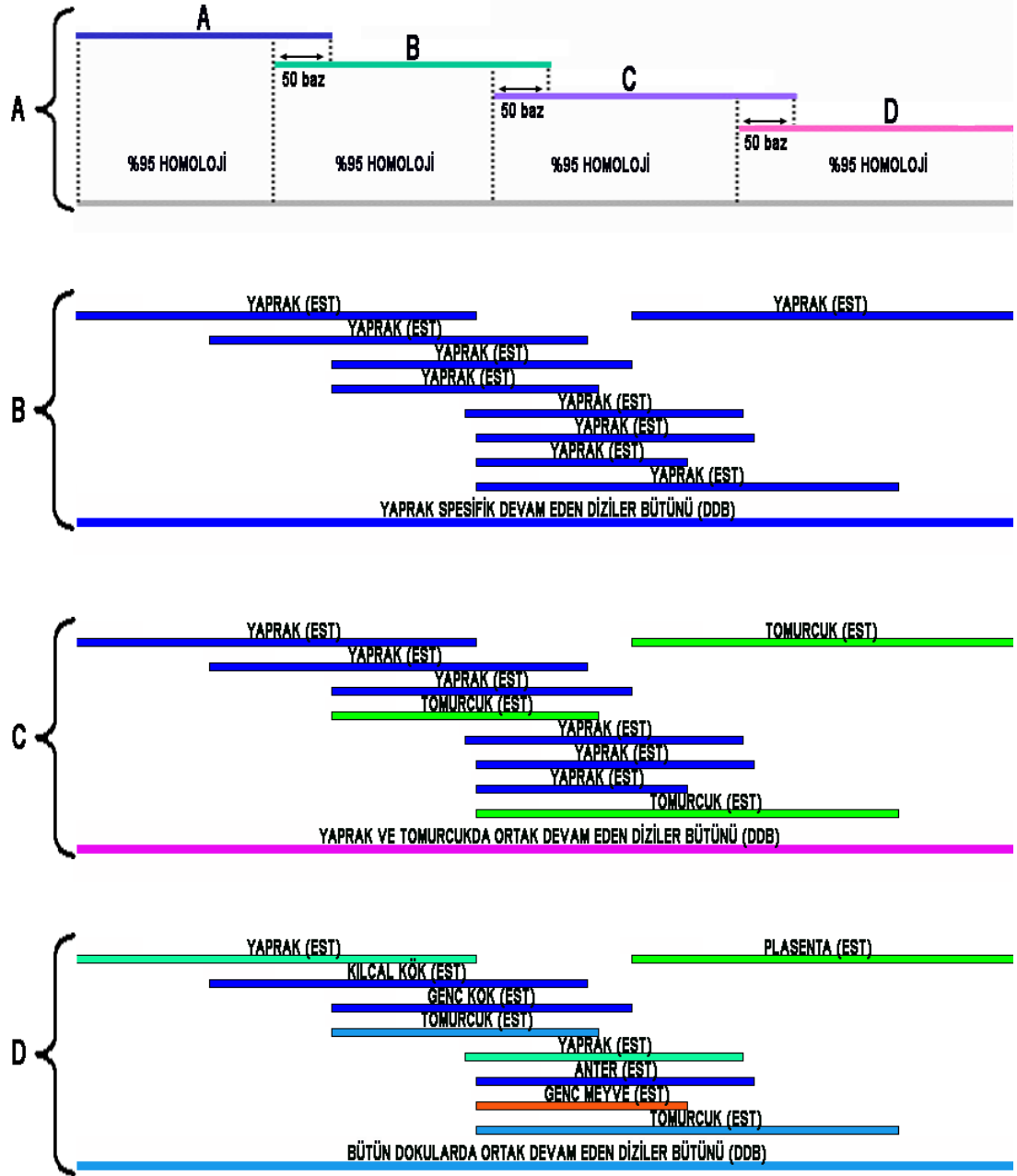
Çizelge 4.1. *Capsicum annuum* L. cDNA kütüphane verileri

<i>cDNA Kütüphaneleri</i>	<i>ID</i>	<i># Baz (Mb)</i>	<i># EST</i>	<i>Ortalama EST Uzunluğu</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>
Yaprak	KS01	2.81	5145	545.19	150	850
Tomurcuk	KS07	1.67	3524	474.12	150	809
Anter	KS08	0.40	666	602.37	150	800
Genç Meyve	KS09	1.71	3681	464.61	150	757
Kılcal Kök	KS10	0.84	1926	435.92	153	688
Genç Kök	KS11	0.75	1893	398.60	152	666
Plasenta	KS12	1.75	3903	447.47	153	699
Toplam		9.93	20 738			

#: Sayı, ID: Kütüphane ismi, Min: minimum nükleotit sayısı, Maks: maksimum nükleotit sayısı

4.1. EST Verilerinin Kontig Analizleri

Çalışmada kullanılan EST verileri analiz edilerek aralarında var olabilecek aynı EST'lerin uzaklaştırılması, aynı olmayan ve büyük oranda homoloji gösteren EST'lerin kütüphaneler arasında paylaştırılması amacı ile Sequencher 4.8 biyoinformatik yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada kontig her bir EST'yi, konsensus ise birbirlerinin aynısı veya %95 düzeyde homoloji gösteren ve en az 50 nükleotit bilgi ile örtüşmüş olan EST (kontig) olarak kullanılmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kontig analizleri ile EST'lerin yeniden sınıflandırılması. Şekilde A paneli ile bu tez kapsamında kullanılan analiz kriterleri özetlenmiştir. En az 50 baz ve %95 homoloji analizine göre kontiglerin konsensusların oluşturulması gösterilmektedir. B panelinde ise yaprak dokusuna özgü kontig ve konsensusların gösterilmektedir. Burada mavi olarak gösterilen EST'ler yaprağa özgü ifade edilen genler olarak öngörülmüş ve yaprak spesifik DDB olarak adlandırılmıştır. C panelinde ise yaprak ve tomurcuk dokusunda ortak kontig ve konsensusların gösterilmekte olup bu tür kontigler hem yaprak hem de tomurcukta ifade edilen DDB'ler olarak adlandırılmıştır. D panelinde ise bütün dokularda ortak kontig ve konsensusların göstermekte olup ortak DDB'leri göstermektedir

GenBank verileri birçok grup ve araştırmacının verilerini içermesi nedeni ile aynı EST veya çok benzer EST'lerden oluşabildiği için bu çalışmada kontig analizleri yapılarak kullanılacak verilerdeki aynılık veya fazlalıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır (Ince vd 2008). Çizelge 4.2'de gösterildiği üzere organ, doku veya gelişme dönemlerine ait EST'lerin analizi ile konsensus (Devam Eden Diziler Bütünü: DDB) ve hiçbir konsensusta yer almayanlar da singletons (Teksel Diziler: TD) verileri haline dönüştürülmüştür.

Çizelge 4.2. *Capsicum* cDNA (EST) kütüphanelerinde kontig analiz sonuçları

Tip	Baz Çifti (bç)	Sayı	Ortalama	Minimum	Maksimum
DDB	2 201 400	2984	737.74	163	3183
TD	3 356 894	7009	478.94	150	850
Toplam	5 558 294	9993			

DDB: devam eden diziler bütünü, TD: tekssel diziler

Analiz sonucu 20 738 DNA sekansı 2984 adet devamlı diziler bütünü oluştururken 7009 adet DNA dizisinin birbirinden farklı tekssel diziler meydana getirdiği tespit edilmiştir. Her bir devamlı diziler bütünüünün en az 2 ve en fazla 92 adet kontigden oluştuğu görülmüştür. Devamlı diziler bütünüünün boyu boşluklar uzaklaştırılmadan 163 baz çifti ile 3186 baz çifti arasında değişirken tekssel dizilerin büyüklüğü ise 150 baz çifti ile 850 baz çifti arasında değişmiştir. Toplam 5 558 294 baz çiftinden oluşan 20 738 DNA sekansı içerisinde devamlı diziler bütünü 2 201 400 baz çiftinden oluşurken tekssel diziler ise 3 356 894 baz çiftinden oluşmuştur. Tekssel diziler için ortalama EST büyüklüğü 478 baz sayısı iken devamlı diziler bütünü için 737 baz sayısı ortalama EST büyüklüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

4.2. Mini Veri Bankasının (MVB) Oluşturulması

Çalışmada kullanılan EST verileri kontig analizlerinin tamamlanması ile birlikte aynı EST'ler uzaklaştırılmış ve EST verileri daha gerçekçi organ, doku ve gelişme dönemlerine özgü veriler haline dönüştürülmüştür. Bu verilerin her birine kalem (entry) adı verilmiştir. Oluşturulan MVB tezin ek kısmında bir CD içerisinde verilmiştir.

MVB’de bulunan:

- i) Her bir TD bir kütüphaneye özgü olan ve diğer kütüphanelerde bulunmayan kalemlerden oluşmaktadır. Bu tez kapsamında bu tip kalemler S ile gösterilmiştir.
- ii) Her bir DDB ise birden fazla kontigden oluşan kalemleri simgelemektedir. Bu tez kapsamında KS ve KO olarak isimlendirilen iki farklı DDB bulunmaktadır. KS sadece tek bir kütüphaneye özgü kontiglerden oluşurken KO birden fazla kütüphanenin kontiglerinden oluşturulmuştur.

Çizelge 4.3’te MVB elementleri gösterilmiş ve her kütüphaneye ait toplam baz sayıları, ortalama baz uzunlukları hangi dokuda kaç kalem bulunduğu ve hangi gruba dahil olduğu verilmiştir. Her bir kütüphane için S, KS ve KO’ların istatistiksel analizleri için ise Tip I ve Tip II ifadelerinin ardından kütüphane baş harfi kullanılmıştır.

Çizelge 4.3’te görüldüğü gibi anter dokusuna ait teksel dizilere ait 355 adet kalem oluşmasına rağmen bu dokuya ait spesifik konsensuseda bulunan kalem sayısı sadece 20 adet olarak tespit edilmiştir. Bu iki gruptaki kalemler Tip I AO (anter dokusuna özgü teksel ve devam eden diziler için) olarak nitelendirilmiştir. Anter dokusu ile diğer dokular arasında ortak konsensus oluşturan 135 kalem Tip II A (anter dokusuyla ortak ifade bulan devam eden diziler) olarak isimlendirilmiştir. Tomurcuk dokusuna özgü teksel diziler 935 adet kalemde oluşurken bu dokuya özgü ifade bulan devam eden diziler bütünü 189 adet kalem spesifik konsensus bir arada incelenerek Tip I T0, diğer dokularla ortak ifade bulan 795 kalem ise Tip II T olarak adlandırılmıştır.

Genç kök dokusuna özgü teksel diziler 679 kalem, devam eden diziler bütünü 31 kalem Tip I G0 olarak değerlendirilirken diğer dokularla ortak ifade bulan 750 kalem Tip II G ismiyle nitelendirilmiştir. Genç meyve dokusuna özgü teksel diziler 948

kalem ve dokuya özgü devam eden diziler bütünü 133 kalem olarak Tip I M0, dokular arası ortak ifade olan 917 kalem Tip II M olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.3. Doku spesifik cDNA kütüphanelerinin yeniden yapılandırılması

<i>Veri Bankası</i>	<i>Uzun. (bp)</i>	<i># Kalem</i>	<i>Ort. Uzun.</i>	<i>Tipler</i>
Anter (KS)	15 617	20	780.850	Tip I A0
Anter (KO)	129 201	135	957.044	Tip II A
Anter (S)	207 552	355	584.654	Tip I A0
Tomurcuk (KS)	117 187	189	620.037	Tip I T0
Tomurcuk (KO)	679 964	795	855.301	Tip II T
Tomurcuk (S)	442 203	935	472.944	Tip I T0
Genç Kök (KS)	16 771	31	541.000	Tip I G0
Genç Kök (KO)	614 350	750	819.133	Tip II G
Genç Kök (S)	265 423	679	390.903	Tip I G0
Genç Meyve (KS)	80 528	133	605.474	Tip I M0
Genç Meyve (KO)	736 799	917	803.489	Tip II M
Genç Meyve (S)	429 446	948	453.002	Tip I M0
Kılcal Kök (KS)	21 132	34	621.529	Tip I K0
Kılcal Kök (KO)	596 692	713	836.875	Tip II K
Kılcal Kök (S)	312 459	726	430.384	Tip I K0
Yaprak (KS)	237 795	353	673.640	Tip I Y0
Yaprak (KO)	893 738	1019	877.074	Tip II Y
Yaprak (S)	992 164	1775	558.966	Tip I Y0
Plasenta (CS)	82 828	136	609.029	Tip I P0
Plasenta (CM)	823 926	1027	802.265	Tip II P
Plasenta (S)	707 647	1591	444.781	Tip I P0

KS: Kütüphane spesifik DDB, KO: Ortak DDB, S: Singletons veya TD

Kılcal kök dokusuna özgü 726 kalem teksel dizi ve 34 adet devam eden diziler bütünü Tip I K0, diğer dokularla ortak 713 kalem Tip II K olarak adlandırılmıştır. Yaprak dokusuna özgü 1775 kalem teksel dizi ve 353 kalem devam eden diziler bütünü Tip I Y0, diğer dokularla ortak ifade edilen 1019 kalem ise Tip II Y olarak isimlendirilmiştir. Plasenta dokusuna spesifik 1591 kalem teksel dizi ve 136 kalem devam eden diziler bütünü Tip I P0 olarak 1027 kalem diğer dokularla ortak ifade bulanlar ise Tip II P olarak değerlendirilmiştir.

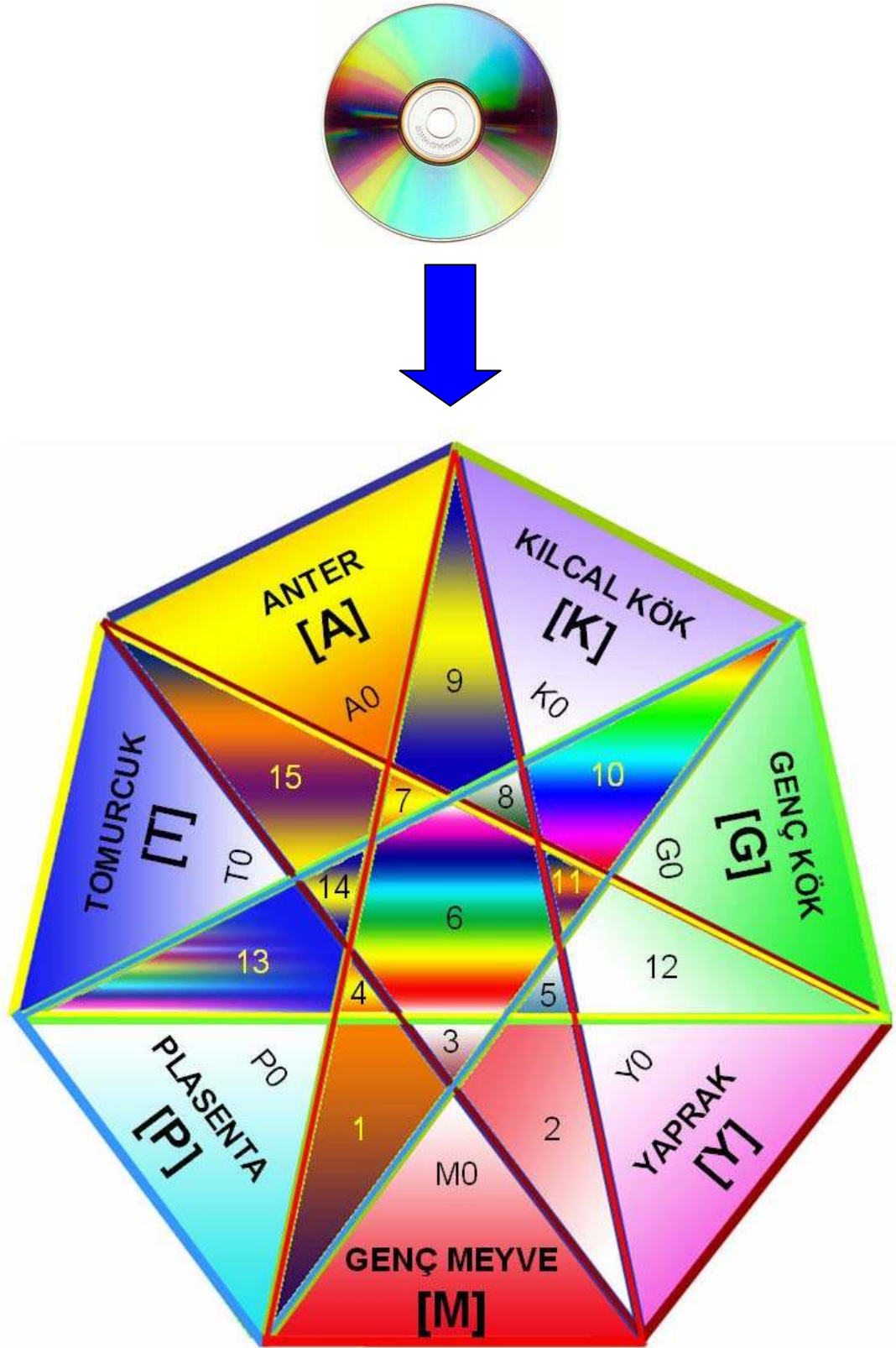
Genel bir değerlendirme yapmak gerekirse spesifik konsensus dizilerinin en fazla yaprak dokusunda bulunurken en az anter dokusunda bulunduğu göze çarpmıştır.

Anter dokusunda çalışılan EST sayısının diğerk dokulara nazaran az olması bu durumun en önemli nedenlerinden biri olarak düşünölmüştür. Ortak DDB (KO) sayısı en fazla olan doku ise plasenta dokusu olarak saptanmıştır. Bu durum plasenta dokusunda ifade olan genlerin çoğunluğunun diğerk dokularda da ifade bulunduğunu göstermektedir. Dokuya özgü en fazla teksele dizi sayısı (S) ise yaprak dokusunda tespit edilmiştir. Bu durum yaprak dokusuna ait genlerin çoğunluğunun diğerk dokularda ifade bulmadığı yönünde yorumlanmıştır.

Çalışmada oluşturulan MVB şekil 4.3'te gösterilmiş ve uygulanan analiz yöntemleri ve dokular arası ilişkiler sırasıyla ifade edilmiştir. Bu veri bankası (MVB) kullanılarak özel iki doku arasında ortak olan EST'ler belirlenebilmektedir. Örneğinin şekil 4.3'te 9 numara ile gösterilen bölgede anter ve kılcal kökte ortak bulunan genler gösterilmektedir. şeklin üç boyutlu görünümünde ise 9 nolu alanın bir kısmında anter, kılcal kök ve genç meyvede ortak bulunan genler bulunmaktadır. Bütün dokularda ifade bulan genler ise 6 numaralı alanda bulunmaktadır. Diğerk taraftan A0 bölgesinde bulunan genler ise salt anterde ifade edilen genleri göstermektedir.

MVB kullanılarak herhangi bir kütüphaneye özgü DDB ve TD veya iki veya daha fazla kütüphanede bulunan DDB ve TD alınabilir ve farklı amaçlar için kullanılabilir. Bu tez kapsamında MVB düzenli ve değişken mikrosatellitlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. MVB mikrosatellit analizleri dışında aşağıda özetlenmiş diğerk çalışmalarda da kullanılabilecek niteliktedir. Bunlar:

- i) Organ, doku ve gelişme dönemine özgü genlerin belirlenmesinde,
- ii) Fonksiyonel DNA markırlarının oluşturulmasında,
- iii) SNP markırlarının oluşturulmasında,
- iv) Organ, doku ve gelişme dönemine özgü problemlerin oluşturulmasında,
- v) Allelik genlerin belirlenmesinde,
- vi) cDNA kütüphanelerin oluşturulmasında,
- vii) Intron ve ekson bölgelerinin belirlenmesi gibi değişik amaçlarla kullanılarak biber bitkisiyle ilgili genetik ve ışlah çalışmalarına katkılar sunabileceği ön görölmüştür.



Şekil 4.3. MVB verilerinin şekilsel gösterimi

4.3. MVB Düzenli Mikrosatellit Analizleri

Çalışmanın bu aşamasında oluşturulmuş olan MVB verileri kullanılarak düzenli ve değişken mikrosatellitlerin biber organ, doku ve gelişme dönemlerindeki dağılımları ve frekansları (yoğunluklarını) araştırılmıştır.

4.3.1. Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz I)

Dokuya özgü ve dokular arası ortak kalemelerde bulunan mikrosatellit bulundurma sıklıklarının değerlendirilmesi yönünde analizler yapılmıştır. Bu analiz yöntemi anter dokusu için ele alınacak olursa Tip I A0 (Şekil 4.3 grafiksel anlatım üzerinde A0 bölgesi ile gösterilmektedir) gen grubu ile Tip II A (Şekil 4.2 üzerinde 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 14 ve 15 numaralarıyla gösterilen bölgeler) içerisindeki mikrosatellit bulundurma sıklığı karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Örneğin anter kütüphanesinde bulunan ve salt anterde ifade eden kalemelerle hem anterde hem de diğer kütüphanelerde buluna 375 kalem Tip I A0 ile 135 kalem Tip IIA mikrosatellit içeriği karşılaştırılmıştır.

4.3.1.1. Anter dokusuna özgü ve anter dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter kütüphanesine özgü 223 169 baz sayısı ile 375 kalem değerlendirilirken anter kütüphanesine ile diğer kütüphanelerde ortak olan 129 201 baz sayısı ile 135 kalem değerlendirmeye alınmıştır. Anter kütüphanesine özgü kalemeler için ortalama kalem büyüklüğü 595 baz çifti olarak bulunurken diğer dokularla ortak kalemelerin ortalama büyüklüğü 957 baz çifti olarak saptanmıştır. Toplam 352370 baz sayısı ile 510 kalem incelenmiş 41 adet düzenli mikrosatellit tespit edilmiştir. Bu 41 düzenli mikrosatellitin önemli bir bölümü 35 adet mononükleotitten oluşurken geri kalan tekrarlar 3'er adet dinükleotit ve trinükleotitten meydana geldiği belirlenmiştir.

Anter spesifik DDB ve TD'de toplam 375 kalem içerisinde 13 (%3.47) mikrosatellit tespit edilirken diğer dokularla ortak 135 kaleminde 28 (%20.74) adet mikrosatellit saptanmıştır. Anter dokusuna özgü kalemelerde mikrosatellit bulundurma sıklığı gözlenen tekrar sayısı beklenen tekrar sayısına göre oldukça düşük $\chi^2=17.66$,

$P \leq 0.0001$) ve bu durum anter dokusuna özgü genlerin istatistiksel olarak düşük düzeyde düzenli mikrosatellit içerdiğini göstermiştir (Çizelge 4.4). Anter kütüphanesinde bulunan düzenli mikrosatellitlerden çoğunluğunun mononükleotit mikrosatellitlerden oluştuğu ve mononükleotit mikrosatellitlerin oldukça önemli ($\chi^2=18.21$, $P \leq 0.0001$) seviyede ve az frekansta (yoğunlukta) bulunduğu tespit edilmiştir.

Anter kütüphanesinin düzenli trinükleotit mikrosatellit frekansı istatistiksel olarak beklenenin altında ($\chi^2=5.18$, $P=0.0228$) bulunurken dinükleotit mikrosatellitlerin sıklığı istatistiksel olarak beklenen düzeyde kalmıştır. Diğer düzenli mikrosatellitlerin frekansları açısından istatistiksel anlamda herhangi bir sonuca ulaşamamıştır (Çizelge 4.4).

4.3.1.2. Genç kök dokusuna özgü ve genç kök dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök kütüphanesine ait toplam 1460 kalem için 896544 adet baz incelenmiş bunun 282 194 baz sayısı ile 710 kalemi sadece genç kök dokusuna özgü kalemlerden oluşurken 614 350 baz sayısı ile 750 kalem genç kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemlerinden oluşmuştur. Genç kök dokusuna özgü kalemlerin ortalama kalem büyüklüğü 398 baz sayısı olarak tespit edilirken diğer dokularla ortak kalemlerin ortalama büyüklüğü 819 baz sayısı olarak saptanmıştır.

Toplamda incelenen 1460 adet kalemden 328 adedinde düzenli tekrarlı DNA sekansı saptanmış ve bunun sayısal anlamda çoğunluğunu mononükleotitler (300 adet) oluşturmuş 17 adet dinükleotit, 7 adet trinükleotit, 2 adet hekzanükleotit, 1'er adet tetranükleotit ve pentanükleotit tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Genç kök dokusuna özgü kalemlerde ve genç kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit bulundurma sıklığı incelendiğinde ise gözlenen düzenli tekrarların beklenen düzenli tekrarlar düzeyinde olduğu ve istatistiksel anlamda önemli seviyede olmadığı gözlenmiştir.

Genç kök kütüphanesinde bulunan dinükleotitlerin ortak kütüphanelerde bulunan dinükleotit sayısından ($\chi^2=5.16$, $P= 0.0231$) seviyesinde önemli miktarda az olduğu belirlenmiştir. Düzenli mikrosatellitlerin çoğunluğunu mononükleotitler oluşturmalarına rağmen mikrosatellit motifleri yönünden istatistiksel anlamda önemlilik tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4). Bu sonuç kök spesifik genlerin içerdiği dinükleotit tekrarların erken gelişme döneminde düşük seviyede bulunduğunu diğerlerinin ise beklenen düzeyde olduğunu göstermiştir.

4.3.1.3. Tomurcuk dokusuna özgü ve tomurcuk dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna ait toplam 1 239 354 adet baz 1919 kalem için analiz edilmiştir. Bunun 559 390 baz sayısı ile 1124 kalem sadece tomurcuk dokusuna özgü kalemlerden oluşurken 679 964 baz sayısı ile 795 kalem tomurcuk dokusunun diğer dokularla ortak kalemlerinden oluşmuştur. Tomurcuk dokusuna özgü kalemlerin ortalama kalem büyüklüğü 498 baz sayısı olarak tespit edilirken diğer dokularla ortak kalemlerinin ortalama büyüklüğü 855 baz sayısı olarak saptanmıştır.

Toplamda incelenen 1919 adet kalemden 472 düzenli mikrosatellit sekansı saptanmış ve bunun sayısal anlamda çoğunluğu olan 449 mononükleotit, 8 trinükleotit, 7 dinükleotit, 6 hekzanükleotit, 2 tetranükleotitten oluştuğu ancak hiç pentanükleotit tespit edilmemiştir. Tomurcuk kütüphanesine spesifik kalemlerde bulunan mikrosatellit bulundurma sıklığı ile tomurcuk kütüphanesinde bulunmakla birlikte diğer dokularda bulunan ancak tomurcuk dokusundaki kalemlere yüksek homoloji gösteren kalemlere göre daha az düzeyde düzenli mikrosatellitler ($\chi^2=4.944$, $P=0.0262$) belirlenmiştir. Analizi sonuçlarına göre düzenli hekzanükleotit mikrosatellit sıklığı tomurcuk kütüphanesine spesifik kalemlerde istatistiksel olarak daha fazla ($\chi^2=4.936$, $P=0.0263$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde tomurcuk aşamasında bulunan spesifik genlerin hekzanükleotitlerden oluştuğu belirlenmiştir.

4.3.1.4. Genç meyve dokusuna özgü ve genç meyve dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve (0.5-2 cm uzunluktaki) kütüphanesine özgü 1081 kalem (509 974 baz) ve diğer dokularla yüksek homoloji gösteren 917 kalem (736 799 baz) ile tekrar içeren toplam 1998 kalem (1 246 773 baz) bulunmuştur. İncelenen kalemlerin ortalama büyüklüğü genç meyve kütüphanesine özgü tekrar içeren kalemlerde 472 baz sayısı diğer dokularla ortak tekrar içeren kalemlerde ise 803 baz sayısı olarak tespit edilmiştir. Tekrar içeren kalemler içerisinde genç meyve dokusuna özgü 152 adet diğer dokularla ortak 243 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiştir. Mikrosatellitlerin çoğunluğunu mononükleotitlerin oluşturduğu (355 adet) ancak ² testi ile istatistiksel anlamda genç meyve dokusunda beklenen ve gözlenen mikrosatellit sayılarınca önemli bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 4.4).

4.3.1.5. Kılcal kök dokusuna özgü ve kılcal kök dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusuna özgü 333 591 baz sayısına sahip 760 kalem ve kılcal kök dokusunun diğer dokularla ortak 596 692 baz sayısına sahip 713 kalem incelenmiş tekrar içeren toplam 930 283 baz sayısı ile 1473 kalem irdelenmiştir. Kılcal kök dokusuna özgü kalemlerin ortalama kalem büyüklüğü 439 baz sayısı diğer dokularla ortak kalemlerin ortalama büyüklüğü 837 baz sayısı olarak tespit edilmiştir. Tekrar içeren kalemler içerisinde kılcal kök dokusuna özgü %13.82'lik bir oranla 105 adet düzenli mikrosatellit bulunurken diğer dokularla ortak olan kalemlerde %29.87'lik bir oranla 213 adet mikrosatellit elde edilmiştir.

Kılcal kök dokusunda toplamda 318 adet düzenli mikrosatellit bulunurken 293 adedi mononükleotitlerden, 14 adedi dinükleotitlerden, 6 adedi ise trinükleotitlerden oluşmuştur. Kılcal kök dokusuna özgü kalemlerde ve kılcal kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit bulundurma sıklığı irdelendiği zaman gözlenen düzenli tekrarların beklenen düzenli tekrarlar düzeyinde olduğu ve istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

4.3.1.6. Plasenta dokusuna özgü ve plasenta dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Toplamda 1 614 401 adet baz sayısına sahip 2754 kalem değerlendirildiğinde sadece plasenta kütüphanesine özgü 790 475 baz sayısı ile 1727 kalem diğer dokularla ortak 823 926 baz sayısı ile 1027 kalem tespit edilmiştir. Plasenta dokusuna özgü kalemlerin ortalama baz sayısı 458 baz sayısı diğer dokularla ortak kalemlerin ortalama baz sayısı ise 802 olarak saptanmıştır.

Plasenta dokusuna özgü kalemlerdeki düzenli mikrosatellitin önemli bir bölümü olan 65 adeti mononükleotitten oluşurken geri kalan mikrosatellit motiflerden 13 dinükleotit, 5 trinükleotit, 4 tetranükleotit ve 2 hekzanükleotitten oluştuğu belirlenmiş ve pentanükleotit düzenli mikrosatellitlere ise hiç rastlanmamıştır.

Ki-kare istatistiksel analiz sonuçlarına göre mikrosatellit bulundurma sıklığı değerlendirilince sadece plasenta kütüphanesine özgü kalemlerdeki mikrosatellit sayısının ($\chi^2=53.43$, $P \leq 0.0001$) istatistiksel olarak son derece önemli düzeyde ve düşük miktarda mikrosatellit içerdiği tespit edilmiştir.

Mikrosatellit motif içeriklerine göre analiz yapıldığında mononükleotitlerin plasenta kütüphanesi içerisinde bulunan düzenli tekrarlı mikrosatellit çoğunluğunu oluşturduğu ve bu durumun istatistiksel ($\chi^2=59.75$, $P \leq 0.0001$) olarak oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir.

Diğer mikrosatellitlerin frekanslarında ise istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.

4.3.1.7. Yaprak dokusuna özgü ve yaprak dokusuyla diğer dokularda ortak düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Yaprak kütüphanesine özgü olan 1 229 959 adet baz sayısına sahip 2128 kalem ile hem yaprak kütüphanesi hem de diğer kütüphanelerle ortak 893 738 baz sayısına sahip 1019 kalem değerlendirilmiştir. Yaprak dokusuna özgü kalemlerin ortalama

kalem büyüklüğü 578 baz sayısı, diğer dokularla ortak kalemelerin ortalama büyüklüğü ise 877 olarak belirlenmiştir.

Yaprak dokusuna özgü tekrar içeren kalemler içerisinde 394 adet (%18.52) düzenli mikrosatellit bulunurken yaprak dokusunun diğer dokularla ortak 288 adet (%28.26) düzenli mikrosatellit saptanmıştır.

Yaprak dokusuna özgü kalemlerde 394 adet düzenli mikrosatellitlerin önemli bir bölümü mononükleotit tekrarlarından (335 adet) meydana gelmiş geri kalan tekrar sayıları 41 adet dinükleotit, 9 adet hekzanükleotit, 8 trinükleotit ve 1 adet tetranükleotit bulunmuştur. Yaprak dokusunda pentanükleotit içeren düzenli mikrosatellit bulunmamıştır.

Yaprak dokusunun diğer dokularla homoloji oluşturan 1019 adet kaleminde belirlenen 288 adet düzenli mikrosatellitin büyük çoğunluğunu mononükleotitler (256 adet) oluştururken 20 adet dinükleotit ve 12 adet trinükleotit saptanmış ve diğer mikrosatellit motifleri tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4). İstatistiksel analiz sonucunda düzenli mikrosatellit bulundurma sıklığı yaprak dokusuna özgü kalemlerde gözlenen tekrar sayısının beklenen tekrar sayısına oranla önemli düzeyde olmadığı saptanmıştır ($\chi^2=0.006$).

Yaprak kütüphanesine spesifik kalemlerde bulunan düzenli mikrosatellit motifleri incelendiği zaman düzenli tekrarların çoğunluğunun mononükleotitlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel açıdan tespit edilen mononükleotitlerin miktarı beklenen tekrar sayısına yakın olduğu için ki-kare testi sonucunda istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşın beklenen tekrar sayısına oranla daha yüksek miktarda bulunan hekzanükleotitler istatistiksel olarak önemli seviyede ($\chi^2=6.540$, $P=0.0105$) bulunmuştur.

Diğer motiflerden dinükleotitler, trinükleotitler ve pentanükleotitlerin varlığı ise istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Dokuya özgü ve dokular arası ortak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	25	10	22.2	3	1.9	0	1.9	0	0	0	0	0	0
D_Anter	129201	135	28	15	25	12.8	0	1.1	3	1.1	0	0	0	0	0	0
χ^2			17.66***		18.21***		1.74		5.18*							
Toplam	352370	510	41		35		3		3							
S_Genç Kök	282194	710	109	103.2	105	94.4	1	5.4	1	2.2	1	0.3	1	0.3	0	0.6
D_Genç Kök	614350	750	219	224.8	195	205.6	16	11.6	6	4.8	0	0.7	0	0.7	2	1.4
χ^2			0.469		1.728		5.16*		0.959		2.177		2.177		0.919	
Toplam	896544	1460	328		300		17		7		1		1		2	
S_Tomurcuk	559390	1124	189	213.0	183	202.7	1	3.2	4	3.6	1	0.9	0	0	0	2.7
D_Tomurcuk	679964	795	283	259.0	266	246.3	6	3.8	4	4.4	1	1.1	0	0	6	3.3
χ^2			4.944*		3.476		2.690		0.076		0.019				4.936*	
Toplam	1239354	1919	472		449		7		8		2				6	
S_Genç Meyve	509974	1081	152	161.6	135	145.2	8	7.8	5	5.3	1	0.4	0	0	3	2.9
D_Genç Meyve	736799	917	243	233.4	220	209.8	11	11.2	8	7.7	0	0.6	0	0	4	4.1
χ^2			0.959		1.214		0.0114		0.032		1.445					
Toplam	1246773	1998	395		355		19		13		1				7	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik, D: Diğer

Çizelge 4.4. Devamı

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli- Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	105	114.0	98	105.1	5	5.0	1	2.2	0	0.7	0	0	1	1.1
D_Kılcal Kök	596692	713	213	204.0	195	187.9	9	9.0	5	3.8	2	1.3	0	0	2	1.9
χ^2			0.721		0.481		0.112		1.054		2.612				0.557	
Toplam	930283	1473	318		293		14		6		2				3	
S_Plasenta	790475	1727	89	153.7	65	127.3	13	14.7	5	6.9	4	2.4	0	0	2	2.4
D_Plasenta	823926	1027	225	160.3	195	132.7	17	15.3	9	7.1	1	2.6	0	0	3	2.6
χ^2			53.43***		59.75***		0.381		0.984		1.927				0.161	
Toplam	1614401	2754	314		260		30		14		5				5	
S_Yaprak	1229959	2128	394	395.0	335	342.3	41	35.3	8	11.6	1	0.6	0	0	9	5.2
D_Yaprak	893738	1019	288	287.0	256	248.7	20	25.7	12	8.4	0	0.4	0	0	0	3.8
χ^2			0.006		0.368		2.163		2.634		1				6.540*	
Toplam	2123697	3147	682		591		60		20		1				9	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik, D: Diğer

4.3.2. Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz II)

Bir dokuya ait olan kalemle ile onun haricinde kalana diğeri 6 dokuya ait kalemlede bulunan mikrosatellit bulundurma sıklıklarının belirlenmesi için Analiz II uygulanmıştır. Bu analizde örneğin anter dokusuna ait tüm Tip I A0 ve Tip II A verileri (510 kalem) geri kalan tüm dokulara ait Tip I ve Tip II verilerinin toplamı (12751 kalem) bakımından irdelenmiştir.

4.3.2.1. Anter dokusu ve diğeri altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda toplam 352 370 baz sayısı ile 510 kalem değerlendirilirken geri kalan diğeri dokularda bulunan toplam 8 051 052 baz sayısı ile 12751 kalem irdelenmiştir. Anter dokusuna ait 510 kalem üzerinde 41 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit bulunurken karşılaştırılan diğeri dokularda 12751 kalem incelenmiş ve 2509 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir.

Anter dokusunun mikrosatellit bulundurma sıklığı diğeri dokuların mikrosatellit bulundurma sıklığı ile karşılaştırıldığı zaman yapılan ki-kare testi sonucu ($\chi^2=42.42$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli düzeyde ve az miktarda mikrosatellit içerdiği saptanmıştır (Çizelge 4.5). Mikrosatellit motifleri yönünden anter ve diğeri dokular karşılaştırıldığında beklenen mononükleotit sayısına göre oldukça düşük düzeyde mononükleotit ($\chi^2=40.21$, $P\leq 0.0001$) tespit edilmiş, diğeri düzenli mikrosatellit tiplerinin (motiflerinin) ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

4.3.2.2. Genç kök dokusu ve diğeri altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna ait toplam 896 544 baz sayısı içeren 1460 kalem için 328 (%22.47) adet düzenli tekrarlı mikrosatellit belirlenirken genç kök dokusu haricindeki diğeri dokularda toplam 7 506 878 adet baz sayısı ile 11801 adet kalem üzerinde 2222 (%18.82) adet düzenli tekrarlı mikrosatellit saptanmıştır. Genç kök dokusunda

bulunan düzenli tekrarlı mikrosatellitin çoğunluğunu mononükleotitler (300 adet) oluşturmuş 17 adet dinükleotit, 7 adet trinükleotit, 2 adet hekzanükleotit, 1'er adet tetranükleotit ve pentanükleotit tespit edilmiştir. Genç kök dokusu dışındaki dokularda ise 1983 adet mononükleotit, 134 adet dinükleotit, 64 adet trinükleotit, 30 adet hekzanükleotit ve 11 adet tetranükleotit belirlenmiştir.

Genç kök dokusuna ait kalemlerde genç kök dokusu dışındaki dokularda mevcut kalemlere göre mikrosatellit bulundurma sıklığı incelendiğinde ise yapılan ki-kare analizine göre önemli miktarda ve yüksek oranda düzenli tekrarlı mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır ($\chi^2=12.88$, $P \leq 0.0001$). Düzenli tekrar içeren mikrosatellitler de bulunan tekrar motifleri değerlendirildiğinde önemli miktarda yüksek sayıda mononükleotitlerin ($\chi^2=14.64$, $P \leq 0.0001$) varlığı görülmüştür. Diğer bir düzenli mikrosatellit motifi olan pentanükleotitin istatistiksel olarak ($\chi^2=8.373$, $P=0.0038$) yüksek sıklıkta olduğu ancak dinükleotit, trinükleotit, tetranükleotit ve hekzanükleotitlerin ise istatistiksel anlamda önemli düzeyde bulunmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

4.3.2.3. Tomurcuk dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

İncelenen 8 403 422 adet baz sayısı içerisinde tomurcuk dokusuna ait toplam 1 239 354 adet baz sayısı (1919 kalem) tomurcuk dokusu dışındaki dokulara ait ise 7164 068 adet baz sayısı (11342 kalem) analiz edilmiştir. Tomurcuk dokusunda bulunan 472 adet düzenli tekrarlı mikrosatellitin motiflere göre dağılımında 449 mononükleotit, 8 trinükleotit, 7 dinükleotit, 6 hekzanükleotit ve 2 tetranükleotitten oluştuğu bulunmuştur. Diğer dokularda ise toplam 2078 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit belirlenmiş olup bunun 1834 adedi gibi büyük bir bölümü mononükleotitlerden oluşmuştur. Geri kalan 244 adet tekrarın 144 dinükleotit, 63 trinükleotit, 26 hekzanükleotit, 10 tetranükleotit ve 1 pentanükleotitten oluştuğu belirlenmiştir.

Tomurcuk dokusuna ait kalemlerde mikrosatellit bulundurma sıklığı ki-kare analizine göre beklenenden önemli düzeyde yüksek miktarda ($\chi^2=28.69$, $P\leq 0.0001$) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5). Tomurcuk dokusunun nükleotit içerikleri incelendiğinde ise düzenli tekrarların çoğunluğunun istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek miktarda bulunan mononükleotitler ($\chi^2=43.93$, $P\leq 0.0001$) olduğu görülmüştür. Dinükleotit motif içeriği yönünden tomurcuk kalemlerinde beklenen sayısına oranla oldukça az miktarda ($\chi^2=12.28$, $P\leq 0.0001$) bulunurken diğer motiflerin bulunma sıklığı ise istatistiksel anlamda önemli seviyede olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

4.3.2.4. Genç meyve dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve kütüphanesine ait toplam 1998 kalem (1 246 773 baz) ve diğer kütüphanelere ait 11263 kalem (7 156 649 baz) içerisinde toplam 2550 düzenli tekrarlı mikrosatellitten 395 adedi (%19.77) sadece meyve dokusunda geri kalan 2155 (%19.13) adedinin ise diğer dokularda bulunduğu görülmüş istatistiksel olarak tüm tekrar sayılarının beklenen düzeyde olduğu önemli bir fark yaratmadığı bulunmuştur. Bu durum genç meyve döneminde mevcut tüm tekrarlı mikrosatellitleri içeren genlerin tüm dokularda ifade bulunduğunu göstermektedir. Düzenli mikrosatellit motif içerikleri yönünden de genç meyve ve diğer kütüphaneler arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmadığı yapılan ki-kare (χ^2) testi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

4.3.2.5. Kılcal kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusunda 930 283 baz sayısına sahip 1473 kalem ve kılcal kök dokusu haricindeki diğer dokulara ait 7 473 139 baz sayısına sahip 11788 kalem değerlendirilmiştir. Düzenli mikrosatellit içeren kalemler içerisinde kılcal kök dokusuna ait %21.59'luk bir oranla toplam 318 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit saptanmış, kılcal kök dokusu dışında kalan dokularda ise %18.93'lük bir oranla 2236

adet düzenli tekrarlı mikrosatellit belirlenmiştir. Kılcal kök kütüphanesinde toplamda 267 adet düzenli mikrosatellit beklenirken %21.59'luk oranla 318 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiş ve bu analiz sonucunda da beklenen mikrosatellit miktarına göre önemli düzeyde ve yüksel oranda mikrosatellit ($\chi^2=5.079$, $P\leq 0.001$) içerdiği tespit edilmiştir. Kılcal kök kütüphanesine ait kalemlerde kılcal kök haricindeki diğer dokuların kalemlere göre mikrosatellit frekansı değerlendirilince mononükleotit tekrarlarında gözlenen düzenli tekrarların (293) beklenen düzenli tekrarlardan (252 adet) daha fazla olduğu istatistiksel anlamda saptanmıştır ($\chi^2=7.214$, $P=0.0072$). Diğer düzenli mikrosatellit motiflerin sıklıkları ise istatistiksel anlamda önemli düzeyde bulunmamıştır (Çizelge 4.5).

4.3.2.6. Plasenta dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Plasenta kütüphanesine ait 1 614 401 adet baz sayısı ile 2754 kalem plasenta dokusu haricindeki dokularda 6 789 021 adet baz sayısı ile 10507 kalem değerlendirilmiştir. Plasenta dokusuna ait kalemler içerisinde %11.40'lık bir oranla toplam 314 adet düzenli mikrosatellit bulunurken diğer dokulara ait %21.28'lik bir oranla 2236 adet düzenli mikrosatellitler tespit edilmiştir. Plasenta dokusuna ait kalemlerde 314 düzenli mikrosatellitlerden büyük bir çoğunluğu mononükleotitlerden (260 adet) oluştuğu geri kalan motifler ise 30 adet dinükleotit, 14 trinükleotit, 5 adet tetranükleotit ve 5 adet hekzanükleotitten meydana gelmiş ve pentanükleotit içeren düzenli mikrosatellite ise hiç rastlanmamıştır.

Plasenta dokusu dışındaki dokularda bulunan 10507 adet kalemde belirlenen 2236 adet düzenli mikrosatellitten 2023 adet mononükleotit, 121 adet dinükleotit, 57 adet trinükleotit, 27 adet hekzanükleotit ve 7 adet tetranükleotit içeren kalem tespit edilmiş, bu grupta da pentanükleotit içeren kalem kaydedilmemiştir. Plasenta kütüphanesine ait kalemlerde diğer kütüphanelere göre düzenli mikrosatellit sayısının son derece düşük olduğu bulunmuştur ($\chi^2=78.166$, $P\leq 0.0001$). Bu sonuç plasenta da ifade olan genlerin diğer dokulara göre oldukça düşük miktarda mikrosatellit içerdiğini göstermiştir. Plasenta kütüphanesi ile diğer kütüphaneler arasındaki düzenli

mikrosatellit motifleri analiz edildiğinde plasenta mononükleotit motifinin beklenen sayının çok altında olduğu ($\chi^2=90.01$, $P=0.0001$) belirlenmiştir. Diğer düzenli mikrosatellit motiflerinden tetranükleotit motiflerin ise beklenenin üzerinde bulunduğu ve bu durumun istatistiksel olarak ($\chi^2=3.899$, $P=0.0008$) önemli olduğu gözlenmiştir. Ancak diğer mikrosatellit motiflerinin beklenen ve gözlenen frekans ve dağılımlarında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır.

4.3.2.7. Yaprak dokusu ve diğer altı dokuda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Yaprak kütüphanesine ait 2 123 697 adet baz sayısına sahip 3147 kalem ve bu kütüphane haricinde bulunan dokularda 6 279 725 baz sayısına sahip 10114 kalem değerlendirilmiştir. Yaprak dokusuna ait kalemler içerisinde 682 adet (%21.67) düzenli mikrosatellit bulunurken geri kalan 6 dokuda 1868 adet (%18.46) düzenli mikrosatellit bulunduğu gözlenmiştir.

Yaprak kütüphanesine özgü kalemlerde pentanükleotit içeren düzenli mikrosatellit olmadığı göze çarpmıştır. Yaprak dokusu haricinde bulunan 6 doku içerisinde ise incelenen 10114 adet kalemde 1868 adet düzenli mikrosatellit bulunduğu ve bunların 1692 mononükleotitlerden oluştururken 90 dinükleotit, 51 trinükleotit, 23 hekzanükleotit, 11 tetranükleotit ve 1 pentanükleotit içerdiği bulunmuştur (Çizelge 4.5). Ki-kare analizlerinde yaprak ve diğer dokulara ait kütüphaneler arasındaki düzenli mikrosatellit frekansları arasında herhangi bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=2.931$).

Yaprak kütüphanesi ve diğer 6 kütüphane arasındaki düzenli mikrosatellitlerin dağılımı incelendiğinde dinükleotit motifi dışındaki motiflerin dağılım sıklıklarında herhangi bir fark belirlenememiştir. Diğer kütüphanelerle kıyaslandığında yaprak kütüphanesi kalemlerinin daha fazla miktarda dinükleotit motifi içerdiği ve bunun istatistiksel olarak yüksek düzeyde önemli ($\chi^2=18.293$, $P=0.0001$) gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Dokular arası düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
T_Anter	352370	510	41	101.2	35	95.7	3	6.3	3	2.9	0	0.5	0	0.1	0	1.4
Diğer Dokular	8051052	12751	2509	2312.8	2248	2187	148	144.7	68	68.1	12	11.5	1	0.9	32	30.6
χ^2			42.42***		40.21***		1.830		0.0002		0.525		0.044		1.401	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	
T_Genç Kök	896544	1460	328	257.6	300	244	17	16.1	7	7.6	1	1.3	1	0.1	2	3.4
Diğer Dokular	7506878	11801	2222	2156.4	1983	2039	134	134.9	64	63.4	11	10.7	0	0.9	30	28.6
χ^2			12.88***		14.64***		0.055		0.049		0.069		8.373**		0.656	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	
T_Tomurcuk	1239354	1919	472	356.0	449	337	7	22.3	8	10.5	2	1.8	0	0.2	6	4.7
Diğer Dokular	7164068	11342	2078	2058.0	1834	1946	144	128.7	63	60.5	10	10.2	1	0.9	26	27.3
χ^2			28.69***		43.93***		12.281***		0.684		0.035		0.173		0.408	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	
T_Genç Meyve	1246773	1998	395	358.2	355	339	19	22.4	13	10.5	1	1.8	0	0.2	7	4.8
Diğer Dokular	7156649	11263	2155	2055.9	1928	1944	132	128.6	58	60.5	11	10.2	1	0.9	25	27.2
χ^2			0.862		0.919		0.607		0.678		0.402		0.174		1.255	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, T: Toplam

Çizelge 4.5. Devamı

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
T_ Kılcal Kök	930283	1473	318	267	293	252.7	14	16.7	6	7.9	2	1.3	0	0.1	3	3.5
Diğer Dokular	7473139	11788	2232	2147	1990	2030	137	134.3	65	63.1	10	10.7	1	0.9	29	28.5
χ^2			5.079*		7.214**		0.496		0.495		0.382		0.125		0.094	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	
T_Plasenta	1614401	2754	314	464	260	438.6	30	29.1	14	13.6	5	2.3	0	0.2	5	6.2
Diğer Dokular	6789021	10507	2236	1950	2023	1844.4	121	121.9	57	57.4	7	9.7	1	0.8	27	25.8
χ^2			78.166***		90.01***		0.419		0.012		3.899*		0.238		0.265	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	
T_Yaprak	2123697	3147	682	610	591	577	61	38.2	20	17.9	1	3.1	0	0.3	9	8.1
Diğer Dokular	6279725	10114	1868	1804	1692	1706	90	112.8	51	53.1	11	8.9	1	0.7	23	23.9
χ^2			2.931		0.457		18.293***		0.316		1.823		0.338		0.138	
Toplam	8403422	13261	2550		2283		151		71		12		1		32	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, T: Toplam

4.3.3. Düzenli mikrosatellit frekans analizleri (Analiz III)

Bu analiz yönteminde herhangi bir kütüphaneye ait kalemlerle diğer bir kütüphanenin kalemler analiz edilmiştir. Örneğin anter dokusuna özgü Tip I A0 gen grubuna ait 375 kalem ile genç kök dokusuna özgü Tip I G0'a ait 710 kalemler arasındaki düzenli mikrosatellitlerin frekansları analiz edilmiştir.

4.3.3.1. Anter dokusu ile genç kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem ile genç kök dokusuna özgü 710 kalem değerlendirilmiştir. Anter dokusuna özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli mikrosatellit bulunurken genç kök dokusunda 710 kalem üzerinde 109 adet düzenli mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır. Anter dokusunda beklenen düzenli mikrosatellit sayısına göre oldukça düşük miktarda genç kök dokusunda ise beklenen mikrosatellit sayısına göre oldukça yüksek miktarda mikrosatellit varlığı yapılan ki-kare testi sonucu ($\chi^2=55.538$, $P\leq 0.0001$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Her iki dokuda da mononükleotit tekrarlarının varlığı ya da yokluğu ile mikrosatellit yoğunluğunu en çok etkileyen mikrosatellit motifinin mononükleotitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Buna göre anter dokusunda beklenenden oldukça düşük düzeyde mononükleotit varlığı genç kök dokusunda da beklenenden yüksek miktarda mononükleotit varlığı $\chi^2=58.656$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel olarak son derece önemli bulunmuştur. Diğer motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılığın olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.6).

4.3.3.2. Anter dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit bulunurken tomurcuk dokusunda 1124 kalem üzerinde 189 adet düzenli mikrosatellit bulunmuştur. Anter dokusunda beklenen düzenli mikrosatellit sayısına göre oldukça düşük, tomurcuk dokusunda ise beklenen mikrosatellit sayısına göre oldukça yüksek

miktarda düzenli mikrosatellitlerin istatistiksel olarak ($\chi^2=48.319$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli düzeyde iki doku arasında farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.7).

Anter dokusunda beklenenden oldukça düşük düzeyde mononükleotit varlığı tomurcuk dokusunda da beklenenden yüksek miktarda mononükleotit varlığı istatistiksel olarak ($\chi^2=51.560$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli bulunmuştur. Her iki dokuda da mononükleotitler haricindeki motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.7).

4.3.3.3. Anter dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli mikrosatellit bulunmasına karşılık genç meyve dokusunda 1081 kalem üzerinde 152 adet düzenli mikrosatellit saptanmıştır. Anter dokusunda beklenen düzenli mikrosatellit sayısına göre oldukça düşük, genç meyve dokusunda ise oldukça yüksek miktarda düzenli mikrosatellit bulunması istatistiksel anlamda ($\chi^2=39.665$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli düzeyde mikrosatellit yoğunluğunun iki doku arasında farklı olduğunu kanıtlamıştır (Çizelge 4.8). Anter dokusunda beklenenden oldukça düşük düzeyde mononükleotit motifinin varlığı genç meyve dokusunda da beklenenden yüksek miktarda mononükleotit motifin varlığı istatistiksel olarak ($\chi^2=37.958$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli bir sonuç ortaya koymuştur. Mononükleotitler dışındaki motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.8).

4.3.3.4. Anter dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli mikrosatellit varken kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 105 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit belirlenmiştir. Anter dokusunda gözlenen düzenli mikrosatellit sayısı çok düşük, kılcal kök dokusunda ise yüksek miktarda düzenli mikrosatellit varlığı ($\chi^2=41.510$, $P\leq 0.0001$) mikrosatellit yoğunluğunun iki doku arasında farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.9). Anter dokusunda düşük düzeyde elde edilen mononükleotit motifi

kılcal kök dokusunda da yüksek miktarda gözlenmiş her iki doku içinde mononükleotitlerin istatistiksel olarak ($\chi^2=42.726$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Diğer düzenli mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.9).

4.3.3.5. Anter dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli mikrosatellit, plasenta dokusuna özgü 1727 kalem üzerinde 89 adet düzenli mikrosatellit saptanmıştır. Anter dokusunda gözlenen düzenli mikrosatellit sayısı düşük, plasenta dokusunda ise daha yüksek miktarda düzenli mikrosatellit istatistiksel anlamda bulunmuştur ($\chi^2=5.107$, $P=0.0238$) önemli düzeyde mikrosatellit yoğunluğunun iki doku arasında farklı olduğunu ispatlamıştır. Diğer mikrosatellit motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

4.3.3.6. Anter dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem üzerinde 13 adet düzenli mikrosatellit belirlenirken yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 394 adet düzenli mikrosatellit bulunmuştur. Anter dokusunda beklenen tekrar sayısına göre çok düşük, yaprak dokusunda ise yüksek miktarda düzenli mikrosatellitin olması iki doku arasında istatistiksel anlamda ($\chi^2=46.325$, $P\leq 0.0001$) son derece önemli düzeyde mikrosatellit yoğunluğunun farklı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Anter dokusunda düşük düzeyde elde edilen mononükleotit motifi yaprak dokusunda beklenen sayısından oldukça yüksek miktarda elde edilmiş her iki doku içinde mononükleotitlerin istatistiksel olarak son derece önemli olduğunu göstermiştir ($\chi^2=41.199$, $P\leq 0.0001$) olduğunu göstermiştir. Diğer mikrosatellit motiflerden mononükleotit motifi haricindekiler ise istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.6. Anter ve genç kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	53.8	10	50.8	3	1.8	0	0.4	0	0	0	0	0	0
S_Genç Kök	282194	710	109	68.1	105	64.2	1	2.2	1	0.5	1	0.5	1	0.5	0	0
χ^2			55.538***		58.656***		1.543		0.791		0.791		0.791			
Toplam	505363	1085	122		115		4		1		1		1		0	

Çizelge 4.7. Anter ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	57.6	10	55.0	3	1.1	0	1.1	0	0.3	0	0	0	0
S_Tomurcuk	559390	1124	189	144.4	183	138.0	1	2.9	4	2.9	1	0.7	0	0	0	0
χ^2			48.319***		51.560***		4.239*		1.596		0.399					
Toplam	782559	1499	202		193		4		4		1		0		0	

Çizelge 4.8. Anter ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	50.2	10	44.1	3	3.3	0	1.5	0	0.3	0	0	0	0.9
S_Genç Meyve	509974	1081	152	114.8	135	100.9	8	7.7	5	3.5	1	0.7	0	0	3	2.1
χ^2			39.665***		37.958***		0.052		2.118		0.438				1.313	
Toplam	733143	1456	165		145		11		5		1		0		3	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.9. Anter ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	47.3	10	43.3	3	3.2	0	0.4	0	0	0	0	0	0.4
S_Kılcal Kök	333591	760	105	70.7	98	64.7	5	4.8	1	0.6	0	0	0	0	1	0.6
χ^2			41.510***		42.726***		0.022		0.669						0.669	
Toplam	556760	1135	118		108		8		1		0		0		1	

Çizelge 4.10. Anter ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	22.5	10	16.5	3	3.5	0	1.1	0	0.8	0	0	0	0.4
S_Plasenta	790475	1727	89	79.5	65	58.5	13	12.5	5	3.9	4	3.2	0	0	2	1.6
χ^2			5.107*		3.293		0.099		1.412		1.129				0.565	
Toplam	1013644	2102	102		75		16		5		4		0		2	

Çizelge 4.11. Anter ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	13	62.5	10	53.0	3	6.8	0	1.2	0	0.2	0	0	0	1.4
S_Yaprak	1229959	2128	394	344.5	335	292.0	41	37.2	8	6.8	1	0.8	0	0	9	7.6
χ^2			46.325***		41.199***		2.468		1.452		0.181				1.633	
Toplam	1453128	2503	407		345		44		8		1		0		9	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.12. Genç kök ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	109	99.9	105	96.6	1	0.7	1	1.7	1	0.7	1	0.3	0	0
S_Tomurcuk	559390	1124	189	198.1	183	191.4	1	1.3	4	3.3	1	1.3	0	0.7	0	0
χ^2			1.240		1.107		0.243		0.411		0.243		1.982			
Toplam	841584	1834	298		288		2		5		2		1		0	

Çizelge 4.13. Genç kök ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	109	93.0	105	85.5	1	3.2	1	2.1	1	0.7	1	0.4	0	1.1
S_Geç Meyve	509974	1081	152	168.0	135	154.5	8	5.8	5	3.9	1	1.3	0	0.6	3	1.9
χ^2			4.290*		6.912*		2.358		0.940		0.181		1.807		1.660	
Toplam	792168	1791	261		240		9		6		2		1		3	

Çizelge 4.14. Genç kök ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	109	98.1	105	93.0	1	2.7	1	0.9	1	0.5	1	0.5	0	0.5
S_Kılcal Kök	333591	760	105	115.9	98	110.0	5	3.3	1	1.1	0	0.5	0	0.5	1	0.5
χ^2			2.249		2.844		2.055		0.014		1.182		1.182		0.846	
Toplam	615785	1470	214		203		6		2		1		1		1	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

4.3.3.7. Genç kök dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 109 adet düzenli mikrosatellit ve tomurcuk dokusunda 1124 kalem üzerinde 189 adet düzenli mikrosatellit tespit edilmiştir. Genç kök ve tomurcuk dokularında beklenen tekrar sayısına yakın sayıda düzenli mikrosatellitin olması her iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık bulunmadığını göstermiştir (Çizelge 4.12). Mikrosatellit motif tiplerinden her iki dokuda da hekzanükleotit motifinin bulunmaması dikkati çekmiş ancak altı farklı düzenli mikrosatellit motiflerinden hiçbirinin istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermediği saptanmıştır (Çizelge 4.12).

4.3.3.8. Genç kök dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 109 adet düzenli tekrarlı mikrosatellit ve genç meyve dokusunda 1081 kalem üzerinde ise 152 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiştir. Genç kök dokusunda beklenen düzenli mikrosatellit sayısının yüksek, genç meyve dokusunda ise düşük düzenli mikrosatellit varlığı bu dokular arasındaki düzenli mikrosatellitlerin istatistiksel anlamda farklı (Z=2.4290, P=0.0383) önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.13).

Genç kök dokusuna özgü kalemlerde düzenli mikrosatellitlerden mononükleotit motiflerin beklenen mononükleotit sayısından yüksek olduğu ve bu durumun istatistiksel olarak önemli olduğu (Z=6.912, P=0.0086) görülmüştür. Diğer motiflerde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.13).

4.3.3.9. Genç kök dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 109 adet düzenli mikrosatellit saptanırken kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 105 adet düzenli mikrosatellit

bulunduğu görülmüştür. Genç kök ve kılcal kök dokularında beklenen tekrar sayısı oranlarında düzenli mikrosatellit bulunması iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık olmadığını ispatlamıştır. Her iki dokuda da hiçbir motif tipinin istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.14).

4.3.3.10. Genç kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 109 adet, plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 89 adet düzenli mikrosatellit bulunmuştur. Genç kök dokusunda beklenen düzenli mikrosatellit sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda ise oldukça düşük miktarda bulunması dokular arasında mikrosatellit yoğunluğunun istatistiksel anlamda ($\chi^2=84.376, \leq 0.0001$) önemli düzey de değişim gösterdiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.15).

Her iki dokuda mononükleotit motif sayısı beklenen sayısından oldukça farklı ve istatistiksel olarak ($\chi^2=110.240, \leq 0.0001$) önemli olduğu görülmüştür. Genç kök dokusunda oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.15).

4.3.3.11. Genç kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 109 adet, yaprak dokusuna özgü 2128 kalem üzerinde 394 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiştir. Her iki dokuda mikrosatellit yoğunluğu birbirlerine göre önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Düzenli mikrosatellit motiflerinin analiz edildiğinde her iki kütüphane arasında mononükleotit, dinükleotit ve pentanükleotit motiflerin farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Mononükleotit motifin genç kök dokusunda beklenenden daha fazla ($\chi^2=7.844, P=0.0051$) ve pentanükleotit motifinin istatistiksel olarak daha fazla ($\chi^2=4.359, P=0.0368$) bulunduğu ancak dinükleotit motifinin ise beklenenden daha az ($\chi^2=7.334,$

P=0.0068) bulunduğunu belirlenmiştir. Özellikle gen ekspresyonunda etkili rol alan dinükleotitlerin varlığının yaprak ve genç kök dokularında etkin olması göze çarpmıştır (Ince vd 2010d). Diğer motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.16).

4.3.3.12. Tomurcuk dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 189 adet, genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde ise 152 adet düzenli mikrosatellit olduğu bulunmuştur. Her iki dokuda mevcut mikrosatellit frekansının beklenen düzeyde olduğu istatistiksel analizlerle ortaya çıkmıştır. Düzenli mikrosatellit motiflerinin frekansları incelendiğinde dinükleotit motiflerin tomurcukta daha az bir düzeyde olduğu (P=0.0133) olduğu ancak diğer düzenli mikrosatellit motiflerin frekansları açısından her iki kütüphane arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

4.3.3.13. Tomurcuk dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 189 adet, kılcal kök dokusuna özgü 760 kalem üzerinde 105 adet düzenli mikrosatellit olduğu saptanmıştır. İki dokuda mevcut mikrosatellit oranı beklenen düzeyde olduğu için iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmamıştır. Düzenli mikrosatellit motif frekansları incelendiğinde ise iki doku içinde dinükleotit motifin tomurcuk dokusunda daha az düzeyde bulunduğu ve istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Diğer motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.18).

4.3.3.14. Tomurcuk dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 189 adet, plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 89 adet düzenli mikrosatellit bulunmuştur. Tomurcuk dokusunda beklenen tekrar sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda oldukça düşük miktarda düzenli mikrosatellitin mevcut olması dokular arasında mikrosatellit yoğunluğunun istatistiksel anlamda ($\chi^2=80.722$, $P\leq 0.0001$) önemli düzeyde değişim gösterdiği sonucuna ulaştırmıştır (Çizelge 4.19).

Her iki dokudan da mononükleotit motifi beklenen sayısından oldukça farklı düzeyde sonuç alınmış, tomurcuk kütüphanesinde mononükleotit motifinin oldukça fazla olduğu ve bunun istatistiksel olarak önemli ($\chi^2=106.950$, $P\leq 0.0001$) olduğu görülmüştür. Ayrıca dinükleotit motif sayısının etkin bir şekilde tomurcuk dokusunda düşük plasenta dokusunda ise yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak önemli ($\chi^2=6.786$, $P=0.0092$) olduğunu ortaya koymuştur. Geri kalan motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.19).

4.3.3.15. Tomurcuk dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 189 adet, yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 394 adet düzenli mikrosatellit tespit edilerek iki dokuda mevcut mikrosatellit oranı beklenen düzeyde olduğu gözlenmiş ve iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 4.20). Ancak iki dokuda bulunan mononükleotit ve dinükleotit motif sayılarında farklılık tespit edilmiştir. Mononükleotit motif sayısı tomurcukta daha fazla ($\chi^2=31.083$, $P=0.0459$) dinükleotit motif sayısının daha az olduğu ($\chi^2=16.303$, $P\leq 0.0001$) ortaya çıkmıştır. Ayrıca heksanükleotit motif sayısının tomurcuk dokusunda yok olması yaprak dokusunda ise beklenenden yüksek ve bunun istatistiksel olarak önemli ($\chi^2=4.093$, $P=0.0431$) olduğu bulunmuştur. Diğer motif tiplerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.20).

4.3.3.16. Genç meyve dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 152 adet, kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 105 adet düzenli mikrosatellit gözlenmiştir. Genç meyve ve kılcal kök dokularında gözlenen düzenli mikrosatellit sayısı beklenen oranlarda bulunduğu için istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık olmadığını görülmüştür. Ayrıca motif tiplerinin de istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.21).

4.3.3.17. Genç meyve dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 152 adet, plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 89 adet düzenli mikrosatellit bulunmuştur. Genç meyve dokusunda oldukça yüksek, plasenta dokusunda ise oldukça düşük miktarda mikrosatellitin belirlenmiş ve bunun istatistiksel anlamda önemli (P=0.0001) görülmüştür. Dokularda düzenli mikrosatellit motiflerin dağılımları araştırıldığında mononükleotit motifinin oldukça fazla bulunduğu görülmüş ve bunun istatistiksel olarak önemli (P=0.0001) olduğu saptanmıştır. Geri kalan mikrosatellit motif frekanslarının her iki doku arasında istatistiksel olarak bir farklılık göstermemiştir (Çizelge 4.22).

4.3.3.18. Genç meyve dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 152 adet, yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 394 adet düzenli SSR bulunmuş, iki dokuda var olan mikrosatellit frekansları arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunamamıştır. Ancak düzenli mikrosatellit motifleri incelendiğinde dinükleotit motifinin genç meyve dokusunda düşük yaprak dokusunda ise yüksek olduğu ve bunun istatistiksel düzeyde önemli ($\chi^2=3.987$, $P=0.0459$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.15. Genç kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	109	52.1	105	44.7	1	3.7	1	1.6	1	1.3	1	0.3	0	0.5
S_Plasenta	790475	1727	89	145.9	65	125.3	13	10.3	5	4.4	4	3.7	0	0.7	2	1.5
χ^2			84.376***		110.240***		2.652		0.288		0.103		2.801		0.714	
Toplam	1072669	2437	198		170		14		6		5		1		2	

Çizelge 4.16. Genç kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	109	93.9	105	82.1	1	7.8	1	1.7	1	0.4	1	0.2	0	1.7
S_Yaprak	1229959	2128	394	409.1	335	357.9	41	34.2	8	7.3	1	1.6	0	0.8	9	7.3
χ^2			2.999		7.844*		7.334		0.338		1.294		4.359*		2.065	
Toplam	1512153	2838	503		440		42		9		2		1		9	

Çizelge 4.17. Tomurcuk ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	189	178.4	183	166.4	1	4.7	4	4.7	1	1.0	0	0	0	1.6
S_Geç Meyve	509974	1081	152	162.6	135	151.7	8	4.3	5	4.3	1	1.0	0	0	3	1.4
χ^2			1.326		3.496		6.124*		0.223		0.004				3.291	
Toplam	1069364	2205	341		318		9		9		2		0		3	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.18. Tomurcuk ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	189	184.2	183	176.0	1	3.8	4	3.1	1	0.6	0	0	0	0.6
S_Kılcal Kök	333591	760	105	109.8	98	105.0	5	2.2	1	1.9	0	0.4	0	0	1	0.4
χ^2			0.339		0.736		5.420*		0.644		0.596				1.677	
Toplam	892981	1884	294		281		6		5		1		0		1	

Çizelge 4.19. Tomurcuk ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	189	115.2	183	102.8	1	5.8	4	3.7	1	2.1	0	0	0	0.8
S_Plasenta	790475	1727	89	162.8	65	145.2	13	8.2	5	5.3	4	2.9	0	0	2	1.2
χ^2			80.722***		106.950***		6.786*		0.033		0.947				1.415	
Toplam	1349865	2851	278		248		14		9		5		0		2	

Çizelge 4.20. Tomurcuk ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	189	182.3	183	161.9	1	13.1	4	3.8	1	0.6	0	0	0	2.8
S_Yaprak	1229959	2128	394	400.7	335	356.1	41	28.9	8	8.2	1	0.4	0	0	9	6.2
χ^2			0.362		3.985*		16.303*		0.024		0.327				4.093*	
Toplam	1789349	3252	583		518		42		12		2		0		9	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: spesifik

Çizelge 4.21. Genç meyve ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	152	155.4	135	140.9	8	7.9	5	3.6	1	0.6	0	0	3	2.4
S_Kılcal Kök	333591	760	105	101.6	98	92.1	5	5.1	1	2.4	0	0.4	0	0	1	1.6
χ^2			0.184		0.616		0.006		1.314		0.654				0.354	
Toplam	843565	1841	257		233		13		6		1		0		4	

Çizelge 4.22. Genç meyve ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	152	94.5	135	78.4	8	8.2	5	3.9	1	2.0	0	0	3	2.0
S_Plasenta	790475	1727	89	146.5	65	121.6	13	12.8	5	6.1	4	3.0	0	0	2	3.0
χ^2			57.536***		67.125***		0.011		0.488		0.775				0.906	
Toplam	1300449	2808	241		200		21		10		5		0		5	

Çizelge 4.23. Genç meyve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	152	160.0	135	137.8	8	14.4	5	3.8	1	0.6	0	0	3	3.5
S_Yaprak	1229959	2128	394	386.0	335	332.2	41	34.6	8	9.2	1	1.4	0	0	9	8.5
χ^2			0.570		0.078		3.987*		0.525		0.413				0.108	
Toplam	1739933	3209	546		470		49		13		2		0		12	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

4.3.3.19. Kılcal kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusuna özgü 760 kalem üzerinde 105 adet düzenli mikrosatellit, plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 89 adet düzenli mikrosatellit saptanmıştır. Kılcal kök dokusunda beklenen tekrar sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda oldukça düşük miktarda mikrosatellitin var olması dokular arasında düzenli mikrosatellit bulundurma sıklığının istatistiksel anlamda önemli ($\chi^2=55.554$, $P\leq 0.0001$) düzeyde değişim gösterdiği sonucunu göstermiştir (Çizelge 4.24). Mononükleotit motifi beklenen sayıdan oldukça fazla sonuç vermesi çalışılan her iki doku arasında mononükleotit motiflerin istatistiksel olarak önemli ($\chi^2=72.396$, $P\leq 0.0001$) olduğu belirlenmiştir. Diğer motif tiplerinin frekansları ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.24).

4.3.3.20. Kılcal kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 105 adet, yaprak dokusuna özgü 2128 kalem üzerinde 394 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiştir. Her iki kütüphane arasında düzenli mikrosatellit frekansları ve motif tipleri istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.25).

4.3.3.21. Plasenta dokusu ile yaprak dokusunda bulunan düzenli mikrosatellitlerin analizleri

Plasenta dokusuna özgü 1727 kalem üzerinde 89 adet, yaprak dokusunda ise 2128 kalemde 394 adet düzenli mikrosatellit belirlenmiştir. Plasenta dokusunda oldukça düşük, yaprak dokusunda oldukça yüksek miktarda düzenli mikrosatellit frekansının varlığı görülmüş ve bunun istatistiksel anlamda önemli ($\chi^2=11.875$, $P=0.0001$) belirlenmiştir. Düzenli mikrosatellit motiflerinden mononükleotitler ($\chi^2=11.873$, $P\leq 0.0001$) ve dinükleotitler ($\chi^2=5.135$, $P=0.0234$), plasenta dokusunda daha az olduğu diğer motif tipleri arasında her iki doku arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.24. Kılcal kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	105	57.6	98	48.4	5	5.3	1	1.8	0	1.2	0	0	1	0.9
S_Plasenta	790475	1727	89	136.4	65	114.6	13	12.7	5	4.2	4	2.8	0	0	2	2.1
χ^2			55.554***		72.396***		0.031		0.487		1.688				0.019	
Toplam	1124066	2487	194		163		18		6		4		0		3	

Çizelge 4.25. Kılcal kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	105	106.5	98	92.4	5	9.8	1	1.9	0	0.2	0	0	1	2.1
S_Yaprak	1229959	2128	394	392.5	335	340.6	41	36.2	8	7.1	1	0.8	0	0	9	7.9
χ^2			0.025		0.434		3.002		0.561		0.271				0.766	
Toplam	1566550	2888	499		433		46		9		1		0		10	

Çizelge 4.26. Plasenta ve yaprak dokularının karşılaştırılarak düzenli mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Düzenli-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Plasenta	790475	1727	89	189.0	65	156.5	13	21.1	5	5.1	4	2.0	0	0	2	4.3
S_Yaprak	1229959	2128	394	294.0	335	243.5	41	32.9	8	7.9	1	3.0	0	0	9	6.7
χ^2			86.875***		87.873***		5.135		0.002		3.508				2.026	
Toplam	2020234	3855	483		400		54		13		5		0		11	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen düzenli mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

4.4. MVB Değişken Mikrosatellit Analizleri

4.4.1. Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz I)

4.4.1.1. Anter dokusuna özgü ve anter dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna özgü 375 kalem değerlendirilirken anter dokusunun diğer dokularla ortak olan 135 kalem değerlendirmeye alınmış ve toplam 510 kalem içerisinde 54 adet değişken mikrosatellit saptanmıştır. Toplam 54 değişken mikrosatellitin önemli bir çoğunluğu mononükleotitlerden (44 adet) oluşurken geri kalan 6 adedi trinükleotitten, 3 adedi dinükleotitten ve 1 adedi ise hekzanükleotitten oluşmuştur. Değişken mikrosatellitlerin anter dokusunda daha az olduğu ve bunun istatistiksel olarak oldukça önemli ($\chi^2=20.93$, $P \leq 0.0001$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Değişken mikrosatellit motiflerden sadece mononükleotitlerin istatistiksel olarak az frekansta ($\chi^2=21.63$, $P \leq 0.0001$) bulunduğu diğer motif tiplerinin frekanslarında ise anter kütüphanesine dahil edilen kalemler içerisinde istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.27).

4.4.1.2. Genç kök dokusuna özgü ve genç kök dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü incelenen 710 kalem ile genç kök dokusunun diğer 6 doku ile ortak olan 750 kalem içerisinde toplamda 1460 adet kalemde 384 adet değişken mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır. Bunun rakamsal olarak çoğunluğunu mononükleotit motiflerden (345 adet) oluştuğu 17 adet dinükleotit, 16 adet trinükleotit, 3 adet hekzanükleotit, 2 pentanükleotit ve 1 adet tetranükleotit motifleri bulunmuştur (Çizelge 4.27). Genç kök dokusuna özgü kalemler ve genç kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit frekansı incelendiğinde ise gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik göstermediği gözlenmiştir.

Değişken mikrosatellit motif frekansları yönünden genç kök dokusuna özgü kalemler içerisinde beklenen dinükleotit sayısına göre gözlenen az sayıda dinükleotit sayısı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre dinükleotitlerin varlığı istatistiksel olarak ($\chi^2=5.13$, $P=0.0231$) önemli bulunmuştur. Dinükleotit dışındaki motif frekans farklılıkları istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.27).

4.4.1.3. Tomurcuk dokusuna özgü ve tomurcuk dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü analiz edilen 1124 kalemde 259 adet, tomurcuk dokusunun diğer 6 doku ile ortak 795 kalemde ise 339 adet değişken mikrosatellit belirlenmiştir. Toplamda mevcut olan 576 adet değişken mikrosatellitin rakamsal olarak büyük çoğunluğunu 526 adet mononükleotit oluştururken 27 adet trinükleotit, 13 adet hekzanükleotit, 7 adet dinükleotit, 2 adet tetranükleotit, 1 adette pentanükleotit motifleri tespit edilmiştir. Tomurcuk dokusuna özgü kalemler ve tomurcuk dokusunun diğer dokular ile ortak kalemleri içerisinde değişken mikrosatellit frekansı incelendiğinde ise gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik göstermediği saptanmıştır. Değişken mikrosatellitler içerisinde dinükleotit, trinükleotit, tetranükleotit, pentanükleotit ve hekzanükleotit motiflerinin frekanslarının istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

4.4.1.4. Genç meyve dokusuna özgü ve genç meyve dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü çalışılan 1081 kalem ile genç meyve dokusunun diğer 6 doku ile ortak olan 917 kalem içerisinde toplam 477 adet değişken mikrosatellit olduğu belirlenmiştir. Mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotit 398 adet, 41 adet trinükleotit, 22 adet dinükleotit, 14 adet hekzanükleotit, 2 adet tetranükleotit motifi saptanırken hiç pentanükleotit mikrosatellit motifi gözlenmemiştir (Çizelge 4.27).

Genç meyve dokusuna özgü kalemler ve genç meyve dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit frekansı incelendiğinde ise gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik göstermediği bulunmuştur.

Değişken mikrosatellit motif frekansları yönünden genç meyve dokusuna özgü kalemler içerisinde beklenen mononükleotit sayısına göre gözlenen fazla sayıda mononükleotit sayısı olduğu belirlenmiştir. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre mononükleotitlerin varlığı istatistiksel olarak $\chi^2=4.938$, $P=0.0263$) önemli olduğu saptanmıştır. Mononükleotit dışındaki motif frekans farklılıkları istatistiksel anlamda önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.27).

4.4.1.5. Kılcal kök dokusuna özgü ve kılcal kök dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusuna özgü incelenen 760 kalem ve kılcal kök dokusunun diğer 6 doku ile 713 kalem içerisinde toplamda 384 adet değişken mikrosatellit bulunurken 339 adet mononükleotit, 20 adet trinükleotit, 14 adet dinükleotit, 8 adet hekzanükleotit, 2 adet tetranükleotit ve 1 adet pentanükleotitten oluştuğu saptanmıştır (Çizelge 4.27).

Kılcal kök dokusuna özgü kalemler ve kılcal kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit frekansına bakıldığında gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik göstermediği görülmüştür.

Değişken mikrosatellit motif frekansları yönünden kılcal kök dokusuna özgü kalemler içerisinde beklenen pentanükleotit sayısına göre gözlenen az sayıda dinükleotit sayısı olduğu belirlenmiştir. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre pentanükleotitlerin varlığı istatistiksel olarak $\chi^2=4.148$, $P=0.0417$) önemli bulunmuştur. Pentanükleotit dışındaki motiflerin frekans farklılıkları istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.27).

4.4.1.6. Plasenta dokusuna özgü ve plasenta dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Plasenta dokusuna özgü incelenen 1727 kalem ile plasenta dokusunun diğer 6 doku ile ortak olan 1027 kalem incelendiğinde toplam 406 adet değişken mikrosatellit bulunduğu tespit edilmiştir. Rakamsal anlamda çoğunluğunu mononükleotit motiflerden (306 adet) oluştuğu 40 adet trinükleotit, 33 adet dinükleotit, 18 adet hekzanükleotit, 5 adet tetranükleotit ve 4 pentanükleotit motiflerinin bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.27).

Plasenta dokusuna özgü kalemler ve plasenta dokusunun diğer dokularla ortak kalemleri içerisinde mikrosatellit frekansı incelendiğinde ise beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre daha az sayıda gözlenen değişken mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir. Uygulanan ki-kare analizine göre $\chi^2=55.138$, $P<0.0001$) değişken mikrosatellit frekansının istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.27).

Değişken mikrosatellit motif frekansları yönünden incelendiğinde plasenta dokusuna özgü kalemler içerisinde beklenen mononükleotit sayısına göre az sayıda gözlenen mononükleotit sayısı olduğu görülmüştür. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre mononükleotitlerin varlığı istatistiksel olarak ($\chi^2=69.365$, $P<0.0001$) önemli bulunmuştur. İstatistiksel anlamda mononükleotit dışındaki motif frekans farklılıkları önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

4.4.1.7. Yaprak dokusuna özgü ve yaprak dokusuyla ortak değişken mikrosatellitlerin analizleri

Yaprak dokusuna özgü 2128 kalem ve yaprak dokusuyla diğer dokularda ortak 1019 kalem incelenmiştir. Yaprak dokusuna özgü tekrar içeren kalemler içerisinde 452 adet (%21.24) değişken mikrosatellit gözlenirken diğer dokulardan 354 adet (%34.74) değişken mikrosatellit saptanmıştır. Değişken mikrosatellit frekansı ($\chi^2=1.115$) ve motifleri yönünden yapılan analizlerde istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. Dokuya özgü ve dokular arası ortak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Değişken- Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	34.2	13	27.9	3	1.9	2	3.8	0	0	0	0	0	0.6
D_Anter	129201	135	36	19.8	31	16.1	0	1.1	4	2.2	0	0	0	0	1	0.4
χ^2			20.93***		21.63***		1.737		2.325						1.727	
Toplam	352370	510	54		44		3		6						1	
S_Genç Kök	282194	710	122	120.9	116	108.6	1	5.4	2	5.1	1	0.3	1	0.63	1	0.9
D_Genç Kök	614350	750	262	263.1	229	236.4	16	11.6	14	10.9	0	0.7	1	1.37	2	2.1
χ^2			0.016		0.738		5.163*		2.671		2.177		0.318		0.005	
Toplam	896544	1460	384		345		17		16		1		2		3	
S_Tomurcuk	559390	1124	237	259.9	216	237.4	1	3.2	15	12.2	1	0.9	0	0.4	4	5.9
D_Tomurcuk	679964	795	339	316.1	310	288.6	6	3.8	12	14.8	1	1.1	1	0.6	9	7.1
χ^2			3.703		3.520		2.690		1.183		0.019		0.823		1.083	
Toplam	1239354	1919	576		526		7		27		2		1		13	
S_Genç Meyve	509974	1081	179	195.1	141	162.8	10	9.0	21	16.8	2	0.8	0	0	5	5.7
D_Genç Meyve	736799	917	298	281.9	257	235.2	12	13.0	20	24.2	0	1.2	0	0	9	8.3
χ^2			2.251		4.938*		0.189		1.805		2.890				0.160	
Toplam	1246773	1998	477		398		22		41		2				14	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik, D: Diğer

Çizelge 4.27. Devamı

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Değişken- Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	125	137.7	105	121.6	5	5.1	10	7.2	0	0.7	0	0.4	5	2.9
D_Kılcal Kök	596692	713	259	246.3	234	217.4	9	8.9	10	12.8	2	1.3	1	0.6	3	5.1
χ^2			1.176		2.262		0.112		1.163		2.612		4.148*		1.650	
Toplam	930283	1473	384		339		14		20		2		1		8	
S_Plasenta	790475	1727	124	198.79	77	149.8	15	16.2	17	19.6	4	2.5	3	1.9	8	8.8
D_Plasenta	823926	1027	282	207.21	229	156.2	18	16.8	23	20.4	1	2.5	1	2.1	10	9.2
χ^2			55.138***		69.365***		0.163		0.669		1.927		1.085		0.147	
Toplam	1614401	2754	406		306		33		40		5		4		18	
S_Yaprak	1229959	2128	452	466.80	371	390.4	45	37.7	19	24.9	1	0.6	2	1.7	14	11.6
D_Yaprak	893738	1019	354	339.20	303	283.6	20	27.3	24	18.1	0	0.4	1	1.3	6	8.4
χ^2			1.115		2.280		3.414		3.326		0.727		0.094		1.198	
Toplam	2123697	3147	806		674		65		43		1		3		20	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik, D: Diğer

4.4.2. Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz II)

Bir dokuya ait olan kalemler ile diğer 6 dokuya ait kalemlerde bulunan değişken mikrosatellit frekansının belirlenmesi için Analiz II uygulanmıştır. Bu analizde örneğin anter dokusuna ait 510 kalem geri kalan tüm dokulara ait 12751 kalem için değişken mikrosatellit frekansı belirlenmiştir. Anter, genç kök, tomurcuk, meyve, kılcal kök, plasenta ve yaprak dokularından ait kalemlerde bulunan dokular arası değişken mikrosatellit frekansları Çizelge 4.28’de verilmiştir. Tüm dokulara ait toplam 13261 kalem içerisinde 3087 adet değişken mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir.

4.4.2.1. Anter dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna ait 510 kalem ve diğer dokulara ait 12751 kalem üzerinde anter dokusuna ait toplam 54 adet, diğer dokularda ise toplam 3033 adet değişken mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir. Anter dokusuna ait kalemlerde değişken mikrosatellit bulundurma frekansı gözlenen tekrar sayısı beklenen tekrar sayısına göre az miktarda bulunduğu görülmüştür. Yapılan ki-kare analizinde ($\chi^2=45.895$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde az miktarda değişken mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.28).

Değişken mikrosatellitlerin rakamsal olarak büyük çoğunluğunu mononükleotitlerin oluşturduğu görülmüştür. Ki-kare istatistik analizine göre ($\chi^2=41.653$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel olarak mononükleotitlerin önemli olduğu belirlenmiştir. Diğer mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel anlamda önemli olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.28).

4.4.2.2. Genç kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna ait 1460 kalem ve diğer dokulara ait 11801 kalem arasında genç kök dokusuna ait toplam 384 adet, diğer dokularda ise toplam 2703 adet

değişken mikrosatellit bulunmuştur. Genç kök dokusuna ait kalemlerde değişken mikrosatellit bulundurma frekansı gözlenen tekrar sayısı beklenen tekrar sayısına göre fazla miktarda bulunduğu saptanmıştır. Yapılan ki-kare analizinde ($\chi^2=10.153$, $P=0.0014$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde değişken mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.28).

Değişken mikrosatellitlerin rakamsal olarak tamamına yakını mononükleotitlerin oluşturduğu gözlenmiştir. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre ($\chi^2=16.430$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel anlamda mononükleotitlerin önemli olduğu görülmüştür. Mononükleotit dışındaki motif frekans farklılıkları istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.28).

4.4.2.3. Tomurcuk dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna ait 1919 kalem ve diğer dokulara ait 11342 kalem arasında tomurcuk dokusuna ait toplam 576 adet, diğer dokularda ise toplam 2511 adet değişken mikrosatellit bulunmuştur. Tomurcuk dokusuna ait kalemlerde değişken mikrosatellit bulundurma frekansı beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre fazla miktarda gözlenen değişken mikrosatellit bulunmuştur. Yapılan ki-kare analizinde ($\chi^2=37.549$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde değişken mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.28).

Mikrosatellit motifleri yönünden tomurcuk ve diğer dokular karşılaştırıldığında beklenen mononükleotit sayısına göre oldukça yüksek düzeyde mononükleotit ($\chi^2=57.404$, $P\leq 0.0001$) tespit edilmiştir. Ayrıca beklenen dinükleotit sayısına göre oldukça düşük düzeyde bulunan dinükleotit motifinin yapılan ki-kare istatistik analizine göre ($\chi^2=13.851$, $P=0.0002$) önemli olduğu belirlenmiştir. Diğer değişken mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.28).

4.4.2.4. Genç meyve dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna ait 1998 kalem üzerinde toplam 477 adet, diğer dokulara ait 11263 kalem üzerinde toplam 2610 adet değişken mikrosatellit bulunduğu saptanmıştır. Genç meyve dokusuna ve diğer dokulara ait kalemlerde değişken mikrosatellit frekansı değerlendirildiği zaman gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.28). Değişken mikrosatellit motif frekansları yönünden incelendiğinde genç meyve dokusuna ait kalemler ile diğer dokulara ait kalemler arasında beklenen trinükleotit sayısına göre gözlenen fazla sayıda trinükleotit sayısı olduğu saptanmıştır. Ki-kare istatistik analizi yapıldığı zaman trinükleotitlerin varlığının istatistiksel olarak ($\chi^2=6.270$, $P=0.0123$) önemli olduğu belirlenmiştir. Trinükleotit dışındaki motif frekans farklılıklarının istatistiksel anlamda önemsiz olduğu görülmüştür (Çizelge 4.28).

4.4.2.5. Kılcal kök dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusuna ait 1473 kalem üzerinde toplam 342 adet değişken mikrosatellit saptanırken karşılaştırılan diğer dokulara ait 11788 kalem üzerinde toplam 2745 adet değişken mikrosatellit bulunduğu belirlenmiştir. Kılcal kök dokusuna ait kalemler ile diğer dokularda değişken mikrosatellit frekansına bakıldığında beklenen değişken mikrosatellit sayısından oldukça yüksek oranda gözlenen değişken mikrosatellit bulunduğu tespit edilmiştir.

Analize tabi tutulan veriler ışığında ki-kare analiz sonucunda istatistiksel olarak ($\chi^2=5.877$, $P=0.0153$) önemli seviyede değişken mikrosatellit içerdiği bulunmuştur (Çizelge 4.28). Önemli bir çoğunluğunu mononükleotitlerin meydana getirdiği değişken mikrosatellitlerin içerisinde mononükleotitlerin varlığı istatistiksel anlamda da ($\chi^2=57.404$, $P=0.0030$) önemli bulunmuştur. Diğer değişken mikrosatellit frekansları arasında istatistiksel olarak önemsiz olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.28).

4.4.2.6. Plasenta dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Plasenta dokusuna ait 2754 kalem ile diğer dokularda bulunan 11788 kalem üzerinde belirlenen toplam 3087 adet değişken mikrosatellitin 406 adeti plasenta dokusuna ait kalemler üzerinde geri kalan 2681 adeti diğer dokular üzerinde tespit edilmiştir. Plasenta dokusuna ait kalemler ile diğer dokularda değişken mikrosatellit frekansı incelendiğinde beklenene göre oldukça düşük sayıda gözlenen değişken mikrosatellit bulunmuştur.

Yapılan ki-kare analiz ile istatistiksel olarak ($\chi^2=73.026, 0.0001$) önemli düzeyde değişken mikrosatellit içerdiği saptanmıştır (Çizelge 4.28). Dokular arası mikrosatellit motifleri yönünden plasenta ve diğer dokular kıyaslandığı zaman beklenen mononükleotit sayısına göre oldukça düşük sayıda mononükleotit ($\chi^2=97.567, P\leq 0.0001$) tespit edilmiş, diğer değişken mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.28).

4.4.2.7. Yaprak dokusu ve diğer altı dokuda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Yaprak dokusuna ait 3147 kalem üzerinde 806 adet değişken mikrosatellit diğer dokulara ait 10114 kalem üzerinde 2281 adeti değişken mikrosatellit tespit edilmiştir. Yaprak dokusunda ve diğer dokular içerisinde mikrosatellit frekansı incelendiğinde ise gözlenen ve beklenen değişken mikrosatellitler arasında istatistiksel olarak önemlilik göstermemiştir (Çizelge 4.28).

Değişken mikrosatellit motif frekansları yaprak dokusuna ait kalemler içerisinde beklenen dinükleotit sayısına göre fazla sayıda gözlenmiştir. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre dinükleotitlerin varlığı istatistiksel olarak ($\chi^2=19.441, \leq 0.0001$) önemli bulunmuştur. Dinükleotit dışındaki motif frekans farklılıkları istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. Dokular arası değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
T_Anter	352370	510	54	129	44	110	3	7	6	8	0	0.6	0	0.5	1	3.2
Diğer Dokular	8051052	12751	3033	2958	2588	2521	158	154	187	185	13	12.4	11	10.5	76	73.8
χ^2			45.895***		41.653***		2.175		0.565		0.569		0.481		1.606	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	
T_Genç Kök	896544	1460	384	329	345	280	17	17	16	21	1	1.4	2	1.2	3	8.2
Diğer Dokular	7506878	11801	2703	2858	2287	2351	144	144	177	172	12	11.6	9	9.8	74	68.8
χ^2			10.153**		16.430***		0.002		1.146		0.121		0.651		3.706	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	
T_Tomurcuk	1239354	1919	576	455	526	388	7	24	27	28	2	1.9	1	1.6	13	11.4
Diğer Dokular	7164068	11342	2511	2632	2106	2244	154	137	166	165	11	11.1	10	9.4	64	65.6
χ^2			37.549***		57.404***		13.851***		0.088		0.004		0.280		0.279	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	
T_Genç Meyve	1246773	1998	477	458	398	391	22	24	41	29	2	1.9	0	1.6	14	11.4
Diğer Dokular	7156649	11263	2610	2628	2234	2242	139	137	152	164	11	11.1	11	9.4	63	65.6
χ^2			0.925		0.169		0.175		6.270*		0.003		1.916		0.682	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, T: Toplam

Çizelge 4. 28. Devamı

Doku Tipi	# Baz	#Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
T_Kılcal Kök	930283	1473	384	342	339	291	14	17.8	20	21.4	2	1.4	1	1.2	8	8.5
Diğer Dokular	7473139	11788	2703	2745	2293	2341	147	143.2	173	171.6	11	11.6	10	9.8	69	68.5
χ^2			5.877*		8.755**		0.922		0.098		0.246		0.044		0.036	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	
T_Plasenta	1614401	2754	406	593	306	506	33	30.9	40	37.1	5	2.5	4	2.1	18	14.8
Diğer Dokular	6789021	10507	2681	2494	2326	2126	128	130.1	153	155.9	8	10.5	7	8.9	59	62.2
χ^2			73.026***		97.567***		0.172		0.285		3.104		2.085		0.861	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	
T_Yaprak	2123697	3147	806	780	674	665	65	40.7	43	48.8	1	3.3	3	2.8	20	19.5
Diğer Dokular	6279725	10114	2281	2307	1958	1967	96	120.3	150	144.2	12	9.7	8	8.2	57	57.5
χ^2			1.147		0.157		19.441***		0.915		0.915		0.023		0.020	
Toplam	8403422	13261	3087		2632		161		193		13		11		77	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, T: Toplam

4.4.3. Değişken mikrosatellit frekans analizleri (Analiz III)

Dokularda bulunan konsensus ve teksele dizilere ait kelimeler Analiz III ile birebir karşılaştırılarak elde edilen değişken mikrosatellit bulundurma sıklıklarına ait veriler aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

4.4.3.1. Anter dokusu ile genç kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusu ile genç kök dokusuna özgü toplam 1085 kelim üzerinde toplam 140 adet değişken mikrosatellit belirlenmiştir. Anter dokusuna özgü 375 kelimde toplam 18 adet, genç kök dokusuna özgü ise 710 kelim üzerinde 122 adet değişken mikrosatellit saptanmıştır. Beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre çok düşük değişken mikrosatellitin varlığı ki-kare analizine göre istatistiksel anlamda ($\chi^2=55.632$, $P\leq 0.0001$) mikrosatellit frekansının iki doku arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Anter dokusunda beklenenden oldukça düşük, genç kök dokusunda ise beklenenden yüksek miktarda mononükleotit mikrosatellit motifinin var olması istatistiksel olarak ($\chi^2=60.769$, $P\leq 0.0001$) önemli bulunmuştur. Diğer mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.29).

4.4.3.2. Anter dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kelim üzerinde 18 adet değişken tekrarlı mikrosatellit bulunurken tomurcuk dokusuna özgü 1124 kelim üzerinde 237 adet değişken tekrarlı mikrosatellit saptanmıştır. Anter dokusunda beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre oldukça düşük, tomurcuk dokusunda ise oldukça yüksek miktarda değişken mikrosatellitin bulunması istatistiksel anlamda ($\chi^2=57.603$, $P\leq 0.0001$) iki doku arasında mikrosatellit frekansının farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.30). Anter dokusunda beklenenden düşük iken tomurcuk dokusunda yüksek sayıda mononükleotit mikrosatellit motifinin bulunması ($\chi^2=58.607$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel olarak önemli bir farklılık olarak değerlendirilmiştir. Mononükleotit mikrosatellit motifinin yanı sıra dinükleotitlerin anter dokusunda beklenenden yüksek tomurcuk

dokusunda ise düşük miktarda olmak ($\chi^2=4.240$, $P=0.0395$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu iki mikrosatellit motifi dışında kalan motiflerin istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.30).

4.4.3.3. Anter dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna özgü kalemlerde 18 adet, genç meyve dokusuna özgü kalemlerde 179 adet değişken mikrosatellit saptanmıştır. Anter dokusunda beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre çok düşük, genç meyve dokusunda ise çok yüksek miktarda değişken mikrosatellitin bulunması ($\chi^2=42.222$, $P<0.0001$) istatistiksel anlamda mikrosatellit yoğunluğunun iki doku arasında önemli düzeyde farklı olduğunun bir göstergesi olmuştur (Çizelge 4.31). Mikrosatellit motiflerinden mononükleotit ve trinükleotitlerin anter dokusunda beklenenden oldukça düşük, genç meyve dokusunda da beklenenden yüksek miktarda bulunması mononükleotitlerin ($\chi^2=35.197$, $P<0.0001$) ve trinükleotitlerin ($\chi^2=5.136$, $P=0.0234$) istatistiksel anlamda önemli olduğunu göstermiştir. Diğer mikrosatellit motifleri ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.31).

4.4.3.4. Anter dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem üzerinde 18 adet değişken mikrosatellit varken kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 125 adet değişken mikrosatellit tespit edilmiştir. Anter dokusunda gözlenen değişken mikrosatellit sayısı oldukça düşük, kılcal kök dokusunda ise oldukça yüksek bulunması ile istatistiksel olarak ($\chi^2=45.016$, $P<0.0001$) mikrosatellit frekansının farklı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.32). Mononükleotit mikrosatellit motifi sayısı anter dokusunda düşük, kılcal kök dokusunda yüksek miktarda gözlenmiş, istatistiksel olarak ($\chi^2=41.510$, $P<0.0001$) her iki doku için mononükleotitlerin önemli farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Mononükleotitler dışındaki mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel anlamda önemsiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.32).

4.4.3.5. Anter dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusuna özgü 375 kalemde 18 adet, plasenta dokusuna özgü 1727 kalemde 89 adet değişken mikrosatellit belirlenmiştir. Çizelge 4.33'te görüldüğü gibi anter dokusunda gözlenen düşük, plasenta dokusunda yüksek değişken mikrosatellit sayısı ($\chi^2=7.216$, $P=0.0072$) istatistiksel anlamda mikrosatellit frekansının iki doku arasında önemli farklılık gösterdiği saptanmıştır. Mikrosatellit motiflerinin herhangi birinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmüştür.

4.4.3.6. Anter dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Anter dokusunda özgü 375 kalem üzerinde 18 adet, yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 452 adet değişken mikrosatellit bulunduğu tespit edilmiştir. Değişken mikrosatellit miktarının anter dokusunda beklenene göre çok düşük, yaprak dokusunda ise yüksek miktarda var olması ($\chi^2=48.050$, $P=0.0001$) istatistiksel bakımdan iki dokunun son derece önemli düzeyde mikrosatellit frekansının farklı olduğunu göstermiştir. Mikrosatellit motiflerinden mononükleotit motifinin anter dokusunda beklenen değişken mononükleotit sayısından düşük, yaprak dokusunda ise oldukça yüksek sayıda bulunması ($\chi^2=42.343$, $P=0.0001$) her iki doku için mononükleotitler istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmuştur. Mikrosatellit motiflerinden mononükleotit dışında kalan dinükleotit, trinükleotit, tetranükleotit, pentanükleotit ve hekzanükleotitlerin istatistiksel anlamda önemli olmadığı analizler sonucu görülmüştür (Çizelge 4.34).

4.4.3.7. Genç kök dokusu ile tomurcuk dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 122 adet, tomurcuk dokusunda 1124 kalem üzerinde 237 adet değişken mikrosatellit belirlenmiştir. Genç kök ve tomurcuk dokuları arasında değişken mikrosatellit frekansı ve motifler arasında istatistiksel anlamda önemli düzeyde bir farklılık saptanamamıştır (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.29. Anter ve genç kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	61.8	13	57.0	3	1.8	2	1.8	0	0.4	0	0.4	0	0.4
S_Genç Kök	282194	710	122	78.2	116	72.0	1	2.2	2	2.2	1	0.6	1	0.6	1	0.6
χ^2			55.632***		60.769***		1.543		0.055		0.791		0.791		0.791	
Toplam	505363	1085	140		129		4		4		1		1		1	

Çizelge 4.30. Anter ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	72.7	13	65.3	3	1.1	2	4.8	0	0.3	0	0	0	1.1
S_Tomurcuk	559390	1124	237	182.3	216	163.7	1	2.9	15	12.2	1	0.7	0	0	4	2.9
χ^2			57.603***		58.607***		4.240*		2.340		0.399				1.596	
Toplam	782559	1499	255		229		4		17		1		0		4	

Çizelge 4.31. Anter ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	60.0	13	46.9	3	4.0	2	7.0	0	0.6	0	0	0	1.5
S_Genç Meyve	509974	1081	179	137.0	141	107.1	10	9.0	21	16.0	2	1.4	0	0	5	3.5
χ^2			42.222***		35.197***		0.333		5.136*		0.875				2.188	
Toplam	733143	1456	197		154		13		23		2		0		5	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.32. Anter ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	57.3	13	47.3	3	3.2	2	4.8	0	0	0	0	0	2.0
S_Kılcal Kök	333591	760	12	85.7	105	70.7	5	4.8	10	7.2	0	0	0	0	5	3.0
χ^2			45.016***		41.510***		0.022		2.740						3.345	
Toplam	556760	1135	143		118		8		12		0		0		5	

Çizelge 4.33. Anter ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	31.3	13	19.8	3	4.0	2	4.2	0	0.8	0	0.7	0	1.8
S_Plasenta	790475	1727	124	110.7	77	70.2	15	14.0	17	14.8	4	3.2	3	2.3	8	6.2
χ^2			7.216*		3.006		0.300		1.461		1.129		0.847		2.259	
Toplam	1013644	2102	142		90		18		19		4		3		8	

Çizelge 4.34. Anter ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Anter	223169	375	18	72.2	13	59.0	3	7.4	2	3.2	0	0.2	0	0.3	0	2.2
S_Yaprak	1229959	2128	452	397.8	371	325.0	45	40.6	19	17.8	1	0.8	2	1.7	14	11.8
χ^2			48.050***		42.343***		3.063		0.550		0.181		0.363		2.540	
Toplam	1453128	2503	470		384		48		21		1		2		14	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

4.4.3.8. Genç kök dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 122 adet, genç meyve dokusunda 1081 kalem üzerinde 179 adet değişken mikrosatellit bulunduğu tespit edilmiştir. Değişken mikrosatellit frekansı her iki dokuda beklenen sayılara yakın sayıda değişken mikrosatellit bulunduğu için istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık belirlenmemiştir.

Mikrosatellit motiflerinin incelenmesi ile mononükleotit mikrosatellit motifinin genç kök dokusunda beklenenden yüksek, genç meyve dokusunda ise düşük olması istatistiksel anlamda ($\chi^2=10.142$, $P=0.0014$) mononükleotitlerin önemli düzeyde farklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca trinükleotit mikrosatellit motifinin genç kök dokusunda beklenen sayıdan düşük, genç meyve dokusunda ise yüksek olması istatistik anlamda ($\chi^2=7.272$, $P=0.0070$) ~~ükle~~ otitlerin önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir. Diğer motiflerde ise istatistiksel olarak önemli sonuç alınmamıştır (Çizelge 4.36).

4.4.3.9. Genç kök dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 122 adet değişken mikrosatellit bulunurken kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 125 adet değişken mikrosatellit bulunmuştur. Genç kök ve kılcal kök dokularında değişken mikrosatellit frekansı bakımından istatistiksel anlamda farklılık saptanmamıştır.

Mikrosatellit motifi açısından ise mononükleotit mikrosatellit motifi genç kök dokusunda beklenen tekrar sayısından yüksek, kılcal dokusunda ise düşük sonuç vermiş olması istatistiksel anlamda ($\chi^2=4.110$, $P=0.0426$) iki dokuda mononükleotitler için önemli farklılık olduğu görülmüştür. Trinükleotit mikrosatellit motifinin genç kök dokusunda beklenen sayıdan düşük, kılcal dokusunda yüksek bulunması ($\chi^2=4.110$, $P=0.0426$) her iki dokuda da trinükleotitlerin önemli

olduğunu göstermiştir. Diğer mikrosatellit motiflerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.37).

4.4.3.10. Genç kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Değişken mikrosatellit sayısı genç kök dokusuna özgü 710 kalem üzerinde 122 adet, plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 124 adet olarak saptanmıştır. Genç kök dokusunda beklenen değişken mikrosatellit sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda ise oldukça düşük değişken mikrosatellit miktarı dokular arasında mikrosatellit yoğunluğu bakımından ($\chi^2=68.804$, $P<0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde değişim gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotitler genç kök dokusunda beklenen sayıdan oldukça düşük, plasenta dokusunda ise yüksek belirlenmiş, mononükleotit motif frekansı istatistiksel anlamda ($\chi^2=113.710$, $P<0.0001$) önemli bulunmuştur. Diğer mikrosatellit motif frekansları istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.38).

4.4.3.11. Genç kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç kök dokusuna özgü ve yaprak dokusuna özgü belirlenen değişken mikrosatellit sayıları ve ki-kare istatistik sonuçlar incelendiğinde iki dokuda da beklenen tekrar sayısına göre yakın miktarda değişken mikrosatellit bulunması dokular arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık olmadığı sonucunu göstermiştir.

Mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotitler genç kök dokusunda beklenenden düşük, yaprak dokusunda ise yüksek miktarda belirlenmiştir. Ki-kare istatistik analizinde ($\chi^2=8.534$, $P=0.0035$) iki dokuda da mononükleotit frekansının önemli olduğu saptanmıştır. Dinükleotit mikrosatellit motifinin ise genç kök dokusunda beklenenden düşük sayıda, yaprak dokusunda yüksek sayıda olduğu

görülmüştür. Yapılan ki-kare analizi sonucu ($\chi^2=8.238$, $P=0.0041$) ~~ge~~ kök ve yaprak dokularının istatistiksel olarak dinükleotit mikrosatellit motifi içeriği arasında önemli farklılık olduğu bulunmuştur. Trinükleotit, tetranükleotit, pentanükleotit ve hekzanükleotit mikrosatellit motiflerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.39).

4.4.3.12. Tomurcuk dokusu ile genç meyve dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 237 adet değişken mikrosatellit saptanırken genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 179 adet saptanmıştır. Her iki dokuda mikrosatellit sayısı beklenen düzeyde olduğu için iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık ortaya çıkartmamıştır.

Mikrosatellit motiflerinden mononükleotit tekrar sayısının tomurcuk dokusunda beklenenden yüksek, genç meyve dokusunda ise düşük sayıda elde edilmesi istatistiksel anlamda ($\chi^2=9.608$, $P=0.0019$) mononükleotitler bakımından iki doku arasında önemli farklılık olduğunu göstermiştir. Diğer mikrosatellit motifleri içerisinde dinükleotitlerin ise tomurcuk dokusunda beklenenden düşük, genç meyve dokusunda ise yüksek sayıda olmasından dolayı istatistiksel anlamda ($\chi^2=8.237$, $P=0.0041$) iki doku arasında önemli düzeyde farklı olduğu saptanmıştır. Geri kalan motiflerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.40).

4.4.3.13. Tomurcuk dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 237 adet değişken mikrosatellit bulunurken kılcal kök dokusuna özgü 760 kalem üzerinde 125 adet değişken tekrarlı mikrosatellit olduğu belirlenmiş, her iki dokuda da değişken mikrosatellit miktarı beklenen düzeyde olduğu için istatistiksel anlamda önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Mikrosatellit motifleri incelendiğinde ise dinükleotit mikrosatellit motifinin tomurcuk dokusunda beklenenden düşük, kılcal kök dokusunda ise yüksek olması durumuyla ($\chi^2=5.420$, $P=0.0199$) istatistiksel olarak iki doku arasında önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. Diğer mikrosatellit motiflerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür (Çizelge 4.41).

4.4.3.14. Tomurcuk dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 237 adet değişken mikrosatellit gözlenirken plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 124 adet belirlenmiştir. Tomurcuk dokusunda beklenen sayıya göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda oldukça düşük sayıda gözlenen değişken mikrosatellitin olması dokular arasında mikrosatellit frekansının ki-kare analizi sonucu ($\chi^2=87.195$, $P=0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde değişim gösterdiği saptanmıştır.

Mikrosatellit motifi bakımından incelenen tomurcuk ve plasenta dokularında mononükleotit mikrosatellit motifinin tomurcuk dokusunda beklenen sayıdan oldukça düşük, plasenta dokusunda ise yüksek olduğu mononükleotitlerin her iki doku arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı ($\chi^2=125.810$, $P\leq 0.0001$) olduğu görülmüştür. Ayrıca dinükleotit mikrosatellit motifinin tomurcuk dokusunda beklenen sayıdan düşük, plasenta dokusunda ise yüksek olması ($\chi^2=8.165$, $P=0.0043$) her iki doku için istatistiksel olarak dinükleotitlerin önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir. Diğer tekrar motiflerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.42).

4.4.3.15. Tomurcuk dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Tomurcuk dokusuna özgü 1124 kalem üzerinde 237 adet, yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 452 adet değişken mikrosatellit saptanmış ve iki dokuda mevcut mikrosatellit oranının beklenen düzeyde olduğu belirlenmiş ve istatistiksel anlamda her iki doku arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık tespit edilmemiştir.

Mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotit mikrosatellit motifi tomurcuk dokusunda beklenen sayıdan oldukça düşük, yaprak dokusunda ise yüksek olduğu için yapılan ki-kare analizi sonucu istatistiksel olarak ($\chi^2=8.369$, $P=0.0038$) mononükleotitlerin iki doku arasında önemli düzeyde farklı olduğu tespit edilmiştir. Mikrosatellit motiflerinden dinükleotitlerin sayısının tomurcuk dokusunda beklenenden çok düşük, yaprak dokusunda ise oldukça yüksek olması ki-kare analizine göre istatistiksel olarak ($\chi^2=18.110$, $P\leq 0.0001$) dinükleotitlerin her iki doku için önemli düzeyde farklı olduğunu ortaya koymuştur.

Mononükleotit ve dinükleotit mikrosatellit motifi haricinde kalan tekrar motiflerinin ise istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.43).

4.4.3.16. Genç meyve dokusu ile kılcal kök dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 179 adet değişken mikrosatellit belirlenirken kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 125 adet olduğu saptanmıştır. Genç meyve ve kılcal kök dokularında gözlenen tekrar sayısı beklenen tekrar sayısına yakın oranlarda olduğu için istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık ortaya çıkmamıştır. Ayrıca mikrosatellit motiflerinin de istatistiksel anlamda önemli düzeyde olmadıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.44).

4.4.3.17. Genç meyve dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 179 adet saptanırken plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 124 adet değişken mikrosatellit tespit edilmiştir. Genç meyve dokusunda beklenen mikrosatellit sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda ise oldukça düşük olması ($\chi^2=50.14$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel olarak önemli derecede dokular arasında mikrosatellit bulundurma sıklığının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.45).

Mikrosatellit motiflerine göre mononükleotit genç meyve dokusunda beklenen tekrar sayısından yüksek, plasenta dokusunda ise düşük bulunması yapılan ki-kare analizi sonucu ($\chi^2=59.299$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel olarak mononükleotitlerin iki doku arasında önemli düzeyde farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca trinükleotit mikrosatellit motifi genç meyve dokusunda beklenenden yüksek sayıda, plasenta dokusunda ise düşük sayıda belirlenmiştir. Yapılan ki-kare analizine göre ($\chi^2=4.106$, $P=0.0427$) değeri ile istatistiksel olarak her iki doku için önemli düzeyde farklılık göstermiştir. Diğer tekrar motiflerinin ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.45).

4.4.3.18. Genç meyve dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Genç meyve dokusuna özgü 1081 kalem üzerinde 179 adet değişken mikrosatellit belirlenirken yaprak dokusunda 2128 kalem üzerinde 452 adet olduğu saptanmıştır. Genç meyve ve yaprak dokularında mikrosatellit sayısı beklenen sayı oranında olduğu gözlenmiş ve istatistiksel anlamda önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Mikrosatellit motiflerinden trinükleotitlerin genç meyve dokusunda düşük yaprak dokusunda ise yüksek olduğu ($\chi^2=10.382$, $P=0.0013$) istatistiksel olarak trinükleotitlerin önemli düzeyde farklı olduğu görülmüştür. Diğer mikrosatellit motiflerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.46).

4.4.3.19. Kılcal kök dokusu ile plasenta dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusuna özgü 760 kalem üzerinde 125 adet değişken mikrosatellit bulunurken plasenta dokusunda ise 1727 kalem üzerinde 24 adet belirlenmiştir. Kılcal kök dokusunda beklenen tekrar sayısına göre oldukça yüksek, plasenta dokusunda oldukça düşük miktarda mikrosatellitin tespit edilmesi dokular arasında mikrosatellit yoğunluğunun ($\chi^2=50.256$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık gösterdiği sonucunu vermiştir.

Mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotit kılcal kök dokusunda beklenenden yüksek, plasenta dokusunda ise düşük bulunmuştur. Yapılan ki-kare istatistik analizine göre ($\chi^2=68.444$, $P\leq 0.0001$) mononükleotitlerin istatistiksel olarak her iki dokuda önemli düzeyde farklı olduğu saptanmıştır. Diğer mikrosatellit motiflerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.47).

4.4.3.20. Kılcal kök dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Kılcal kök dokusunda 760 kalem üzerinde 125 adet, yaprak dokusuna özgü 2128 kalem üzerinde ise 452 adet değişken mikrosatellit bulunmuş, bu dokularda istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklılık saptanmamıştır. Ayrıca mikrosatellit motiflerinde de istatistiksel olarak önemli sonuç alınmamıştır (Çizelge 4.48).

4.4.3.21. Plasenta dokusu ile yaprak dokusunda bulunan değişken mikrosatellitlerin analizleri

Plasenta dokusuna özgü 1727 kalemde 124 adet değişken mikrosatellit belirlenirken, yaprak dokusunda 2128 kalemde 452 adet tespit edilmiştir. Plasenta dokusunda beklenen tekrar sayısına göre oldukça düşük, yaprak dokusunda oldukça yüksek miktarda değişken mikrosatellitin bulunması dokular arasında mikrosatellit frekansının ($\chi^2= 74.881$, $P\leq 0.0001$) istatistiksel anlamda önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.49).

Mononükleotit mikrosatellit motifinin plasenta dokusunda beklenen sayıdan düşük, yaprak dokusunda yüksek olması istatistiksel olarak ($\chi^2=90.516$, $P\leq 0.0001$) iki dokunun önemli düzeyde farklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca dinükleotit tekrar sayısının plasenta dokusunda düşük yaprak dokusunda ise yüksek bulunması ile yapılan analiz sonucu ($\chi^2=5.025$, $P=0.0250$) istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir. Diğer tekrar motiflerinin ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.35. Genç kök ve tomurcuk dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Kök	282194	710	122	120.4	116	111.3	1	0.6	2	5.7	1	0.7	1	0.3	1	1.7
S_Tomurcuk	559390	1124	237	238.6	216	220.7	1	1.4	15	11.3	1	0.3	0	0.7	4	3.3
χ^2			0.033		0.296		0.243		3.614		0.243		1.982		0.411	
Toplam	841584	1834	359		332		2		17		2		1		5	

Çizelge 4.36. Genç kök ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Kök	282194	710	122	107.2	116	91.6	1	3.9	2	8.2	1	1.1	1	0.4	1	2.1
S_Genç Meyve	509974	1081	179	193.8	141	165.4	10	7.1	21	14.8	2	1.9	0	0.6	5	3.9
χ^2			3.162		10.142*		3.377		7.272*		0.007		1.807		0.940	
Toplam	792168	1791	261		240		9		6		2		1		3	

Çizelge 4.37. Genç kök ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Kök	282194	710	122	113.2	116	101.3	1	2.8	2	5.5	1	0.5	1	0.5	1	2.7
S_Kılcal Kök	333591	760	125	133.8	105	119.7	5	3.2	10	6.5	0	0.5	0	0.5	5	3.3
χ^2			1.265		3.951*		2.055		4.110		1.182		2.055		1.265	
Toplam	615785	1470	247		221		6		12		1		1		6	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.38. Genç kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	122	64.7	116	50.8	1	4.2	2	5.0	1	1.3	1	1.1	1	2.4
S_Plasenta	790475	1727	124	181.3	77	142.2	15	11.8	17	14.0	4	3.7	3	2.9	8	6.6
χ^2			68.804***		113.710***		3.320		2.440		0.103		0.004		1.072	
Toplam	1072669	2437	246		193		16		19		5		4		9	

Çizelge 4.39. Genç kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Geç Kök	282194	710	122	107.1	116	90.9	1	8.6	2	3.9	1	0.4	1	0.6	1	2.8
S_Yaprak	1229959	2128	452	476.9	371	396.1	45	37.4	19	17.1	1	1.6	2	2.4	14	12.2
χ^2			2.541		8.534*		8.238*		1.155		1.294		0.425		1.422	
Toplam	1512153	2838	574		487		46		21		2		3		15	

Çizelge 4.40. Tomurcuk ve genç meyve dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	237	217.6	216	186.8	1	5.8	15	18.8	1	1.6	0	0	4	4.7
S_Geç Meyve	509974	1081	179	198.4	141	170.2	10	5.2	21	17.2	2	1.4	0	0	5	4.3
χ^2			3.622		9.608*		8.237*		1.635		0.433				0.223	
Toplam	1069364	2205	416		357		11		36		3		0		9	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.41. Tomurcuk ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	237	226.8	216	201.1	1	3.8	15	15.7	1	0.6	0	0.7	4	5.6
S_Kılcal Kök	333591	760	125	135.2	105	119.9	5	2.2	10	9.3	0	0.4	0	0.5	5	3.4
χ^2			1.236		2.962		5.420*		0.075		0.596				1.274	
Toplam	892981	1884	362		321		6		25		1		0		9	

Çizelge 4.42. Tomurcuk ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	237	149.6	216	121.4	1	6.6	15	13.3	1	2.1	0	1.2	4	5.0
S_Plasenta	790475	1727	124	211.4	77	171.6	15	9.4	17	18.7	4	2.9	3	1.8	8	7.0
χ^2			87.195***		125.810***		8.165*		0.390		0.947		2.123		0.325	
Toplam	1349865	2851	361		293		16		32		5		3		12	

Çizelge 4.43. Tomurcuk ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Tomurcuk	559390	1124	237	215.4	216	183.5	1	14.4	15	10.6	1	0.6	0	0.6	4	5.6
S_Yaprak	1229959	2128	452	473.6	371	403.5	45	31.6	19	23.4	1	1.4	2	1.4	14	12.4
χ^2			3.152		8.369*		18.110**		2.615		0.327		0.910		0.685	
Toplam	1789349	3252	689		587		46		34		2		2		18	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.44. Genç meyve ve kılcal kök dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	179	183.8	141	148.7	10	9.1	21	18.7	2	1.2	0	0	5	6.0
S_Kılcal Kök	333591	760	125	120.2	105	97.3	5	5.9	10	12.3	0	0.8	0	0	5	4.0
χ^2			0.315		1.013		0.242		0.689		1.308				0.457	
Toplam	843565	1841	304		246		15		31		2		0		10	

Çizelge 4.45. Genç meyve ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	179	118.8	141	85.5	10	9.8	21	14.9	2	2.4	0	1.2	5	5.1
S_Plasenta	790475	1727	124	184.2	77	132.5	15	15.2	17	23.1	4	3.6	3	1.8	8	7.9
χ^2			50.140***		59.299***		0.006		4.106*		0.087		1.935		0.003	
Toplam	1300449	2808	303		218		25		38		6		3		13	

Çizelge 4.46. Genç meyve ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Genç Meyve	509974	1081	179	184.9	141	150.1	10	16.1	21	11.7	2	0.9	0	0.6	5	5.6
S_Yaprak	1229959	2128	452	446.1	371	361.9	45	38.9	19	28.3	1	2.1	2	1.4	14	13.4
χ^2			0.270		0.775		3.287		10.382*		2.020		0.829		0.822	
Toplam	1739933	3209	631		512		55		40		3		2		19	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

Çizelge 4.47. Kılcal kök ve plasenta dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	125	73.9	105	54.0	5	5.9	10	8.0	0	1.2	0	0.9	5	3.9
S_Plasenta	790475	1727	124	175.1	77	128.0	15	14.1	17	19.0	4	2.8	3	2.1	8	9.1
χ^2			50.256***		68.444***		0.210		0.700		1.688		1.266		0.481	
Toplam	1124066	2487	249		182		20		27		4		3		13	

Çizelge 4.48. Kılcal kök ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Kılcal Kök	333591	760	125	123.1	105	101.6	5	10.7	10	6.2	0	0.2	0	0.4	5	4.1
S_Yaprak	1229959	2128	452	453.9	371	374.4	45	39.3	19	22.8	1	0.8	2	1.6	14	14.9
χ^2			0.037		0.148		3.828		2.987		0.271		0.542		0.280	
Toplam	1566550	2888	577		476		50		29		1		2		19	

Çizelge 4.49. Plasenta ve yaprak dokularının karşılaştırılarak değişken mikrosatellitlerin değerlendirilmesi

Doku Tipi	# Baz	# Kalem	# Değişken-Mikrosatellitler		Mikrosatellit Motifleri											
					Mono-		Di-		Tri-		Tetra-		Penta-		Hekza-	
			G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
S_Plasenta	790475	1727	124	225.4	77	175.3	15	23.5	17	14.1	4	2.0	3	2.0	8	8.6
S_Yaprak	1229959	2128	452	350.6	371	272.7	45	36.5	19	21.9	1	3.0	2	3.0	14	13.4
χ^2			74.881***		90.516***		5.025*		0.991		3.507		0.915		0.070	
Toplam	2020234	3855	576		448		60		36		5		5		22	

G: Gözlenen düzenli mikrosatellitler, B: Beklenen değişken mikrosatellitler, *: P<0.01, **: P<0.005, ***: P<0.0001, S: Spesifik

4.5. Düzenli ve Değişken Mikrosatellitlerin Karşılaştırılması

Çalışmada 7 farklı kütüphaneden elde edilen kalemmler arasındaki düzenli ve değişken mikrosatellit frekansların karşılaştırması yapılmıştır. Bugüne kadar yapılmamış olan doku ve organ spesifik mikrosatellit dağılımı ve mikrosatellit motiflerinin yoğunluğunun belirlenmesi ile ilgili örnek çalışma niteliğinde olan bu tez çalışması sonucunda dokular arası birkaç doku haricinde değişken mikrosatellit bulundurma sıklığı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.50).

Dokuya özgü ve dokular arası ortak kalemmlerde bulunan düzenli ve değişken mikrosatellitlerin bulundurma sıklıklarının kütüphaneler arasındaki frekansları karşılaştırıldığında anter dokusuna özgü ve anter dokusunun diğer dokularla ortak kalemmlerinde bulunan düzenli mikrosatellitlerden trinükleotit motif frekansı istatistiksel olarak önemli bulunmasına karşın değişken mikrosatellitlerde trinükleotit motif frekansı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu durum anter kütüphanesinde bulunan genlerin düzenli trinükleotit mikrosatellit içerenlerin değişken trinükleotit mikrosatellit içerenlere göre gen regülasyonuna daha etkin rol aldığı şeklinde yorumlanmıştır (Çizelge 4.50).

Genç kök dokusuna özgü ve genç kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemmlerinde bulunan düzenli ve değişken dinükleotit mikrosatellit motiflerinin her iki mikrosatellit tipinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu durum dinükleotit motiflerin çoğunlukla düzenli dinükleotit mikrosatellitlerden oluşması ve beklenenin üzerinde olmasına karşın değişken dinükleotit mikrosatellitlerin varlığının beklenenden çok az düzeyde olmasından kaynaklanmıştır (Çizelge 4.50).

Tomurcuk dokusuna özgü ve tomurcuk dokusunun diğer dokularla ortak kalemmlerinde bulunan düzenli mikrosatellitlerin ve düzenli hekzanükleotit mikrosatellitlerin yüksek frekansta bulunurken değişken mikrosatellit ve değişken hekzanükleotit mikrosatellitlerin istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu durum hem tomurcuk hem de diğer dokularda ifade bulan genlerin değişken mikrosatellit ve değişken hekzanükleotit frekansları yönünden salt tomurcukta ifade edenlerle benzer frekansta değişken mikrosatellit ve değişken hekzanükleotit mikrosatellit içermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Çizelge 4.50).

Çizelge 4.50. MVB verilerinin mikrosatellit analizleri

ANALİZ I															ANALİZ II													
MİKROSATELLİT TİPİ															MİKROSATELLİT TİPİ													
DÜZENLİ							DEĞİŞKEN								DÜZENLİ							DEĞİŞKEN						
1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
														MF														
														MONO														
														Dİ														
														TRİ														
														TETRA														
														PENTA														
														HEKZA														

ANALİZ III (ANTER)															ANALİZ III (GENÇ KÖK)													
MİKROSATELLİT TİPİ															MİKROSATELLİT TİPİ													
DÜZENLİ							DEĞİŞKEN								DÜZENLİ							DEĞİŞKEN						
	2	3	4	5	6	7		2	3	4	5	6	7			3	4	5	6	7		3	4	5	6	7		
														MF														
														MONO														
														Dİ														
														TRİ														
														TETRA														
														PENTA														
														HEKZA														

ANALİZ III (TOMURCUK)															ANALİZ III (GENÇ MEYVE)													
MİKROSATELLİT TİPİ															MİKROSATELLİT TİPİ													
DÜZENLİ							DEĞİŞKEN								DÜZENLİ							DEĞİŞKEN						
			4	5	6	7				4	5	6	7					5	6	7				5	6	7		
														MF														
														MONO														
														Dİ														
														TRİ														
														TERA														
														PENTA														
														HEKZA														

ANALİZ III (KILCAL KÖK)															ANALİZ III (PLASENTA)													
MİKROSATELLİT TİPİ															MİKROSATELLİT TİPİ													
DÜZENLİ							DEĞİŞKEN								DÜZENLİ							DEĞİŞKEN						
					6	7							6		7					7							7	
														MF														
														MONO														
														Dİ														
														TRİ														
														TERA														
														PENTA														
														HEKZA														

MF: Mikrosatellit frekansı, Numaralar 1: anter, 2: genç kök, 3: tomurcuk, 4: genç meyve, 5: kılcal kök, 6: plasenta, 7: yaprak. Renkli alanlar istatistiksel olarak önemli olan mikrosatellit yoğunluğu ve mikrosatellit motiflerini göstermektedir

Meyve dokusuna özgü ve meyve dokusunun diğer dokularla ortak kalemelerinde bulunan düzenli mikrosatellit motifleri içerisinde herhangi istatistiksel farklılık bulunmamasına rağmen değişken mononükleotit mikrosatellit motifi değişken mikrosatellit analizinde farklı bulunmuştur. Mononükleotitler [A], [G], [C] veya [T] nükleotitlerinden oluşmakta olup [A/T] genellikle mRNA'nın poli Adenilasyon kuyruğunda yer almaktadır. Değişken mononükleotit mikrosatellitlerin değişken mikrosatellit analizinde yüksek frekansta bulunuyor olması meyve dokusuna özgü ve meyve dokusu ve diğer dokularda ifade edilen genlerde bulunan mononükleotit mikrosatellit farklılığı poli Adenilasyon kuyruğu dışındaki genlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Çizelge 4.50).

Kılcal kök dokusuna özgü ve kılcal kök dokusunun diğer dokularla ortak kalemelerinde bulunan düzenli mikrosatellit motifleri içerisinde herhangi bir motif frekansı önemli bulunmazken ve değişken mikrosatellit motifleri içerisinde pentanükleotitler istatistiksel olarak önemli seviyede bulunmuştur. Plasenta dokusuna özgü ve plasenta dokusunun diğer dokular ile ortak kalemelerinde düzenli heksanükleotit mikrosatellit motifinin frekansı önemli iken değişken mikrosatellit analizinde değişken heksanükleotit mikrosatellit motif frekansı önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.50).

Çalışmanın Analiz II olarak isimlendirilen aşamasında 7 kütüphaneden elde edilen kalemler arasındaki düzenli ve değişken mikrosatellit frekansların karşılaştırması yapılmıştır. Anter dokusu ile diğer dokular arasında düzenli ve değişken mikrosatellit frekansları bakımından herhangi bir fark saptanmamıştır. Diğer taraftan genç kök dokusu ve diğer dokular arasında düzenli pentanükleotit mikrosatellit frekansı yönünden istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark bulunurken değişken pentanükleotit mikrosatellit önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.50).

Genç meyve dokusu ve diğer dokular arasında değişken trinükleotit mikrosatellit frekansı önemli düzeyde bulunurken düzenli trinükleotit mikrosatellitler önemli düzeyde bulunmamıştır. Plasenta dokusunda düzenli tetranükleotit mikrosatellit yoğunluğu önemli düzeyde tespit edilirken değişken tetranükleotit mikrosatellit frekansı önemli olarak tespit edilmemiştir. Bunların dışında kalan dokular arasında

düzenli ve değişken mikrosatellit yoğunluğu bakımından fark istatistiksel olarak saptanmamıştır (Çizelge 4.50).

Bu çalışmada Analiz III olarak isimlendirilen çalışmada herhangi bir dokuya ait MVB kalemleri diğer dokulara ait olan kalemlerle birebir karşılaştırma yapılmıştır. Bire bir dokulara ait düzenli ve değişken mikrosatellit yoğunlukları kıyaslandığı zaman anter dokusu ve genç meyve dokusunun düzenli trinükleotit içeriği önemli düzeyde değilken değişken trinükleotit mikrosatellit sıklığı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.50).

Anter ve plasenta dokusu arasında düzenli mononükleotit mikrosatellit önemli düzeyde iken değişken mikrosatellit motifleri içerisinde mononükleotitler önemli düzeyde tespit edilmemiştir. Genç kök ve genç meyve dokuları arasında değişken trinükleotit mikrosatellit önemlilik gösterirken düzenli trinükleotit mikrosatellit frekansında bir farklılık göstermemiştir. Genç kök ve kılcal kök dokuları arasında değişken mononükleotit ve trinükleotit mikrosatellitler önemli bulunurken bu motifler düzenli içerisinde önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.50).

Genç meyve ve plasenta dokuları arasında değişken mikrosatellit motifleri içerisinde trinükleotitler önemli düzeyde saptanırken düzenli trinükleotit mikrosatellitler içerisinde önemlilik göstermemiştir. Diğer taraftan genç meyve ve yaprak dokuları arasında düzenli dinükleotit mikrosatellitler önemli düzeyde belirlenirken değişken dinükleotit mikrosatellitler önemlilik göstermiştir (Çizelge 4.50).

Genç kök ve yaprak dokuları arasında düzenli mikrosatellit motifleri içerisinde önemli düzeyde pentanükleotitlerin varlığı göze çarparken değişken mikrosatellitlerde herhangi bir önemlilik göstermemiştir. Tomurcuk ve genç meyve dokuları arasında düzenli mononükleotit mikrosatellit frekansı önemli düzeyde bulunurken değişken mononükleotit mikrosatellitler içerisinde önemli bulunmamıştır. Bire bir karşılaştırmada yukarıda belirtilen dokular haricinde kalan dokular arasında düzenli ve değişken mikrosatellit sıklıkları arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.50).

Genel olarak bu analizler sonucunda değişken mikrosatellit yoğunluklarının çoğu dokuda istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Mikrosatellit motifleri arasında ise mononükleotitlerin bulunma sıklıkları yaygın olarak önemli düzeyde bulunurken dinükleotitlerin en yaygın olan ikinci mikrosatellit motifi olduğu saptanmıştır. Temnykh vd (2000) dinükleotit tekrarlar içerisinde 20 bazın üzerinde tekrar sayısına sahip bir mikrosatellitin daha az sayıda tekrar sayısına sahip olana göre daha fazla varyasyona açık olduğu belirtilmiştir. Bu durum yüksek tekrarlı dinükleotit mikrosatellitlerin gen regölasyonunda önemli olabileceğini göstermektedir.

Dokuya özęü ve dokular arası ortak kalemelerde bulunan düzenli ve değişken mikrosatellitlerin bulundurma sıklıklarının kütüphaneler arasındaki frekansları karşılaştırıldığında anter dokusuna özęü ve anter dokusunun diğer dokularla ortak kalemelerinde bulunan düzenli mikrosatellit trinükleotit motifin istatistiksel olarak önemli bulunmasına karşı değişken mikrosatellit trinükleotit motifin frekansı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu durum anter kütüphanesinde bulunan genlerin düzenli trinükleotit mikrosatellit içerenlerin değişken trinükleotit mikrosatellit içerenlere göre gen regölasyonuna daha etkin rol aldığı şeklinde yorumlanabilir. Protein kodlayan bölgelerde bulunan mikrosatellitler geni aktive etse de etmese de protein ürününün kısalıp kısalmadığı belirlenebilmektedir. Örneğin insanda Huntington hastalığı olarak bilinen hastalığa neden olan *HD* genlerinin kodlayan bölgesinde bulunan [CAG] tekrar sayısındaki artışın “toksik” proteinler olarak bilinen gen aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. *Drosophila*’da sinir sistemi gelişimi ile gelişmeyi kontrol eden trinükleotit tekrarlı dizilerin uzunluğundaki varyasyonun ilişkili olduğu görölmüştür (Karlin ve Burge 1996).

Diğer dokularda düzenli ve değişken mikrosatellit ve düzenli ve değişken mikrosatellit motif analizleri arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikrosatellit tanıma kriteri göz önüne alındığında değişken mikrosatellitler mutlaka düzenli mikrosatellitlerde içerdiiinden dokular arasında belirlenen düzenli ve değişken mikrosatellit frekans analizlerinde benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak yukarıda belirtildiği üzere bazı farklılıklar ortaya çıkmıştır. Farklılıkların ortaya çıkışı ise iki farklı mikrosatellit analizinin gerekliliğini vurgulamıştır. Düzenli

mikrosatellitlerdeki baz sayısındaki değişimler genellikle polimeraz zincir reaksiyonlarıyla elde edilen ampikonların, agaroz, poliakrilamid veya kapilar elektroforez işlemleri ile belirlenebilirken değişken mikrosatellitlerdeki farklılık CAPS-mikrosatellit veya SSCP, SNP analizleri ile belirlenebilmektedir (Karaca vd 2002, Ince vd 2010b). Özellikle mononükleotit ve trinükleotit mikrosatellitlerin protein kodlayan bölgelerde bulunması bu tip mikrosatellitlerin gen regülasyonunda görev aldığını göstermektedir. Örneğin Metzgar vd (2000) trinükleotit tekrar dizileri üzerinde meydana gelebilecek mutasyonların kodon kaymasına (frameshift) neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca Meloni vd (1998) düzenli tetranükleotit [TCAT]₁₀ mikrosatellit motifinde meydana gelen azalma ile oluşan değişken [TCAT]₄[CAT][TCAT]₅ mikrosatellitin transkripsiyon regülatör elementi hareketini etkilediğini belirlemişlerdir.

Bu tez kapsamında düzenli mikrosatellit frekanslarının karşılaştırıldığında bazı doku, organ ve gelişme dönemlerine göre normalin altına veya üstünde frekanslarda bulunmaları mikrosatellitlerin oynadıkları rol, evrimsel önemleri ve gen ekspresyonundaki fonksiyonları, kromatin organizasyonu, hücre döngüsü, DNA metabolik işlemleri, replikasyon ilerlemesine katkıları, rekombinasyon ve mutasyonda işlevlerinin olduğu yönünde yorumlanmıştır (Tautz ve Renz 1984, Schlotterer ve Wiehe 1999, Timchenko ve Caskey 1999, Fahima vd 2002, Kashi vd King 2006).

Levdansky vd (2007) yaptıkları çalışmalarında kodlayan bölgelerinde mikrosatellit içeren genleri genomun oldukça dinamik unsurları olarak bildirmiştir. Ardışık tekrarlı diziler üzerinde meydana gelen rekombinasyonlar protein yapısını etkileyebilecek şekilde amino asit dizilimini etkileyebilecek tekrar sayısı değişikliklerine neden olabileceği belirtilmiştir. Bakteri ve mayada hücrede hücre duvarı proteinlerinin kodlayan bölgelerde bulunan tekrar sayılarındaki artışın immunogenesiti, adezyon ve patogenesis gibi olaylarla ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Hile ve Eckert 2000, Tian vd 2002).

Bu tez çalışması kapsamında da oluşturulan MVB ile *in silico* çalışmalardan elde edilen sonuçlarla daha önce yapılan çalışmalarla uyum içerisinde düzenli veya

değişken mikrosatellitlerde en yaygın mikrosatellit motiflerinin mononükleotitler olduğunu göstermiştir (Cohen vd 2004). Bu tez çalışmasından elde edilen veriler ile *Solanaceae* familyasına ait EST verileri ile birlikte değerlendirilerek sonuçlar yayınlanmıştır (Ince vd 2007). Ancak mikrosatellit motiflerinde meydana gelen tekrar sayılarındaki varyasyonlar üzerine bitki genomlarına ait veriler hayvan genomlarındaki kadar geniş ve yeterli değildir. Yalnızca *Arabidopsis* ve çeltik bitki genomlarında yapılan *in silico* çalışmalar daha detaylıdır. *Arabidopsis* ve çeltik genomunda yapılan bir çalışmada *Arabidopsis* genomunda en yaygın mikrosatellit motifinin [A/T] mononükleotit tekrar motif olduğu saptanırken çeltik genomunda en yaygın mikrosatellit motifinin dinükleotit [AG] tekrar motifinin en fazla görülen mikrosatellit motif olduğu belirtilmiştir (Lawson ve Zhang 2006). İnsan genomunda yapılan bir çalışmada da en yaygın mononükleotit motifinin [A/T] motif olduğu bildirilmiştir (Olivero 2003). Yine insan genomunda yapılan bir çalışmada [A] ve [G] mononükleotit motiflerinin en fazla görülen tekrar motifleri olduğu saptanmıştır (Hamada vd 1982).

Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda doku, organ ve gelişme dönemlerine özgü düzenli ve değişken mikrosatellitlerin dağılımı, mikrosatellit motiflerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan tüm çalışmalar mikrosatellitlerin kromozomlar ve gen bölgeleri üzerinde nerelerde bulundukları üzerinde yoğunlaşmıştır (Dresselhaus vd 1999, Cummings ve Zoghbi 2000, Morgante vd 2002, Yu vd 2004, Zhang vd 2004, Lawson ve Zhang 2006).

4.6. *In vitro* Analizlerinin Değerlendirilmesi

Öncelikli olarak *in silico* yöntemlerle yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların *in vitro* koşullarında laboratuvar ortamında teyit edilmesi amacıyla çalışmanın bu aşaması genomik DNA, RNA ve cDNA analizleri için yapılan araştırmalarda kullanılan yöntemler açıklanmış ve bu bulgular irdelenmiştir.

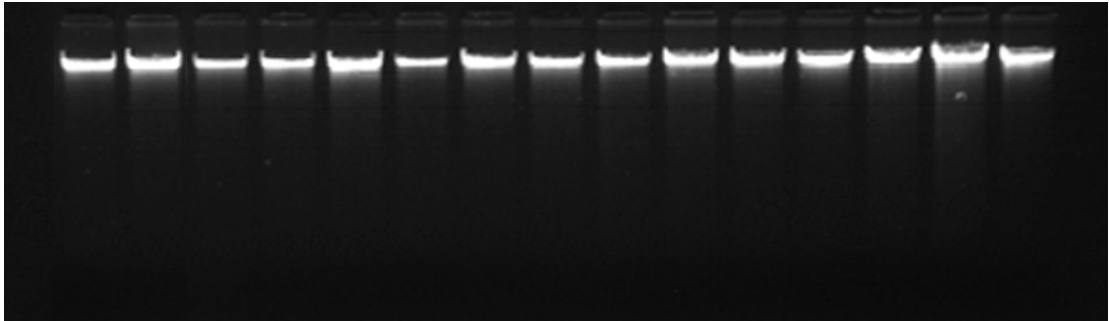
4.6.1. Genomik DNA izolasyonu ve normalleştirilmesi

DNA ve RNA materyalinin özellikle kalitesi ve sonra miktarı çalışmaların başarısını ve doğruluğunu doğrudan etkileyen önemli faktörlerin başında gelmektedir. Tez çalışmasının *in vitro* aşamasında materyal olarak kullanılan tüm bitkilerden genomik DNA izolasyonu Karaca vd (2005b)'e göre yapılmıştır. DNA ekstraksiyonunun ilk aşaması olan ezme aşamasında dokuların kolay parçalanması için sıvı azot ile dondurarak parçalama işlemi gerçekleştirilmiş, işlem sırasında PVPP ilavesi enzimsel faaliyetler ile ortaya çıkabilecek oksidasyonu önlemiştir. Dokular üzerine ekstraksiyon çözeltisi eklendikten sonra sorbitol yardımıyla osmatik basınç elde edilerek bitki hücre duvarlarının parçalanması sağlanmıştır. Tween-20 ve Triton X-100 deterjanlarının yayıcı yapıştırıcı özellikleri ile hücre membran proteinlerinin çözünürlüğünü arttırmıştır. BME kullanımı ise disülfid bağı içeren enzimlerin elimine edilerek oksidasyonun önlenmesini sağlamıştır (Ince ve Karaca 2009).

DNA ekstraksiyonunda ilk aşamada santrifüj gücüyle bazı hücre agregatları ve bazı pigment maddeleri uzaklaştırılmıştır. Lezyon aşamasında CTAB, Triton X-100, SLS deterjanları ile hücre duvarları, hücre içi agregatları ve hücre içi organellerinin kimyasal yolla parçalanması ve polisakkaritlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. LiCl ilavesi hem polisakkaritlerin hem de küçük RNA'ların uzaklaştırılmasında etkili olmuştur. Bu aşamada su banyosunda 35 dakikalık 65°C sıcaklık uygulaması kimyasalların etkin çalışmasını, hücre membran yapıları, polisakkaritler ve yağların çözünmesini sağlamıştır. CIA eklendikten sonra santrifüj gücü ile hücre kalıntılarının alt fazda protein ve polisakkaritlerin orta fazda ve nükleik asitlerin üst fazda ayrışması sağlanmıştır. Dikkatlice alınan üst faz içerisinde isopropanol konarak nükleik asitler yoğunlaştırılmıştır. Sonraki aşamalarda RNaz uygulaması ile RNA'lar uzaklaştırılmıştır (Karaca vd 2005b).

Genetik çalışmaların başarıya ulaşması için en kritik nokta kaliteli DNA ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesidir (Williams vd 1993, Weishing vd 1995, Vos vd 1995, Zhang vd 1999, Budak vd 2004). Yeterli miktarda ve kaliteli DNA ekstraksiyonu polisakkarit içeriği, sekonder metabolik, fenolik bileşik miktarları yüksek bitki türlerinde zorken (Loomis 1974, Jobes vd 1995, Suman vd 1999) bu tez çalışmada Karaca vd (2005b) tarafından geliştirilmiş olan CTAB tabanlı DNA ekstraksiyon metodu ile etkin ve başarılı bir şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyondan sonra kalite ve kantiteleri agaroz jel elektroforesiz ve spektrofotometrik analiz yöntemleri ile teyit edilmiştir.

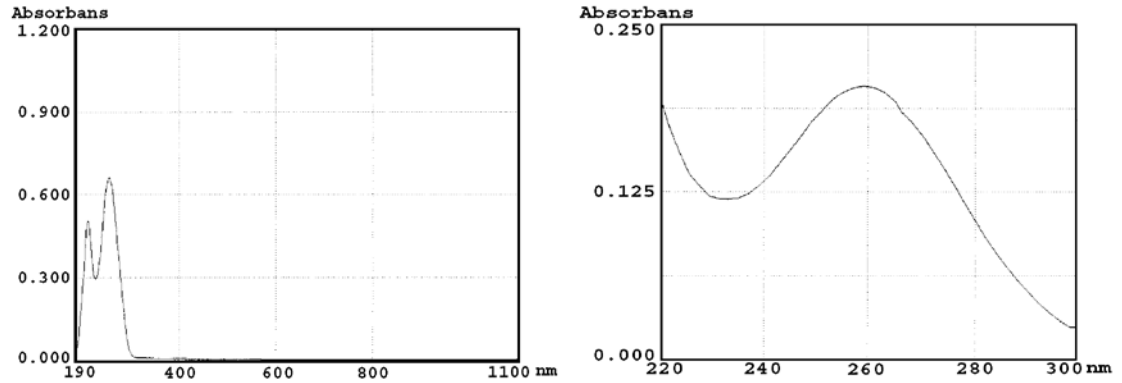
Bu çalışmada elde edilen DNA'larının kalitesi ve miktarını belirlemek için kullanılan ilk yöntem olarak agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Genomik DNA'lara ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.4'te verilmiştir. Genomik DNA'ların moleküler büyüklükleri oldukça yüksek (en az 30 kb ve yukarısı), kuyucukların boşluğu ile polisakkaritlerden arı ve RNA kalıntısının bulunmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Çalışmada kullanılan genomik DNA'ların agaroz jel elektroforesiz görüntüsü. Agaroz jelde soldan sağa sırası ile DS, PM687, BP225, BYE6788, C13, SA219, SA426, SA184, BP605, SA36, SA218, patlıcan, tütün, patates ve domates örneklerine ait genomik DNA'lar gösterilmiştir

Bu çalışmada DNA'ların kalite ve kantitesinin belirlenmesi amacıyla bir diğer yöntem olarak spektrofotometre analiz yöntemi kullanılmıştır. Ekstrakte edilen DNA'ların miktarı ($\mu\text{g/ml}$) $A_{260 \text{ nm}}$ 'de nükleik asit absorbands değeriyle, DNA için 50 olan varoluş katsayısı (ϵ) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla belirlenmiştir.

Genomik DNA'ların kalitelerinin belirlenmesi amacı ile spektrofotometrik ölçümü A_{190} nm ile A_{1100} nm dalga boyları dahil olmak üzere bu dalga boyları arasında kalan tüm dalga boylarında absorbans değerleri ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.4'de $A_{190-1100}$ nm ve $A_{220-300}$ nm arası okuma yapılan Demre Sivrisi biber DNA'sına ait spektrofotometrik ölçümleriyle ilgili grafikler gösterilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. DNA kalite ve kantitesinin spektrofotometrik analizleri. DS genomik DNA örneğinin $A_{190-1100}$ nm arası spektrofotometrik ölçüm grafiği (solda) ve $A_{220-300}$ nm arası spektrofotometrik ölçüm grafiği (sağda)

Kaliteli DNA göstergesi elde edilen miktarın yanında her türlü pigment maddesi, polisakkarit, protein kalıntılarının yanı sıra ekstraksiyonda kullanılmış kimyasallardan da arı olmalıdır. Örneğin Fenol A_{270} nm'de, Tween 20 A_{230} nm'de, GITC A_{250} nm'de, Triton X 100 A_{240} nm'de, Sorbitol $A_{220-230}$ nm arasında, Sarkosil, CTAB ve PVP $A_{200-240}$ nm arası pik veya omuz oluşturmalarıyla spektrofotometrik ölçümleri olumsuz etkileyebilmektedir.

Şekil 4.5'in incelenmesinde de görüldüğü gibi A_{1100} nm'den yaklaşık A_{400} nm'ye kadar herhangi bir okumanın olmaması pigment maddelerinin kalıntısının bulunmadığını göstermiştir. Bu aşamadan sonra A_{400} nm'den pikin düzenli bir şekilde yükselmesi, A_{280} nm'de herhangi bir omuzluluk olmaması protein kalıntısının olmadığını, A_{270} nm'de bir çıkıntının olmaması Fenol ve Fenolik madde kalıntısının olmadığını ispatlamıştır. Pikin A_{260} nm'de maksimum seviyesine ulaştıktan sonra orantılı bir şekilde düşmesi ve A_{230} nm'de oluşan pikin alt sınırının minimum düzeyde bulunması polisakkarit kalıntısının olmadığını bir göstergesi olmuştur. Ayrıca pikin A_{230} nm'den sonra tavan yapmadan uygun şekilde aşağı düşmesi $A_{260-230}$ nm arasında herhangi bir omuzluluk göstermemesi kimyasal kalıntısının olmadığını

kanıtlamıştır. Şekil 4.5’de ayrıca herhangi bir protein, polisakkarit ve kimyasal madde kalıntısı bulunmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca elde edilen pikin yükselme ve aşağı inme orantısının dengeli olması A_{260} nm’de pik maksimumunun sağa veya sola doğru kaymamış olması elde edilen DNA’nın kalitesi ile ilgili bilgi vermiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında kaliteli bir DNA’nın göstergesi elde edilen A_{260} nm, A_{280} nm ve A_{230} nm absorbans değerlerinin birbirlerine oranı olarak bilinmektedir. Spektrofotometrik ölçümlerin ardından yapılan hesaplamalarda A_{260}/A_{280} oranı 1.6 değerinin altında ise DNA’dan hala uzaklaştırılamamış konumda bulunan proteinlerin var olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca A_{260}/A_{230} oranının 2.0’ın altında olması polisakkarit varlığının bir işaretidir. DNA’nın A_{260}/A_{280} oranı 1.6 ve üzeri değerde olması, A_{260}/A_{230} oranının ise 2.0 ve üzeri değerde olması kaliteli DNA’nın varlığını göstermektedir. Çalışmada kullanılan bütün genomik DNA örneklerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve hesaplanmış olan A_{260}/A_{280} oranları Çizelge 4.51’de verilmiştir.

Çizelge 4.51. DNA örneklerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları

<i>Materyal Adı</i>	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	<i>Verim ($\mu\text{g/g}$)</i>
DS	0.477	0.280	1.700	238.30
PM687	0.494	0.296	1.669	246.80
F ₁	0.353	0.207	1.704	176.50
BP225	0.303	0.167	1.814	378.75
BYE6788	0.342	0.196	1.745	427.50
C13	0.359	0.215	1.670	448.75
SA219	0.157	0.089	1.764	196.25
SA426	0.623	0.347	1.795	778.75
SA184	0.293	0.157	1.866	366.25
BP605	0.447	0.273	1.637	558.75
SA36	0.242	0.140	1.726	302.08
SA218	0.266	0.142	1.871	332.08
Patlıcan	0.243	0.147	1.651	607.50
Tütün	0.183	0.105	1.733	849.20
Patates	0.142	0.082	1.728	457.50
Domates	0.137	0.083	1.640	355.00
10 F ₂ Bitki Ortalaması	0.429	0.235	1.828	214.50
10 F ₂ Bitki Ortalaması	0.331	0.193	1.715	165.50
10 F ₂ Bitki Ortalaması	0.780	0.426	1.832	390.00

Elde edilen genomik DNA'lerden spektrofotometrik ölçümler her bir DNA için 3 kez tekrarlanmış ve A_{260} okumaları ortalamaları ile A_{280} okumaları ortalamalarına dayanılarak elde edilen DNA örneklerinin kaliteleri belirlenmiştir. Çizelge 4.51'de görüldüğü gibi genomik DNA'ların A_{260}/A_{280} oranları kullanılan ekstraksiyon metodunun da gücünü ortaya koyarak genomik DNA tabanlı yapılacak her türlü analiz için kullanılabilir DNA'lar olduğunu göstermiştir.

Genomik DNA'nın kalitesi ve kantitesini gösteren önemli bir araç olan spektrofotometrik ölçümler ve agaroz jel elektroforesiz analizleri her ne kadar saflık, temizlik gibi kalite unsurları hatta miktar tayini gibi niceleyici özellikler hakkında bilgi verici düzeyde olsa da elde edilmiş DNA'ların enzimsel çalışmalarda tam olarak kullanılır olduğunu kanıtlamamaktadır. Genomik DNA'lardan 1 µg alınarak birkaç restriksiyon enzimi ile kesim yapılmış ve enzim çalışmalarına uygun olduğu tespit edilmiştir.

4.6.2. Çalışmada kullanılan farklı biber hat ve çeşitleri, türleri ve diğer *Solanaceae* familyasına ait bitki materyalleri

Bu tez çalışmasının hedeflerinden biri biber bitkisi için yeni mikrosatellit markırlarının geliştirilmesidir. Geleneksel mikrosatellit markırlarının en önemli sorunu olan farklı tür, cins ve familya düzeyinde kullanımının sınırlı olması nedeni ile geliştirilecek yeni mikrosatellit markır setlerinin biberde tür içi, türler arası, cins ve familya düzeyinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla Demre Sivrisi ve PM687, BP225, BYE6788, C13 (*C. annuum* L.) tür içi kontrol olarak, SA219 (*C. baccatum* L.), SA426, SA184 (*C. chacoense* L.), BP605 (*C. chinense* L.), SA36, SA218 (*C. frutescens* L.) örnekleri ise türler arası kontrol bitkileri olarak kullanılmıştır.

Solanaceae familyasına ait patlıcan (*Solanum melongena* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), patates (*Solanum tuberosum* L.) ve domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkilerinden de farklı örnekler alınarak DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada geliştirilen mikrosatellit markırlarının bu bitkilerde de kullanılabileceğinin teyidi için çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Demre Sivrisi biber çeşidi ve PM687 biber hattının melezlenmesi yoluyla elde edilen F₁ bitkisinin kendilenmesi ile elde edilmiş olan 38 F₂ bitkisi geliştirilen mikrosatellit markırlarının genetiksel özelliklerinin tespiti amacıyla kullanılmıştır.

4.7. Yeni Mikrosatellit Setlerinin (AGi) Geliştirilmesi

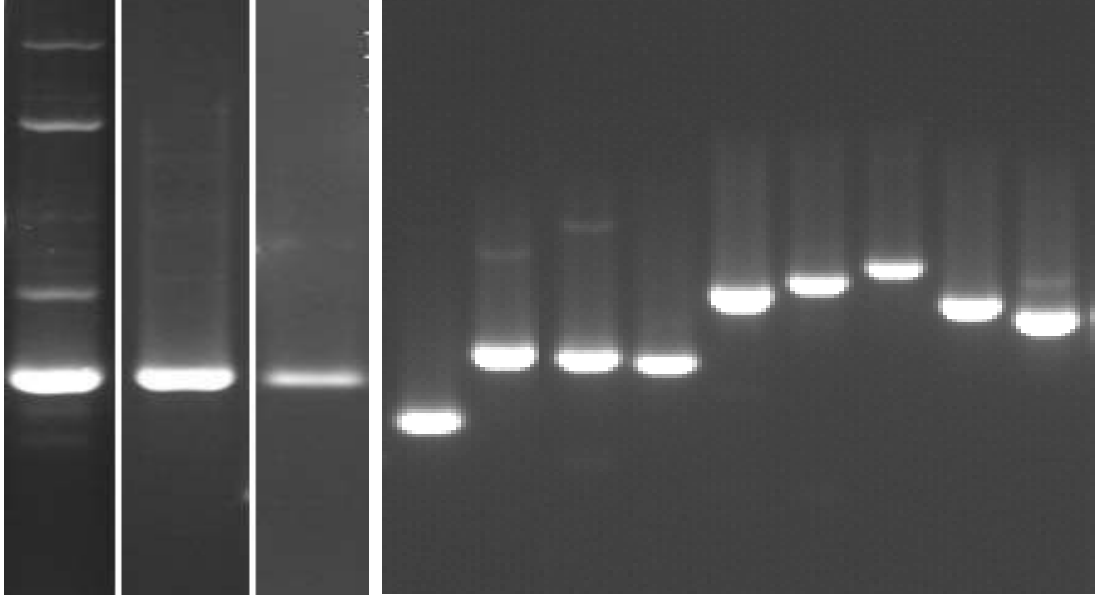
4.7.1. Optimum AGi amplifikasyon profillerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında geliştirilmiş olan AGi primer çiftleri (AGi primer setleri) bu tezin Materyal ve Metot bölümünde verilmiş olan 3 farklı amplifikasyon profili ve 3 farklı genomik DNA ve bir cDNA karışımı kullanılarak ön tarama çalışmalarına alınmıştır. Ön tarama çalışmalarında Demre Sivrisi (*C. annuum* L.), PM687 (*C. annuum* L.) ve SA36 (*C. frutescens* L.) gibi tür içi ve türler arası genetik ilişkiyi temsil eden farklı biber genomik DNA'ları kullanılmıştır.

Çalışmada en uygun amplifikasyon profilinde çalışan AGi primer çiftlerinin belirlenmesinde aşağıdaki kriterler kullanılmıştır:

- i) PZR ürününün oluşturmuş olduğu bant veya amplikon yoğunluğunun en belirgin olduğu,
- ii) Amplikon arka planının temizliği ve en belirgin olduğu,
- iii) Spesifik olmayan amplikonların bulunmadığı,
- iv) Aynı DNA'dan elde edilen amplikonların tekrarlanabilirliği,

özelliklerine göre en uygun amplifikasyon profilleri belirlenmiştir. Bu veriler ışığında AGi primer setlerinden 4 adedinin (%4.82) 66°C, 5 adedinin (%6.02) 64°C, ve 74 adedinin (%89.16) 60°C renatürasyon sıcaklarında en uygun amplifikasyon ürününü oluşturdukları belirlenmiştir. Şekil 4.6'te gösterildiği üzere düşük renatürasyon sıcaklığı spesifik olmayan amplikon oluşumuna, yüksek renatürasyon sıcaklığı ise yoğun olmayan amplikon üretmiştir. Çalışmada cDNA ve genomik DNA'ların amplifikasyonlarında kullanılan AGi primer setlerinin uygun amplifikasyon profillerinde kullanılarak elde edilen verilerin güvenilirliği artırılmıştır.



Şekil 4.6. AGi mikrosatellit setlerinin amplifikasyon profillerinin belirlenmesi. Şekilde (sol) 3 amplikon sırasıyla 55°C 60°C ve 66°C renatürasyon sıcaklarında PZR'ları gerçekleştirilmiş olan bir AGi primer setini göstermektedir. Diğer resim (sağda) optimizasyonu sağlanmış AGi primer setlerinin amplifikasyonlarını göstermektedir

4.7.2. AGi setlerinin oluşturduğu amplikonların belirlenmesi

Bu çalışmanın başlangıç aşamasında GenBank verileri kullanılarak toplam 300 adet primer seti için primer sekans verileri geliştirilmiş ve bu primer setlerinden 127 adedi ticari olarak sentezletilmiştir. Ancak literatür taramasında 127 primer setinin 44 adedinin daha önce yapılan çalışmalarda da belirlenmiş olduğu tespit edilmiş ve bu 44 primer seti analizlere dahil edilmemiştir. Demre Sivrisi (DS) çeşiti ve PM687 hattına ait genomik DNA'ların kullanıldığı tür içi analizleri temsil eden amplikon boyutları 101 ile 2000 bp arasında değişirken türler arası analizleri temsil eden DS çeşidi ve SA36 aksesyonu genomik DNA'larının kullanıldığı analizlerde 105 ile 2000 bp arasında amplikon büyüklüğü elde edilmiştir (Çizelge 4.52). *Solanaceae* familyasına ait domates, tütün, patates ve patlıcan genusların genomik DNA'ları üzerinde ise 105 ile 3000 bp ve üzerinde amplikon büyüklüğü elde edildiği saptanmıştır.

Demre Sivrisi çeşiti ve PM687 hattına ait genomik DNA'lar üzerinde taranan 83 adet primer setinden %24.10'luk bir oranla polimorfik sonuç alınmıştır. Tür içi polimorfik sonuç alınan primer setlerinin tekrar içeriği incelendiğinde dinükleotit

mikrosatellit motif [CA/AC/TG/GT] içeriğine sahip mikrosatellitlerin %42.86'lık bir oranla en yüksek polimorfizm yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan [AT/TA] içeriğine sahip dinükleotit mikrosatellitlerin polimorfizm düzeylerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiş ve bu bulgular dinükleotit motifli mikrosatellit primer setleri hazırlanırken [AT/TA] motifi içeren mikrosatellit DNA'larından mikrosatellit primer setlerinin az sayıda hazırlanması veya hiç hazırlanmaması gerektiğine işaret etmektedir. Ancak monomorfik amplikon paterni gösteren [AT/TA] motifli primer setleri CAPS-mikrosatellit tekniğinin polimorfik sonuç elde etmek için kullanılabilmesi monomorfik amplikon paterni oluşturmaya yatkın olan [AT/TA] mikrosatellit motifinin bulunduğu lokuslar polimorfizme dönüştürülebilmektedir (Ince vd 2010b).

Tür içi analizlerde trinükleotit mikrosatellitlerde ise [CAA/AAC], [CTG] ve [TCA] (%22.22) motiflerinin eşit oranda dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Trinükleotit motifli mikrosatellitlerin polimorfizm düzeylerinin daha düşük olmasının nedeni protein kodlayan bölgelerde trinükleotit mikrosatellit motiflerinin daha fazla oranda bulunduğu ve bu bölgelerin korunmuş olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Ince vd 2010b).

Tetranükleotit, pentanükleotit ve hekzanükleotit tekrar içeriğine sahip mikrosatellitlerde ise tamamının eşit oranda dağılım gösterdiği, göze çarpan bir tekrar motifinin olmadığı tespit edilmiştir. Pentanükleotit ve hekzanükleotit motifli mikrosatellitler biber genomunda bulunmalarına rağmen bu motifleri temsil edecek mikrosatellit primer çiftlerinin primer dizayn kriterlerine uymaması nedeni ile AGi primer setlerinde az miktarda bulunmaktadır. Biber EST'lerinde olduğu gibi hekzanükleotit motiflerin insan ve *Arabidopsis* EST'lerinde fazla miktarda bulunmaktadır (Bilgen vd 2004, Karaca vd 2005a). Bu çalışmada hangi tip hekzanükleotit ve pentanükleotit içeriğinin tür içi analizlerde daha polimorfik olduğu yönünde karar verilememesinin tam nedeni ise Çizelge 4.52'de gösterildiği üzere bu tekrar içeriklerinden yalnızca her birinden birer adet polimorfik sonuç vermelerinden kaynaklanmıştır.

AGi primer setleri dizayn edilirken bu çalışmada mononükleotit motifli mikrosatellitlerin kapılar jel elektroforesiz yöntemi kullanılmayacağı için oluşturulmamıştır. Ancak biber EST verilerinde bol miktarda mononükleot motifli bulunmakta olup kapılar elektroforesiz sisteminin kullanılabilmesi ile bu motife ait çok sayıda primer çifti belirlenebileceği tespit edilmiştir.

Türler arası yapılan analizlerde ise Demre Sivrisi (*C. annuum* L.) ve SA36 (*C. frutescens* L.) türlerinin genomik DNA'larında 83 adet primer setinin oluşturduğu ampliconlar değerlendirildiğinde türler arası 47 (%59.26) adet primer setinin intergenik düzeyde polimorfik sonuç verdiği 36 (%40.74) adet primer setinde ise monomorfik sonuç alındığı saptanmıştır. Demre Sivrisi ve SA36 türlerinin genomik DNA'larında en yüksek polimorfizm %40.43'lük oranla trinükleotit mikrosatellit motifli içeren primer setlerinde saptanmıştır. İkinci sırada %27.66'lık polimorfizm oranı ile dinükleotit mikrosatellit motifli bulunduran primer setlerinden polimorfizm elde edildiği belirlenmiştir. Hekzanükleotit mikrosatellit motifleri ise %14.89'luk polimorfizm yüzdesi oluşturmuştur.

Türler arası yapılan analizlerde dinükleotit mikrosatellit motif [CA/AC/TG/GT] içeriğine sahip mikrosatellitlerin %53.85'lik bir oranla en yüksek polimorfizm yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir. Trinükleotit mikrosatellit motifli içeren primer setleri içerisinde en yüksek oranda (%26.32) [AAG/GAA/CTT/TTC] mikrosatellit motifini bulunduran primer setleri ve ardından [AGA] (%15.79) mikrosatellit motifini içeren primer setlerinin polimorfik sonuç verdiği saptanmıştır. Bu tip mikrosatellitlerin genellikle amino asit kodlamayan ancak transkripsiyon sonucu oluşturulan mRNA'nın UTR bölgelerinde bulunuyor olması polimorfik sonuçların elde edilmesine neden olmuş olabilir (Cummings ve Zoghbi 2000, Bilgen vd 2004, Karaca vd 2005a). Tekrar motifli [AAG/CTT] *Arabidopsis* ve pamuk (*Gossypium* spp.) bitkilerinde en yaygın gözlenen trinükleotit motifleri olarak bilinmektedir (Cardle vd 2000, Park vd 2005). Ayrıca EMBL (European Molecular Biology Laboratory) veri bankasında bulunan *C. annuum* EST'lerinde en yaygın trinükleotit mikrosatellit motiflerinin [AAG/CTT] mikrosatellit motifleri olduğu Portis vd (2007) tarafından da belirtilmiştir.

Tetranükleotit motifli mikrosatellitlerden [TAAA] tekrarını içeren mikrosatellitler diğer tetranükleotit içeren mikrosatellitlere oranla daha fazla polimorfik sonuç (%40) göstermiştir. Bu durum büyük bir olasılıkla [TAAA] tekrarını mikrosatellitlerin TAA (UAA) stop kodonu oluşturması nedeni ile genlerin 3'UTR bölgelerinde bulunmasından kaynaklanmış olabilir.

Genlerin 5'-UTR ve 3'UTR bölgelerinde bulunan mikrosatellitlerin amino asit kodlayan bölgelerde bulunan mikrosatellitlere göre daha polimorfik sonuç verdiği *Arabidopsis*, çeltik, insan ve fare genomları üzerinde yapılan çalışmalarla da görülmüştür (Lawson ve Zhang 2006, 2008). Ayrıca Portis vd (2007) tarafından EMBL veri bankasında bulunan *C. annuum* EST verileri üzerinde en yaygın tetranükleotit mikrosatellit motifinin [AAAT/TAAA] olduğu bildirilmiştir. Pentanükleotit ve heksanükleotit mikrosatellit motiflerine sahip primer setlerinde dağılım eşit oranda gerçekleşmiştir.

Biber gen kaynaklarının korunması ve genetik farklılıklarının belirlenmesi gibi ıslah çalışmalarında morfolojik ve moleküler düzeyde çok farklı markır teknikleri kullanılmıştır (Prince vd 1993, Rodriguez vd 1999, Baral ve Bosland 2004, Guzman vd 2005). Dizayn edilen 83 adet primer setinden 47 (%59.26) adet primer setinden ise *C. annuum* L. ve *C. frutescens* L. türleri arasında polimorfik sonuçların alınması yakın akraba olan bu iki türde (Ince vd 2009, Ince vd 2010a) *Capsicum* türleri arasında ayırım ve analiz çalışmalarında AGi primer kullanılabileceğini göstermiştir.

Portis vd (2007) EMBL veri bankasında bulunan *C. annuum* EST verilerini kullanarak dizayn ettikleri toplam 348 adet primer setinden yalnızca 49 adeti (%12.76) için türler arası polimorfik sonuç alabilmeleri ve Yi vd (2006) *C. annuum* EST verilerinden dizayn ettikleri 850 primer setinden yalnızca %18.7'sinin türler arası polimorfik sonuç vermesi, Min vd (2008) tarafından *C. annuum* EST verileri kullanılarak yaptıkları çalışmalarda *C. annuum* türüne ait iki çeşit arasında yalnızca %4.3'lük polimorfizm oranı yakalayabildiklerini belirtmiş olması biberde tür içi ve türler arası ıslah çalışmalarında AGi primer setlerinin kullanımının katkılar sağlayacağını göstermiştir.

Çizelge 4.52. AGi mikrosatellite primer setleri ve amplifikasyon özellikleri

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi001	GCCTTACTATCTCCCCTGCTC	[TCT]7	60	180	1200	P	M	1200	M	1200
	CCTTTGCCATTTCTTCTCTCA									
AGi002	TGCCTTACTATCTCCCCTGCT	[TCT] ₇	60	245	1572	P	M	1572	M	1572
	GGTCCAAGTTCTCCTTTCTCG									
AGi003	TGTCCCAACTTTCACCTGCT	[CTTC] ₄	60	165	165	M	M	165	P	165 180
	GGGGTTTTCTTCTACCTCCTGA									
AGi004	CTTGTTGGTGAGGGTTGATTC	[AT] ₁₂	60	271 281	271 281	M	M	271 281	P	275 285
	CAGCAGAAGGCACAGGTTC									
AGi005	GGTTTTGGTGGTTGTTTTCC	[TGCAAA] ₄	66	295	295	M	M	295	P	285
	GAGTTTGTGGCTGCTGACC									
AGi007	CGGTCACTGGAACATAACAACCT	[AATT] ₄	60	306	306	M	M	306	M	306
	CCAACGCTACTGATGTGTGG									
AGi008	TGATGCTGCTGAACTTAGAAAC	[AT] ₁₀	60	258 248	258 248	M	M	258 248	P	380 240
	CTGAATCCGCCTCTGTTG									
AGi009	GAGGCTTTTTAGCAGGGTGA	[GATT] ₅	60	209 165	209 165	M	M	209 165	P	214 165
	GCAGACAACCTTCGCATCTACA									
AGi010	CGTCATCCATTTTTCTCAAC	[TTCGGG] ₄	60	320 305 290	320 305 290	M	M	320 305 290	P	320 280
	GCATTACACAGCAATACCAG									
AGi012	CTTCATCTTCAACGCTCCTT	[AAAAAT] ₄	60	271	271	M	M	271	P	265
	TTGCTTCACTATGCTACACACTC									
AGi013	CCCTTCTCTGCTTTGTCAGG	[ACACAG] ₅	60	270 264 170 164 158	270 264	P	P	266	P	290
	GTGGTGTGCTCGTCGTCT									
AGi014	GCTCCTACATAACTAATACCCACA	[AT] ₁₃	64	309	309	M	M	309	P	305
	TGTTCTTCATCGCCTTCTT									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi015	TCACAGAACAACGGGAAAAA	[AAAG] ₄	60	190	190	M	M	190	P	200
	GGCGATAACCTTGCCTGA									
AGi016	ATTCGCCCCAAGATGAAAAAC	[AATT] ₅	60	165 161	165	P	M	165	M	165
	GAGATGCTGTTTCGTGACTGC									
AGi019	TTCTATGACAAGGGGGTTGC	[AAG] ₇	60	325	729	P	M	729	M	729
	TCTTTGCTGTTCCATCCTCA									
AGi020	ATTTGGGATGCGGTGACTG	[AAGG] ₄	60	163	163	M	M	163	M	163
	TCTTTCGTTTCTGCGTCTTGA									
AGi021	GCCGTTGAGAGAGATGAGAC	[TTTA] ₄	60	295	295 285	P	M	295 285	P	295
	AGGGACTGACACGACCAA									
AGi023	GCAAAAAGCGAATCCTACCA	[CAA] ₇	60	337 327	337 327	M	M	337 327	P	347 327
	TGCGAAATCCATCACAAAGA									
AGi026	GGCTGTGGTGAGTTTCTTCC	[ACC] ₇	64	363	363	M	M	363	P	Y
	TTTGTCTTCTGTTCTTGGCTA									
AGi027	TCGTGCGTCTATTGCTCTG	[TTTA] ₄	60	284	294 284	P	M	294 284	P	284
	TCCATCCATAACATCGGGTA									
AGi028	ACTTTGCCCCCTCATTTCTT	[CTGCTC] ₄	60	321	1095	P	M	1095	M	1095
	CCGCTGGCTCTACTGTTTCT									
AGi029	CAAAACTTGACCGCTTCCTC	[ATCA] ₄	60	310	310	M	M	310	M	310
	CTCGGACCTTTAGAACAGCAG									
AGi030	CGAGGCTTTTCTTCCCTATC	[CA] ₁₁	60	356 344 342	356 344	M	P	364	P	348
	GCCCGTTTGATTTCTTTGA									
AGi031	TCCGACCTGTTATGGGATTT	[AGA] ₇	60	216	216	M	M	216	P	226
	AGCGGGTTGAGAGAGTTGAG									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi032	CTCTCTCTCTACAACCCAAAA	[CTT] ₁₀	60	287	1500 500	P		Ç	P	Ç
	CTAAGGAGGACGAAGAACC									
AGi033	CGGGTCGTAGTCAAGAACAAG	[CAA] ₉	60	250	250	M	P	240	P	250
	CCTCTCAACCAAGCCAAACT									
AGi038	TGATGAAGGTGGTGGTGAAG	[GAAGAG] ₄ [TGA] ₇	60	290 280 262	290 280 262	M	M	290 280 262	P	285 275 262
	TGTGTGTGAAGGAGATTTAGCC									
AGi039	CGGCGAAGAGATGGAAGT	[CCCGAA] ₅	60	240 219 208	240 219 208	M	M	240 219 208	P	215 208
	AGCAGGTTGGGTTTCTGG									
AGi040	ACTGTTTGCCCATGAGAA	[CGTGAC] ₄	60	369	1607	P	P	Ç	P	Ç
	CCTGTCCTTGTCCTTGTCTT									
AGi041	GGGGAAGAGAAAAGCCACA	[TA] ₁₅	60	221 165 146	305 292 146	P	M	305 292 146	P	315
	CTGAAACAGCCTTGACATTCG									
AGi042	CTCATCAACCCACCTTCATCA	[AAC] ₇	66	294	294	M	P	289	P	282
	TTTTCGGAGACGGAGCAG									
AGi043	CTCACAACCTTCGGCTCTT	[GT] ₁₀	60	265	265	M	M	265	P	260
	AGGCTCTTCAGCACACTT									
AGi044	GCACACACAGCATCATCGT	[CT] ₁₀	60	151	1609	P	M	1609	M	1609
	TCTTACACAGCCTTACCTCGTG									
AGi045	CCAATCGTCAAACAACAACCT	[CAA] ₇	66	268	268	M	M	268	P	273
	AGGAGGAGGAGGGAGAGATG									
AGi046	TGTTTTCCCTGTTTCCAATC	[TAA] ₇	60	371 368	368	P	M	368	M	368
	AACCCATCATTTCTCTGTGG									
AGi047	CGGTTGGTTCTCTGTATTATTC	[TTCT] ₅	64	251	251	M	M	251	M	251
	AGCACTGTCTCAAGTCCATC									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi048	TATCATCAGCCCTCCTCGTC	[TTC] ₇	60	181	181	M	M	181	M	181
	CCTTACCCGTTTACCCACATC									
AGi049	TCCCACCAATCTCTCGCTAC	[CCTCT] ₄	60	255	1634	P	P	Ç	P	Ç
	CTTCACTAAGAACCACCTCAACG									
AGi051	TCCCATTTCCCTTCCTTC	[CTTC] ₅	60	225 180	955 500	P	M	955 500	M	955 500
	ATCAATCACCTTTCTGCTAACC									
AGi052	CCGACCTGTTATGGGATTTC	[AGA] ₇	60	215	215	M	M	215	P	225
	AGCGGGTTGAGAGAGTTGAG									
AGi053	GGCTCGTTATTTCCCCAACT	[AT] ₁₀	60	399	1250	P	P	Ç	P	Ç
	CCCAAACCACTATTTTCGTATGC									
AGi054	CAGTGTGCGATTTTCAACA	[TTC] ₇	64	184	184	M	M	184	P	190
	GGAGCAGAGAGGGTGAGA									
AGi055	CTTTGCTTTGTCCATTTTCG	[AAAACA] ₅	60	251	251	M	P	256	P	262
	TCTGGTCTTCTTGGGAATCA									
AGi056	TTGGAACCGAACCCTAAT	[AGA] ₉	60	240	240	M	M	240	M	240
	CTTCTCGTCCCTCTTCTTCT									
AGi057	GCTATCATCACTTCCATTTC	[ATT] ₈ [AAG] ₆	60	167	167	M	M	167	M	167
	TGGGGTATTCTCATAAAGG									
AGi060	GGGAAGTATTGGTGAACAT	[ATA] ₇	60	358	750	P	M	750	M	750
	TAGGGCTTTTGCTCTCTT									
AGi062	TGAATCGTTGAAGCCCATTA	[TCT] ₈	66	330	1642	P	M	1642	M	1642
	CAGGCACAAATCCAAGGTC									
AGi064	CTTCTCGTTATCAGCACACT	[TC] ₁₅	64	172 170 166 164	1429	P	M	1429	P	1429 1400 1380
	AGCATCTCCATCTTGACTG									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi065	ATCTTGCTTCCACAAACCCTAT	[TAAT] ₅	60	188	188	M	M	188	M	188
	GTTGCTTTCCCCCAATGA									
AGi068	GACTTGCTGTCGTTTGTG	[TTG] ₈	60	342	342	M	M	342	P	337
	GGGAGAGAGGATAAGGATTGTG									
AGi070	CGCATATACATACATAAAATTCTT	[CT] ₁₄	60	269 259	269 259	M	M	269 259	M	269 259
	ATCATCACCTAGCTTTCCTA									
AGi071	TGACCAACAAAAGGTGAAGAAA	[CCACGA] ₄	60	288	559	P	M	559	M	559
	TGCGTCAATTGAAGTTGTGTT									
AGi078	TCTTCTCATTTCTCCCTTCACAC	[CA] ₁₁	60	260 250	260 250	M	P	270	P	245
	GCTCAAGAGCCATGACAGC									
AGi080	TTGGTTTCAATTTTATTTCTCCATT	[CAT] ₇	60	112	112	M	M	112	P	100
	GAAAGATTAAAAACCTGGGTGCT									
AGi083	ATCCAGGGAGGAAGAGAACG	[CAT] ₆	60	150	972	P	M	972	M	972
	GCATCAAGACCCACCATCAG									
AGi086	AGTCCTTGCCGATGTTGAAG	[CTG] ₁₃	60	180	180	M	P	185	P	170
	GCAGCAGCAGTTAACCATGA									
AGi088	AAATATCCACTTCCCCATTATCC	[CT] ₁₁	60	250	600	P	M	600	M	600
	TCTGAGCTTCGCAAACGAT									
AGi090	CTTCTCGTTATCAGCACACTATC	[TC] ₁₅	60	272 270 266 264	2000	P	M	2000	M	2000
	TACATGGAAGCCATGAAGTC									
AGi091	CTCGTTATCAGCACACTATC	[TC] ₁₅	60	262 260 256 254	1600 800	P	M	1600 800	M	1600 800
	GAGCATCTCCATCTTGAC									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türü, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi092	ACCACTACTTCCGTCGCTGT CCATTGCCATACCACCACTA	[CAT] ₈	60	280 260 240	700	P	M	700	M	700
AGi094	TCTATCTTAATATACCTATACATACGC GAAATCGATCAACATCTCAC	[CT] ₁₄	60	156 146	156 146	M	P	152	P	158
AGi095	TGGATTTTCATCTCATGGTTTG CCAGGATCATCAGGGTCAAT	[CAT] ₉	60	280 270 140	1000	P	M	1000	M	1000
AGi096	GGGAAGAGAAATTGTGAAAGCA ATGCCAACAATGGCATCCTA	[CAT] ₇	60	160	160	M	P	135	P	125
AGi098	TTCCGAGATTGACACACTGG AGCAACTTCAGCAGCAACC	[AGA] ₁₂	60	274	274	M	P	277	P	280
AGi100	TTCCTTCACACCCACAACC ACTTTCTTGCTTTACCACCAG	[TTC] ₁₀	60	122	400 122	P	M	400 122	P	400 130
AGi101	TGAGGAGACAAACTTCAACTGG GATGAGGACAAAACCAAGGACT	[TCA] ₁₄	60	181	181	M	P	164	P	170
AGi102	ACGGCAGGTTGTTGAGAAGT GACACCAGAGTTTTTCCCCTAA	[GGA] ₁₄	60	219	1297	P	M	1297	M	1297
AGi103	AGCGACAGAGTCAGAGAGAAGA GGTGAATGAAGCAAAAAGCA	[AG] ₁₉	60	289 270	289	P	M	289	M	289
AGi104	GTCCTTGCCGATGTTGAAG CAAAGCAGTGAAAAATGAGTGC	[CTG] ₁₃	60	399	399	M	P	395	P	385
AGi105	CGAATGTCAAGGCTGTTTCA CGTCATCGTCCTCGTCCT	[GAA] ₁₂	60	282	1421	P	M	1421	M	1421
AGi108	TGAACGGTGGAGATTTGAA GCTGCTGTTGATGATAGTAAGG	[CAA] ₁₂	60	192	192	M	M	192	M	192

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

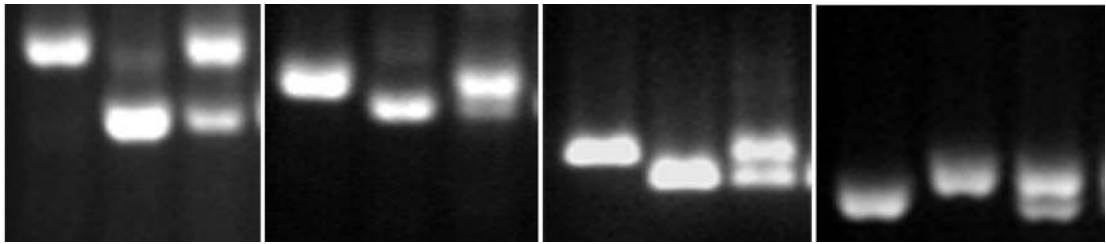
Çizelge 52. Devamı

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Tekrar İçeriği	Profil	DS-cDNA	DS	C*	Tİ	PM	TA	SA
AGi110	ACCCACCACAGATAAAGTTGCT	[TCA] ₁₃	60	122	122	M	M	122	M	122
	CTGCTTCCATCCTCCTCTCA									
AGi111	CTGCCCTCCTCAACCCTAA	[CT] ₁₃	60	332	700 332	P	P	700 337	P	327
	CGGTCACCTGGACTCTGATGTT									
AGi112	CGTAGACCGACCCACTTGTC	[ATC] ₁₆	60	249	249	M	M	249	P	239
	GTAAGGGCAAACAGCAGCAG									
AGi113	AGGGCAAGAGTGTTAGATGTTTC	[CAA] ₁₄	60	205	205	M	M	205	P	195
	GATGATGCTGATGGTGGAGT									
AGi115	CGTCTTTCACTTGTCTTTTG	[TCA] ₁₀	60	388	388	M	P	396 388	M	388
	TAGCCTCTTCCTGTAGTTCC									
AGi117	CCCCTCTCCCTCTCTCTTCC	[TTTC] ₄	60	312 302 290	1294	P	M	1294	P	1190
	CTGATGCTGGTGATGCTGTG									
AGi118	GCACGGATAAAGGCAAACAA	[TCT] ₇	60	210	210	M	M	210	M	210
	GGAGTAGGGGCAGCAAAGAC									
AGi120	CGTTGAAAAGAGGAAAAAGG	[TTTTTC] ₄	60	200	200	M	M	200	M	200
	TGACCAAGTGACGCAAAC									
AGi121	AACACGCCAAGAAAATCATC	[CA] ₁₅	60	162	162	M	P	170	P	155
	TGGAGACCTGAGCCATTG									
AGi124	GACGAGGGGATTATGTAGCA	[AT] ₁₄	60	317	317	M	P	310	M	317
	TATTCAGGGGAGGTGAGAAA									
AGi126	GAAGTGGGCTGTCCCTATCT	[TGA] ₂₂	60	196	196	M	M	196	M	196
	TTATCAACTCCAAACCCCTTAG									
AGi127	ACTGGAAGACCAAGAGAGGTG	[AT] ₁₆	60	101	101	M	M	101	P	105
	TTGACAGGAGTTGAGTAATAGATGG									

Profil: İndirgemeli PZR amplifikasyon profili, A, B ve C. DS: Demre Sivrisi, PM: PM687 ve SA: SA36. C*: DS-cDNA ve DS-gDNA arası farklılık. Tİ: türüçi, TA: türlerarası. M: monomorfik allel, P: polimorfik allel Y: amplifikasyon yok, Ç: amplifikasyon çoklu bant. Allel büyüklükleri yaklaşık baz uzunluğu olarak verilmiştir

4.8. Mikrosatellit Setlerinin *Solanaceae* Familyasına ait Bitkilerde ve Seçilmiş F₁, F₂ Bireylerinde Uygulanması

C. annuum türüne ait Demre Sivrisi çeşidi ve PM687 hattının melezlenmesi sonucu elde edilmiş F₁ bitkisi ve tek bir F₁ bitkisinin kendilenmesi ile oluşturulan F₂ bitki populasyonundan seçilmiş 38 bitki kullanılmıştır. Seçilmiş AGi primer setleri DS, PM687 ve DS x PM687 melezine ait genomik DNA örnekleri kullanılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Bazı AGi mikrosatellit setlerinin ebeveynler ve F₁ amplifikasyonları. Resimde sırasıyla DS, PM687 ve DS x PM687 melezinin AGi036, AGi107, AGi096 ve AGi030 primer setinin oluşturduğu ampliconlar

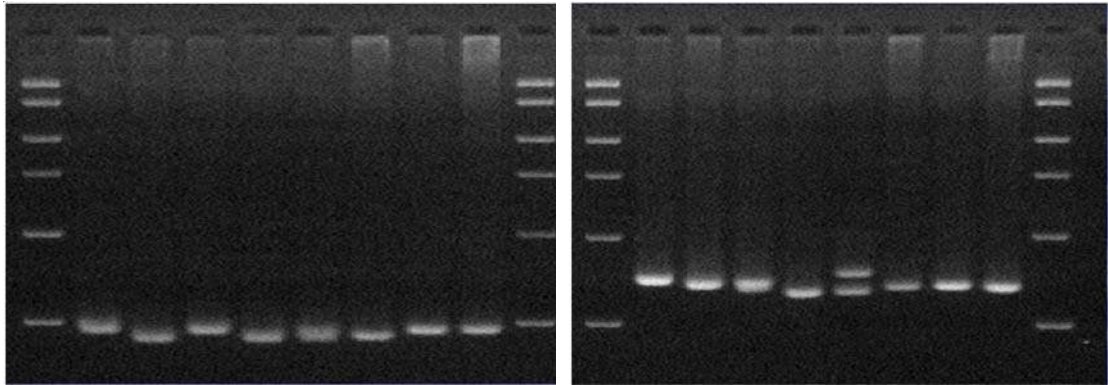
Şekil 4.7’de gösterildiği üzere DS, PM687 ve DS x PM687 (F₁) örneklerine ait genomik DNA’lar AGi primer setleri kullanılarak analiz edildiklerinde AGi primer setlerinin homozigot dominant (AA), homozigot resesif (aa) ve heterozigot (Aa) bireyleri kolayca ayırt edebilecek genetik bilgiyi gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu bağlamda AGi markırlarının ko-dominant özellikte olduğu ve bu özellikleri ile genetik haritalamalarda, hibrit ve genetik karışıklıkların belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılabilirlikleri gözlenmiştir.

Biber bitkisi diğer kültür bitkileri ile kıyaslandığı zaman üretime sunulan çeşitlerin genellikle sayıca az ve belirli ebeveynlerin kullanılmasından dolayı genetik tabanı dardır (Adetula 2006). Bu nedenle genetik tabanın genişletilmesi için başka biber türlerinin ebeveyn olarak kullanılarak ticari öneme sahip biber çeşitlerine yeni özellikler kazandırılması gerekmektedir. Bu amaçla geçmişte QTL ve genetik haritalama çalışmaları yapılmış ve hatta günümüzde de yürütülmektedir (Prince vd 1993, Carante vd 2002, Ben-Chaim vd 2003). Bu çalışmada seçilmiş bazı AGi primer

setlerinin biberde genetik haritalama çalışmalarında kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Aralarında biber bitkisinin de yer aldığı birçok kültür bitkisinde genetik haritalama çalışmalarını kısıtlayan birkaç faktör bulunmaktadır. Bunlar:

- i) Markır sayısı,
- ii) Polimorfik markır sayısı,
- iii) Distorted segregasyon,
- iv) Rekombinasyon,
- v) Fonksiyonel markırların azlığı,

gibi nedenler yer almaktadır. Yukarıda sıralanan faktörlerden yeterli sayıda markır sayısı ve polimorfik markır sayısı yeni markır sistemlerinin geliştirilmesi ile giderilecek sorunlardandır. Bu çalışmada belirlenen AGi primer setlerinin türler arası ve tür içi çalışmalarda kullanılabileceği ve yüksek oranda polimorfik oldukları görülmüştür (Şekil 4.8 ve 4.9).



Şekil 4.8. AGi primer setlerinin *Capsicum* türlerinde uygulaması. Seçilmiş AGi mikrosatellit primer setlerinin bazı *Capsicum* türlerinde kullanılabilirliğinin araştırılması

Çalışmada belirlenmiş olan AGi primer setlerinin polimorfizm bilgi içeriğinin (PIC) belirlenmesi için rastlantısal seçilen AGi primer setlerinin türler arası ve F₂ bireyleri arasındaki PIC değerleri incelendiğinde yüksek polimorfizm bilgi içeriklerine sahip oldukları görülmüştür. Örneğin AGi098, AG103, AGi124 nolu primer setlerini polimorfizm bilgi içerikleri 0.875, AGi104 nolu primer seti için 0.852 olarak belirlenmiştir. AGi030 primer setinin F₂ bitkileri için gösterdiği PIC değeri

0.499 olarak hesaplanırken AGi107 primer setinin gösterdiği PIC değeri 0.497 olarak bulunmuştur. AGi096 primer setinin F₂ bitkileri için gösterdiği PIC değeri 0.500 olarak bulunmuştur. Bu PIC değerleri birbirine çok benzerlik gösteren iki ebeveyninin F₂ bireylerinde alınan değerler olması nedeniyle oldukça yüksek değerler olduğu dikkat çekmektedir. Portis vd (2007) yaptıkları çalışmalarında *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* türlerine ait aksesyonlar üzerinde dizayn ettikleri 348 primer setinden yalnızca 49 adedinde polimorfik sonuç alırken polimorfik olan 49 adet primer setinin hesaplanan PIC değerleri 0.24 ile 0.86 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. AGi primer setleri ile F₂ populasyonu üzerinde alınan PIC değerleri ortalaması 0.645 olarak tespit edilmiştir.

Genetik haritalamalarla belirlenen markırların rekombinasyonla sentenisinin değişmesi haritalamaya alınacak genotiplerin ve harita birimine daha fazla markır konumlaması ile giderilebilmektedir. Distorted segregasyon ise bir populasyonda beklenen segregasyon ile gözlenen segregasyon arasındaki sapmadır. Çalışmada seçilen AGi primer setlerinin distorted segregasyon oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacı ile geleneksel ki-kare analizleri uygulanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre dizayn edilen ve polimorfik sonuç veren AGi primer setlerinin distorted segregasyon oluşturmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.9).

AGi030 primer setinin F₂ bitkileri üzerinde gösterdiği segregasyonu belirlemek için yapılan ki-kare uygunluk testinde ($\chi^2=0.850$, $P=0.6538$) olarak belirlenmi istatistiksel olarak Mendel kuralları çerçevesinde 1:2:1 oranında açılım gösterdiği tespit edilmiştir. AGi107 primer setinin ise ki-kare uygunluk testinde ($\chi^2=3.560$, $P=0.1686$) olarak belirlenmiş istatistiksel olarak Mendel kuralları çerçevesinde 1:2:1 oranında segregasyon gösterdiği saptanmıştır. AGi096 primer setinin ise ki-kare uygunluk testinde ($\chi^2=0.270$, $P=0.8737$) olarak hesaplanmış istatistiksel olarak Mendel kuralları çerçevesinde 1:2:1 oranında açılım oluşturduğu görülmüştür.

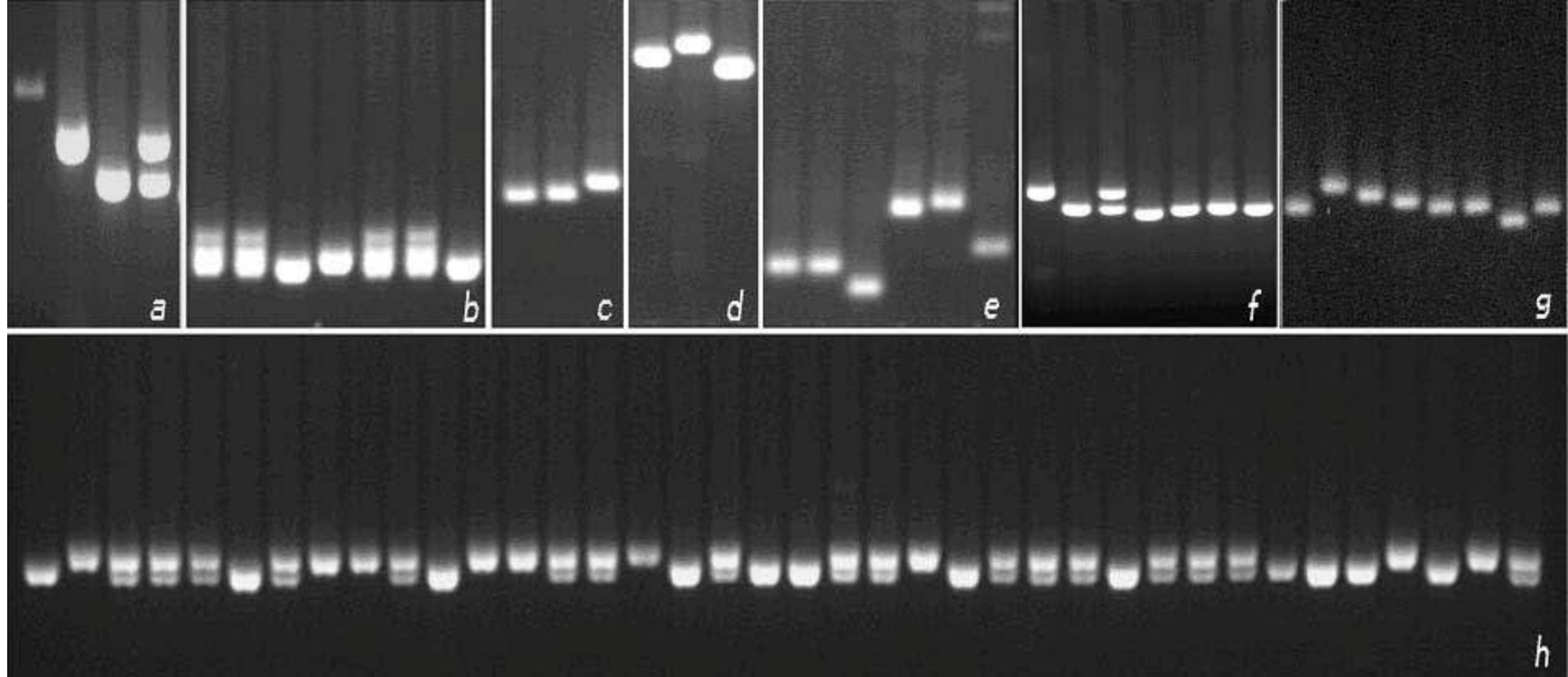
AGi primer setlerinin *Capsicum* türü içerisinde kullanılabilirliğine araştırmak üzere farklı biber türlerinde [BP225, BYE6788, C13 (*C. annuum* L.), SA219 (*C. baccatum* L.), SA426, SA184 (*C. chacoense* L.), BP605 (*C. chinense* L.) ve SA218 (*C.*

frutescens L.)] rastlantısal seçilen 14 primer setinde (AGi098, AGi100, AGi101, AGi102, AGi103, AGi104, AGi105, AGi108, AGi111, AGi112, AGi113, AGi124, AGi126, AGi127) kullanılmıştır (Şekil 4.9). Kullanılan AGi primer setlerinden türler arası genomik DNA'lara uygulananlardan AGi108 primer seti monomorfik sonuç verirken AGi105 ve AGi102 ise büyük bant oluşturmuştur. Kullanılan primer setlerinin büyük bir kısmı polimorfik sonuçlar vermiş olması bu tez kapsamında geliştirilmiş olan AGi primer setlerinin biber ıslah çalışmalarında kullanılabilir olduğunu desteklemektedir.

Ayrıca yine seçilen 12 adet primer seti Demre Sivrisi, PM687, F₁ bitkilerinin yanı sıra patlıcan, tütün, patates ve domates bitkilerinin genomik DNA'ları kullanılarak dizayn edilen mikrosatellit primer setlerinin *Solanaceae* familyasında kullanımı incelenmiş ve biberde dizayn edilen mikrosatellit primer setlerinin bu familyada kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.9). Primer setlerinden AGi098, AGi101, AGi104, AGi111, AGi115, AGi121, AGi124 primerleri polimorfik sonuç verirken AGi096, AGi108, AGi110, AGi113, AGi126 primer setleri monomorfik sonuçlar vermiştir.

Tüm bu çalışmalar kapsamında tür içi, türler arası ve familya bazında yapılan bu çalışmaların hem kullanılan örnek sayısının hem de primer sayısının arttırılarak genişletilmesi ile daha etkin sonuçlara ulaşılması planlanmıştır. Ancak eldeki bu sonuçlar *C. annuum* L. türünde tasarlanan EST mikrosatellit primer setlerinin türe özgü değil universal olarak farklı türlerde hatta familya bazında tüm genetik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada ayrıca markır destekli seleksiyon çalışmalarında maliyeti düşürmek amacı ile geliştirilmiş olan AGi markır setlerinden birden fazlasını tek bir PZR reaksiyonunda (multiplex PCR: M-PCR) kullanım olanakları araştırılmıştır. Ön çalışmalar geliştirilmiş olan AGi markır setlerinin büyük bir bölümünün M-PCR uygun olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.9. İndirgemeli PZR profili ile çoğaltılan mikrosatellit lokusları (AGi). Panel a DNA boyut markırı, Ana (Demre Sivrisi (DS)), Baba (PM687) ve F₁ bitkilerinin AGi101 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel b yalnız F₂ bitkilerinin AGi008 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel c DS, PM687 ve SA36 bitkilerinin AGi074 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel d DS, PM687 ve SA36 bitkilerinin AGi030 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel e DS, PM687 ve SA36 bitkilerinin sırasıyla AGi080 ve AGi086 primerleri ile çoğaltılan ampikonu. Panel f DS, PM687 ve F₁ (*C. annuum* L.), patlıcan (*S. melongena* L.), tütün (*N. tabacum* L.), patates (*S. tuberosum* L.) ve domates (*S. lycopersicum* L.) bitkilerinin AGi101 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel g BP225, BYE6788 ve C13 (*C. annuum* L.), SA219 (*C. baccatum* L.), SA426 ve SA184 (*C. chacoense* L.), BP605 (*C. chinense* L.) ve SA218 (*C. frutescens* L.) bitkilerinin AGi101 primer seti ile çoğaltılan ampikonu. Panel h yalnız F₂ bitkilerinin AGi030 primer seti ile çoğaltılan ampikonu

4.9. AGi Mikrosatellit Primer Setlerinin Değerlendirilmesi

Bitki ıslahında kullanılacak markır sayısı ve genotip sayısı arasında genellikle ters yönlü bir ilişkinin varlığı nedeni ile çalışmanın amacına göre uygun markır sayısı ve/veya genotip sayısının belirlenmesi bir zorunluluktur (Şekil 4.10). Örneğin Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) teşhisinde kullanılacak markır sayısı az iken, genetik karakterizasyon çalışmalarında yüksek sayıda DNA markırına ve genotip sayısına ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer taraftan ıslahta kullanılacak uygun ebeveynlerin belirlenmesi için markır sayısı oldukça yüksek tutulması gerekirken kullanılacak genotip sayısı göreceli olarak azdır.



Şekil 4.10. DNA markır sayısı ve genotip sayısı arasındaki ilişki

Uygun markır sayısının belirlenmesinde kullanılacak markır sistemine göre de değişmektedir. Örneğin markır sisteminin dominant veya ko-dominant, fonksiyonel veya fonksiyonel olmayışı, markır sisteminin oluşturduğu allel sayısı ve otomasyona uygun olup olmaması durumları önemlidir. Günümüze değin oldukça ilgi çekici özellikleri olan türler ve onların önemli olduğu düşünülen genlerinin belirlenmesi ve o özelliklerinin diğer türlere aktarılabilmesi için oldukça farklı yaklaşımlar kullanılmakta ve DNA markırları bu çalışmalarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Sorrells ve Wilson 1997, Onus vd Pickersgill 2004, Bagge ve Lubberstedt 2008).

AGi primer setleri EST tabanlı olmaları ve fonksiyonel markır olarak kullanılabilme özellikleri nedeniyle ıslah çalışmaları için etkin bir kaynak olarak kullanılabilir. Biberde geliştirilmiş mikrosatellit DNA markır sayısı diğer kültür bitkilerine oranla daha az düzeyde ve çoğunlukla fonksiyonları belirlenmemiş olan markırlardır. Son yıllarda biberde yapılan genetik haritalama çalışmalarında türler arası populasyonlarda 805 adet markır (harita mesafesi 1858 cM) tür içi populasyonlarda ise 745 markır (harita mesafesi 1892 cM) bulunmuştur (Lee vd 2009).

Türler arası *C. frutescens* var. BG2814-6 x *C. annuum* cv. NuMex RNaky melezinin kendilenmesi ile elde edilen 100 adet F₂ bitkisi ile Ben-Chaim vd (2006) tarafından yapılan genetik linkage haritalama çalışmasında toplam 728 adet moleküler markır içerisinde 489 adet SSR markır, 195 adet AFLP markır ve 8 adet spesifik PZR markır ve 36 adet RFLP markır kullanılan F₂ bitkileri arasında toplam uzunluğu 1358.7 cM ile 12 büyük 4 adet küçük linkage grubu meydana getirilmiştir.

C. annuum cv. NuMex RNaky x *C. chinense* var. PI159234 melezinden elde edilen F₂ populasyonu üzerinde toplam 426 moleküler markırın kullanılmış 359 SSR markır, 3 adet spesifik PZR markır ve 68 adet RFLP markır haritalanmıştır. F₂ populasyonun arasında 1004.8 cM harita mesafesi ile 11 büyük 4 adet küçük linkage grubu saptanmıştır (Wu vd 2009). Fakat bu haritalama çalışmalarında mikrosatellit primer setlerinin kullanımının oldukça sınırlı olması polimorfik sonuç veren yeni mikrosatellit primer setlerinin biber bitkisinde genetik haritalama çalışmalarında kullanılması gerektiğini göstermiştir (Carante vd 2002, Guzman vd 2005).

Bu tez çalışma kapsamında geliştirilmiş olan primer setlerinin genel özellikleri sıralanacak olursa AGi mikrosatellit primer setleri:

- i) Tür içi (intragenik) ve türler arasında (intergenik) haritalama çalışmalarında kullanılabilir nitelikte olması,
- ii) Yüksek düzeyde polimorfizm bilgi içeriğine (PIC) sahip olması,
- iii) Multiplex PZR (M-PCR) uygunluğu,

- iv) EST tabanlı olmaları nedeni ile geniş bölgelerde bulunmaları nedeni ile biber ıslahına fonksiyonel markırlar olarak katkılar sağlayabilecek,
- v) AGi primer setlerinin ülkemiz için önemli bir çeşit olan Demre Sivrisi biber çeşidinden geliştirilmiş olması nedeni ile özgündürler.

4.10. cDNA Kütüphanelerinin Oluşturulması

4.10.1. 16 farklı örnekte toplam RNA ekstraksiyon çalışmaları

Aralarında biberinde bulunduğu çoğu bitki türü yüksek miktarda endojen RNaz'lar, polisakkaritler ve polifenoller bulundurmalarından dolayı bölünmemiş ve kırılmamış (intact) RNA'nın izolasyonu genellikle zordur. Çalışmanın ön aşamalarında farklı RNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış ancak 16 farklı organ, doku veya farklı gelişme dönemlerindeki örneklerden etkin bir şekilde toplam RNA ekstraksiyonunda kullanılamamıştır. Hot Borate RNA ekstraksiyon yönteminde uygulamanın günler alması ve bazı dokulardan RNA elde edilememesi ve kitlerin ise bir taraftan çok pahalı diğer taraftan polisakkaritleri uzaklaştıramaması nedeni ile kullanılmamıştır. Bu tez çalışmasında 16 farklı doku, organ veya gelişme dönemine ait toplam RNA yeni geliştirilen MAGi RNA ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MAGi RNA ekstraksiyon yöntemi işlemlerinden bir bölüm resmi

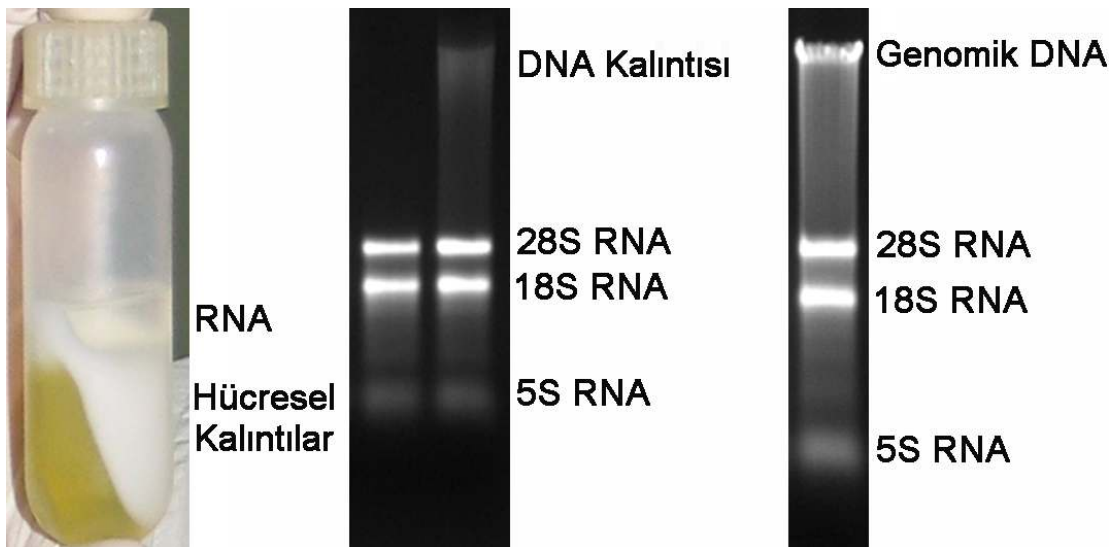
Çoğu RNA ekstraksiyon protokolünde olduğu gibi ezme-parçalama aşamasında enzimsel faaliyetleri azaltmak ve doku parçalanmasını kolaylaştırmak için bu çalışmada da sıvı azot kullanılmıştır. Ezme aşamasına geçmeden önce kullanılacak steril edilmiş havan ve havanelleri -80°C’de en az 20 dakika bekletilerek ön soğutma işlemi yapılmıştır. Böylece kullanılan materyalin havan içerisine konması ve ezme aşamasına geçmeden oluşabilecek RNaz aktiviteleri engellenmiş ve diğer taraftan oksidasyon sınırlandırılmıştır.

RNA ekstraksiyonunun pülverizasyon aşamasından sonra gelen ilk aşaması olan homojenizasyon-lezyon işlemi sırasında homojenizasyon işlemi sıvı azot içerisinde gerçekleştirilmiş ve sıvı azot havan içerisinden tam olarak buharlaşmadan önce REKS çözeltisi eklenerek dokuların lezyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. RNA ekstraksiyon protokolünün uygulanırken doku miktarına uygun hacimde kullanılan REKS solüsyonu içerisinde homojenizasyon ve lezyon aşamasında dokular parçalamış ve protein, polisakkarit, pigment maddeleri, DNA ve RNA’lar dokulardan ayrılmıştır. REKS solüsyonu içerisinde bulunan GITC (8M) yardımı ile RNaz’lar, proteinler ve polisakkaritlerin parçalanması sağlanmıştır. Homojenat hafif suluri aşamaya gelmeye başlayınca uygulanan düşük pH’lı NaOAc (2M, pH 4.0) konularak hızla karıştırılmış ve bu noktada genomik DNA’nın parçalanması ile büyük moleküler ağırlıkta DNA varlığı elimine edilmiştir.

MAGi RNA ekstraksiyon protokolünde kullanılan düşük pH’lı NaOAc özellikle perikarp ve plasenta dokularından RNA ekstraksiyonunda genomik DNA’nın uzaklaştırılmasında en kritik aşama olarak karşımıza çıkmıştır. Çünkü REKS solüsyonuna NaOAc ilave edildiği zaman bu dokularda RNA miktarına eşit oranda DNA kalıntısı gözlenmiş NaOAc’ın tam anlamıyla homojenizasyon-lezyon aşamasının sonunda fenolden hemen önce konulup hızla karıştırılıp fenolün peşinden ivedilikle ilave edilmesiyle DNA kontaminasyonu engellenebildiği görülmüştür (Şekil 4.12). REKS solüsyonu içerisinde bulunan GITC’de DNA kontaminasyonunu engelleyen bir kimyasal olmasına rağmen burada en önemli faktör GITC konsantrasyonu ve biber dokularının içinde bulunduğu fizyolojik dönemin etkili olduğu saptanmıştır.

Biber meyvesi gelişiminde Portis vd (1999)'ne göre çiçeklenmeden sonraki 35 günlük dönemde asitliğin giderek azaldığı ve 65. günde meyvenin en az asidik olduğu dönem olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada DNA kalıntısının bu evrede daha fazla olmasının nedeni ise bu dokulardaki bazlık durumu nedeni ile kullanılan NaOAc'nın ortam pH'sını yeterince düşürmediğini göstermiştir. Ancak çalışmada NaOAc ilavesinin ardından ivedilikle ilave edilen (kullanılmadan önce hazırlanan yine düşük pH'lı) fenol ile birebir hacimde karıştırılan kloroform hem bir miktar RNaz inaktivasyonu sağlanmış hem de DNA ve proteinler dejenere edilerek, oda sıcaklığında karıştırılarak tüm solüsyonun etkinliği artırılmıştır. Daha sonra havandan 28 ml'lik steril tüplere alınan homojen karışıma uygulanan güçlü bir santrifüj sayesinde RNA haricinde tüm kalıntılar alt fazda kalarak uzaklaştırılmıştır.

İsopropanol uygulamasından sonra santrifüj gücüyle çöktürülen RNA için en önemli uygulama RNA'ya bağlı küçük proteinler ve bazı pozitif yüklü polisakkaritlerin uzaklaştırıldığı TRIS-KOAc-Ethanol çöktürmesi olmuştur. Özellikle bu aşama tüm doku tiplerinde olduğu gibi olgun tohum için etkin bir şekilde polisakkarit kalıntılarının uzaklaştırılarak A_{260}/A_{230} oranının önemli derecede yükseltilmesinde etkili olmuştur. TRIS-KOAc-Ethanol uygulamasının genç dokularda zorunlu olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil. 4.12. MAGi RNA ekstraksiyonu

MAGi RNA ekstraksiyon yönteminde uygulanan kimyasal kompozisyonunun yanında diğer protokollere oranla doku miktarına göre daha düşük hacimlerde kullanılabilen (0.25-1 g dokuya 3-6 ml) bir özellikte olması ve ilk aşamada oluşan homojenatın birinci santrifüjden sonra %30-40'nın süpernatant olarak kurtarılabilmesi yüksek verim eldesi için önemli bir unsur olmuştur. Ayrıca doku miktarına uygun kullanılan REKS solüsyonu hem RNA degradasyonunu önlemiş hem de RNaz aktivitesini minimuma indirmişdir. RNaz aktivitesinin hızla durdurulmuş olmasının avantajı ise örneklerle ait RNA'nın hem ekspresyon profilinin korunmasını hem de bütün halinde ekstrakte edilmesini sağlamıştır. Doku miktarına uygun miktarda REKS kullanmanın bir avantajı da pigment, protein, polisakkarit ve DNA kalıntısını önlemiş ayrıca yeterli miktarda ekstraksiyon solüsyonu kullanımı sayesinde organik fazdan sıvı faza kontaminasyonu riskini azaltmıştır (Şekil 4.12).

Ayrıca bu metodun diğerlerinden önemli avantajlarından biri toksik kimyasallar olan GITC, fenol ve kloroform konsantrasyonlarının oldukça düşük olması diğeri ise diğer metotlara göre çok kısa sürede (1 saatten az bir sürede) yüksek verimli ve kaliteli toplam RNA ekstraksiyonunun gerçekleştirilebiliyor olması nedeniyle bu metot tercih edilmiştir (Ince ve Karaca 2009).

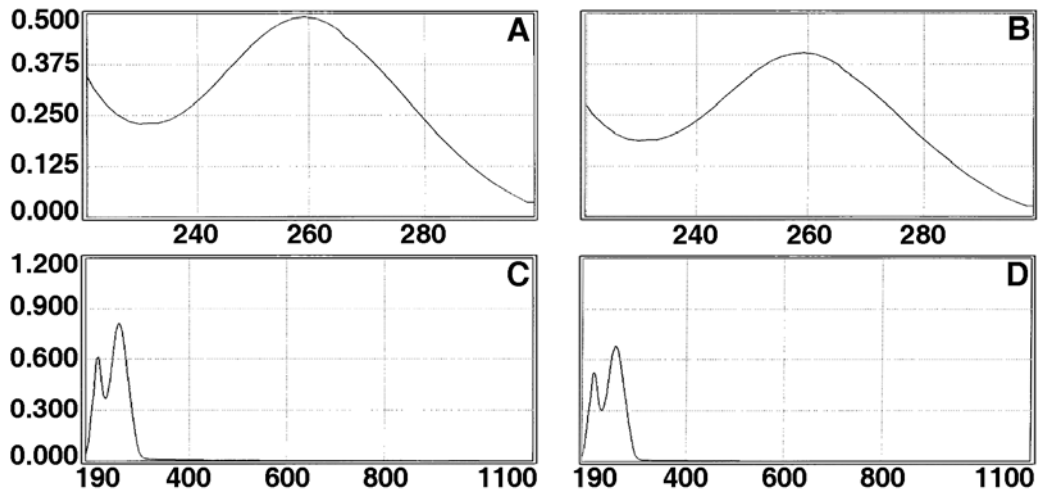
4.10.2. RNA kalite ve kantitelerinin araştırılması

4.10.2.1. Spektrofotometrik yöntem

Spektrofotometrik ölçümler 16 farklı doku, organ ve gelişme dönemlerine ait Demre Sivrisi biber çeşidi RNA'larının miktarlarının belirlenmesinden sonra Şekil 4.13'de gösterildiği üzere 220-300 nm arasında (Panel A ve B) ve 190-1100 nm (Panel C ve D) dalga boyları arasında yapılan ölçüm sonuçlarına göre herhangi bir protein, polisakkarit ve kimyasal madde kalıntısı bulunmadığı gözlenmiştir.

Kaliteli bir RNA'nın hem A_{260}/A_{280} oranı hem de A_{260}/A_{230} oranının 2.0 ve üzeri bir değerde olması kalitenin önemli bir göstergesidir. Bu tez çalışmasında spektrofotometrik ölçüm değerleriyle yapılan hesaplamalarda A_{260}/A_{280} oranları Çizelge 4.53'de verilmiştir. Elde edilen doku, organ ve gelişme dönemlerine özgü

RNA'lerden spektrofotometrik ölçümler her bir RNA için 3 kez tekrarlanmış ve A_{260} okumaları ortalamaları, A_{280} okumaları ortalamaları ve A_{230} okumaları ortalamaları temel alınarak ekstrakte edilen RNA örneklerinin kalite değerleri ve kullanılabilirlikleri saptanmıştır. Çizelge 4.53'de görüldüğü gibi tüm RNA'ların ortalama A_{260}/A_{280} oranları 2.072 ± 0.059 olarak tespit edilirken A_{260}/A_{230} oranlarının ortalaması 2.123 ± 0.117 olarak belirlenmiş ve elde edilen RNA'ların RNA tabanlı yapılacak her türlü analiz için kullanılabilir RNA'lar olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Demre Sivrisine ait RNA'nın spektrofotometrik analizleri. Panel A: genç yaprak dokusunun $A_{220-300}$ nm arasında spektrofotometrik ölçüm değeri, Panel B: 15 ÇGS perikarp dokusunun $A_{220-300}$ nm arasında spektrofotometrik ölçüm değeri, Panel C: genç yaprak dokusunun $A_{190-1100}$ nm arasında spektrofotometrik ölçüm değeri, Panel D: 15 ÇGS perikarp dokusunun $A_{190-1100}$ nm arasında spektrofotometrik ölçüm değeri gösterilmiştir

Spektrofotometrik ölçümler sonucu belirlenen RNA miktarları Çizelge 4.53'de sunulmuştur. RNA örneklerinin büyük bir bölümü A_{260}/A_{280} oranlarında 2.0 değerinin üzerinde okuma değerine sahipken yalnızca 6 yapraklı fide döneminde alınan kök dokusunda 1.918 ± 0.064 değerini vermiştir. RNA örneklerinden sadece 5 yıllık olgun tohumlardan elde edilen RNA'nın 1.851 ± 0.305 değerine sahip 5 yıllık olgun tohumlardan elde edilen RNA örneği haricindekilerin A_{260}/A_{230} oranı 2.0'ın üzerinde değerlere sahip olmuştur. En yüksek A_{260}/A_{280} oranına sahip 3 örnek sırasıyla 2.154 ± 0.026 değeriyle tomurcuk dokusu, 2.149 ± 0.015 değeriyle 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve son olarak 2.148 ± 0.008 değeriyle genç yaprak dokusunda

tespit edilmiştir. En yüksek A_{260}/A_{230} oranı ise 2.302 ± 0.012 değeriyle genç yaprak dokusunda ardından 2.221 ± 0.272 değeriyle 15 ÇGS perikarp dokusundan alınmıştır.

RNA miktarı doku organ bazında incelendiğinde en yüksek verim 1 g taze dokudan 2660.3 ± 281.99 μg RNA elde edilmiş olan tomurcuk dokusunda tespit edilmiştir. Tomurcuk dokusunun ardından ikinci sırada 36 ÇGS ve 13 cm uzunluğunda meyvelerden alınan 1 g taze olgunlaşmamış tohumlardan 1589.3 ± 137.61 μg RNA elde edilmiştir (Çizelge 4.53).

Çalışmada kullanılan çiçek parçacıklarından ise yine yüksek miktarda (1347.2 ± 185.68 $\mu\text{g/g}$) RNA alınmıştır (Çizelge 4.53). En az RNA verimi ise 451.20 ± 119.18 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarıyla 65 ÇGS ve 14 cm uzunluğunda meyvelerden alınan plasenta dokusundan elde edilirken 459.50 ± 107.34 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarıyla sap dokusundan da diğerlerine oranla daha az miktarda RNA elde edilmiştir. Çoğu RNA ekstraksiyon protokolünde RNA ekstraksiyonu zor dokular arasında yer alan kök dokusundan ise 628.27 ± 104.10 $\mu\text{g/g}$ RNA kantitesi sağlanmıştır (Çizelge 4.53).

Gelişme dönemlerine göre yapılabilecek bir kıyaslamada öncelikle yüksek verimleriyle dikkat çeken olgun ve genç yaprak dokularından elde edilen RNA verimi birbirine çok yakın olmasına rağmen olgun yapraklardan 1253.20 ± 104.62 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarıyla genç yapraklara oranla biraz daha yüksek RNA miktarı sağlanmıştır. Diğer dokulara oranla daha düşük seviyede RNA elde edildiği göze çarpan perikarp dokuları içerisinde ise en yüksek verim 752.00 ± 126.71 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarıyla 15 ÇGS perikarp dokularından alınırken en düşük 465.07 ± 87.66 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarıyla 36 ÇGS perikarp dokularından elde edilmiştir. Genel anlamda diğer dokulara göre daha düşük verim alınan plasenta dokuları içerisinde ise en yüksek 846.93 ± 327.81 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarı 36 ÇGS plasenta dokusundan alınırken en düşük RNA verimi 451.20 ± 119.18 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarı ile 65 ÇGS plasenta dokusundan alınmıştır. Tohum dokusu içerisinde en yüksek RNA verimi 36 ÇGS olgunlaşmamış tohumlardan 1589.30 ± 137.61 $\mu\text{g/g}$ elde edilmiş en düşük RNA verimi ise 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlardan 598.40 ± 120.80 $\mu\text{g/g}$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 53. Demre Sivrisi (*Capsicum annuum* L.) çeşidine ait farklı doku, organ ve gelişme dönemlerine ait RNA'nın kalite ve kantitesi

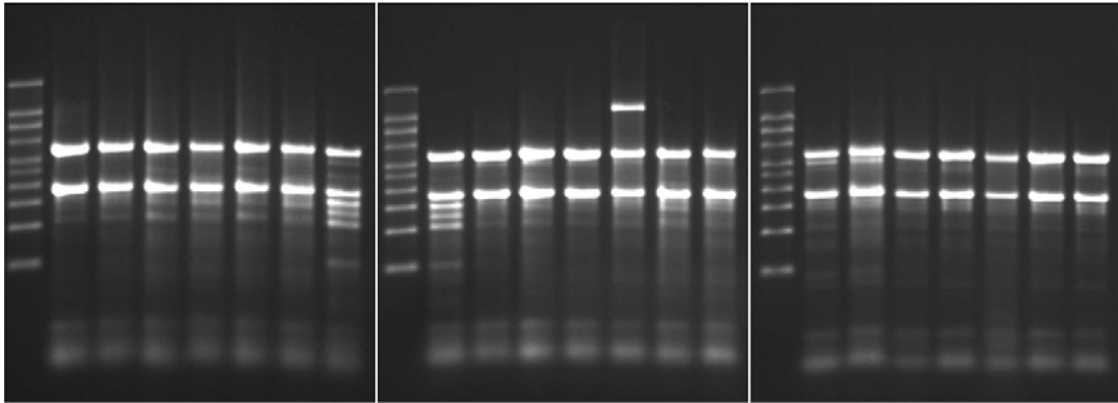
Organ/Doku ^a	Gelişme Dönemi ^b	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ Oranı ^c	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ Oranı ^c	Verim (µg g ⁻¹) ^d
Genç Yaprak	6 yapraklı fide dönemi	2.302±0.012	2.148±0.008	1195.7±28.85
Olgun Yaprak	90 günlük bitkinin 15. boğumundan	2.225±0.053	2.126±0.017	1253.2±104.62
Tomurcuk	Sepallerin görünmediği aşama	2.284±0.010	2.154±0.026	2660.3±281.99
Plasenta	15 ÇGS ve 11 cm uzunluğunda meyve	2.065±0.159	2.039±0.106	481.33±102.96
Perikarp	15 ÇGS ve 11 cm uzunluğunda meyve	2.221±0.272	2.064±0.104	752.0±126.71
Olgunlaşmamış Tohum	15 ÇGS ve 11 cm uzunluğunda meyve	2.029±0.265	2.031±0.138	1033.6±289.63
Plasenta	36 ÇGS ve 13 cm uzunluğunda meyve	2.170±0.109	2.070±0.041	846.93±327.81
Perikarp	36 ÇGS ve 13 cm uzunluğunda meyve	2.066±0.182	2.019±0.094	465.07±87.66
Olgunlaşmamış Tohum	36 ÇGS ve 13 cm uzunluğunda meyve	2.203±0.068	2.149±0.015	1589.3±137.61
Plasenta	65 ÇGS ve 14 cm uzunluğunda meyve	2.051±0.088	2.073±0.027	451.20±119.18
Perikarp	65 ÇGS ve 14 cm uzunluğunda meyve	2.103±0.124	2.071±0.032	552.80±108.60
Tohum	65 ÇGS ve 14 cm uzunluğunda meyve	2.031±0.029	2.090±0.022	598.40±120.80
Kök	6 yapraklı fide dönemi genç kökler	2.011±0.079	1.918±0.064	628.27±104.10
Çiçek parçacıkları	0 ÇGS çanak ve taç yapraklar, dişi ve erkek organlar	2.185±0.028	2.096±0.026	1347.2±185.68
Sap	4 aylık bitki	2.167±0.024	2.073±0.063	459.5±107.34
Olgun Tohum	5 yıllık	1.851±0.305	2.036±0.013	901.87±93.570
Ortalama	16 farklı organ/doku/gelişme dönemleri	2.123±0.117	2.072±0.059	951.00±579.20

^a: Bütün dokular RNA ekstraksiyonundan önce 2 yıl süresince -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. ^b: ÇGS: Çiçeklenmeden sonra geçen gün sayısı. ^c: Sonuçlar farklı günlerde yapılan en az üç ayrı RNA ekstraksiyonunun standart hata değerleriyle birlikte ortalama değerlerini temsil etmektedir. ^d: Verim 1 g yaş (taze) ağırlık üzerinden hesaplanmıştır

MAGi RNA ekstraksiyon protokolü kullanılarak tüm dokulardan elde edilen ortalama RNA verimi 951.00 ± 529.00 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir. Bu rakam ortalamasıyla şu ana kadar kullanılan diğer metotlardan elde edilen RNA miktarından oldukça fazla miktarda RNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Camacho-Villasana vd (2002) biber dokuları üzerinde yaptıkları RNA ekstraksiyon metodu çalışmalarında çok daha uzun süre alan ve fazla GITC konsantrasyonunun kullanıldığı protokollerinde maksimum 250 $\mu\text{g/g}$ RNA miktarı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.10.2.2. Formamit-Agaroz jel yöntemi

RNA'nın kalitesi ve kantitesini gösteren önemli bir araç olan spektrofotometrik ölçümler RNA'nın kalite ve kantitesi ile ilgili bilgi verici düzeyde olsa da RNA'nın bütünlüğü hakkında bilgiye ancak agaroz jel elektroforez yöntemi ile ulaşılmaktadır. Bu tez çalışmasında RNA'nın kalitesini ve miktarını belirlemek için kullanılan diğer bir yöntem olan formamit agaroz jel elektroforez yöntemi ile RNA örneklerinin herhangi bir polisakkarit, DNA, kimyasal madde kalıntısı olup olmadığı jel üzerinde yürütülerek belirlenmiştir (Şekil 4.14).



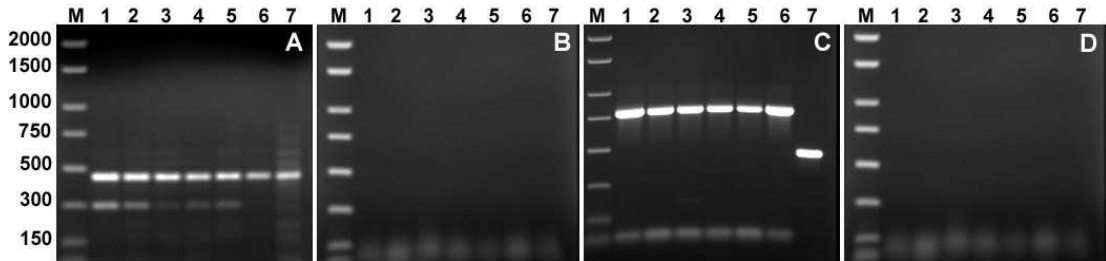
Şekil 4.14. RNA'ların formamit agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa RNA büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak dokularının RNA'ları, ortada olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum RNA'ları, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve olgun tohum RNA'ları

Elektroforez sonucunda RNA'ların herhangi bir kalıntı içermediği, 28S, 18S ve 5S ribozomal RNA'ların (rRNA) kırılmamış ve bir bütün olarak yapılarını koruduğu

gözlenmiştir. Ayrıca mRNA'ların boydan boya bir smear olarak mevcut olduğu ve her türlü analiz için uygun RNA ekstraksiyonunun yapıldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Bu bulgular ışığında çalışma kapsamında geliştirilen cDNA kütüphaneleri ve bu kütüphanelerin kullanılarak mikrosatellit içeren cDNA'ların tespitinin güvenilir olduğu öngörülmüştür.

4.10.2.3. TT-PZR yöntemi

RNA ekstraksiyonunda elde edilen RNA'nın kalitesini belirlemenin bir başka yolu da TT-PZR yöntemidir. Bu tez çalışmasında bu yöntemde toplam RNA ekstraksiyonu yapılan örneklerin RNA kalitesini belirlemek amacı ile önce seçilen bazı örnekler UBI primer seti diğer bazı örnekler için ise GAPC primer seti kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiş ve yine bu primer setleri kullanılarak cDNA PZR'ları gerçekleştirilerek TT-PZR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.15). Agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenen TT-PZR sonuçlarına göre elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezi için uygun ve etkin sonuçlar verdiği saptanmıştır (Şekil 4.15).



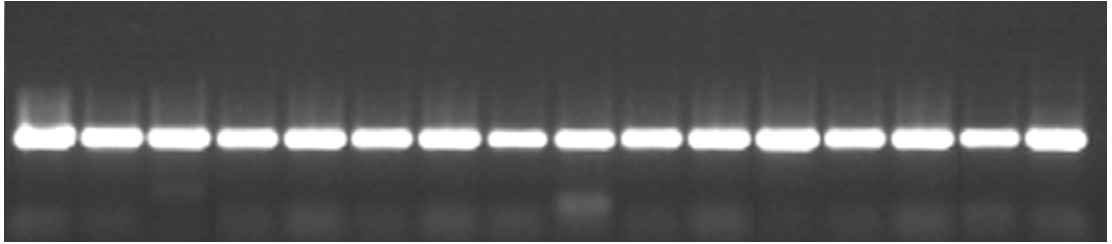
Şekil 4.15. TT-PZR ve TTsiz- PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sırasıyla A) 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarpları, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak dokularının RT-PZR sonuçları, B) 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS Perikarpları, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS Plasentalar ve genç yaprak dokularının No-RT-PZR sonuçları, C) olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum dokularının RT-PZR sonuçları, D) olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum dokuları No-RT-PZR sonuçları gösterilmiştir

4.10.3. cDNA sentezi ve normalleştirilmesi

Üzerinde çalışılan örneklerden toplam RNA elde edildikten sonra DNA'nın jelde görünemeyecek düzeyde kalma ihtimali üzerine uygulanan DNaz I enzimiyle tüm

DNA kalıntısı riski giderilmiştir. RNA ekstraksiyonu sırasında tüm dokular içerisinde cüzi miktarda da olsa DNA kalıntısı riski taşıyan tek doku 65 ÇGS perikarp dokusu olmuştur. Bunun temel nedeni ise asitliğin en düşük olduğu 65 ÇGS döneminde DNA kalıntısı riskinin yüksek olması olarak düşünülmüştür. 65 ÇGS perikarp dokusu MAGi RNA ekstraksiyon metodunun optimizasyonu sırasında en fazla DNA kalıntısını gösteren, kullanılan kimyasalların sırasına ve ekleniş şekline en hassas doku ve gelişme dönemi olarak belirlenmiştir.

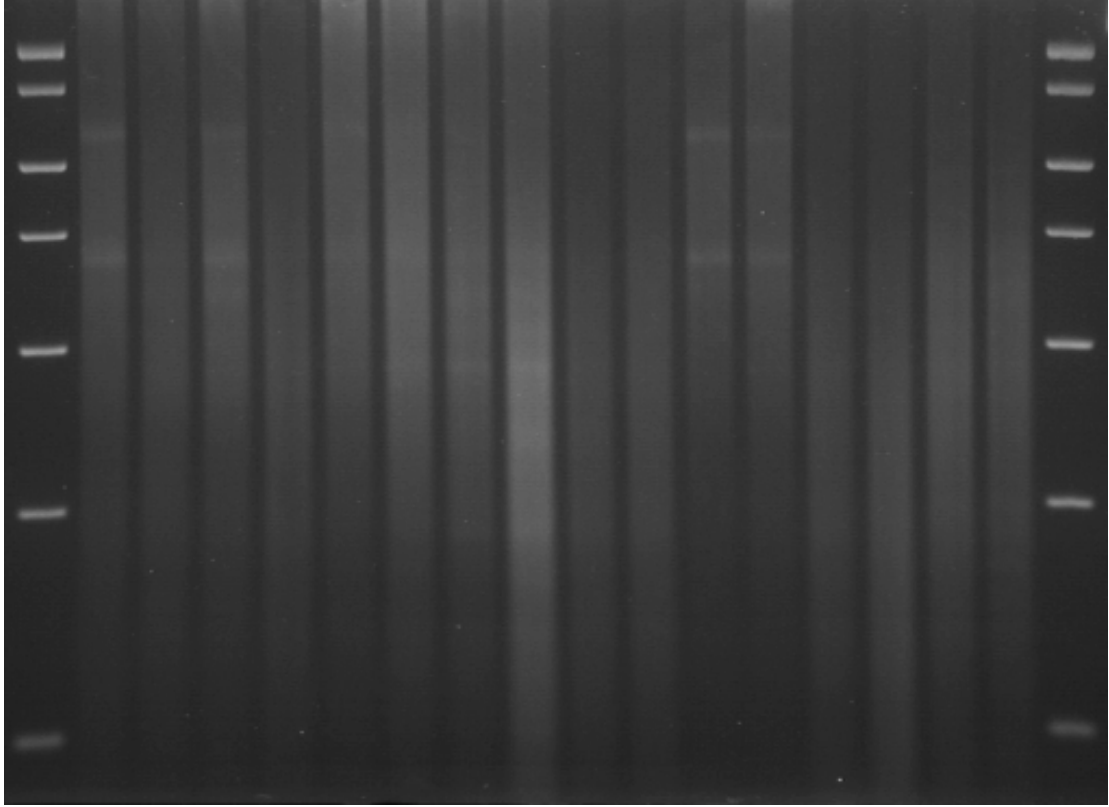
Her bir dokuya ait cDNA'ların Materyal ve Metot bölümünde belirtildiği üzere sentezlenmelerinden sonra cDNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiş ve ayrıca cDNA'lar UBI primer seti ile (UBI-PZR) amplifikasyona alınmış ve amplikon miktarları birbirlerine oranlanarak normalleştirilmiştir. Şekil 4.16'de gösterildiği gibi UBI-PZR sonuçlarına göre cDNA kütüphanelerine ait her bir örneği eşit yoğunlukta amplikon oluşturması ilkesiyle normalleştirme işlemi yapılmıştır.



Şekil 4.16. UBI-PZR agaroz jel elektroforesiz görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve olgun tohum UBI-PZR sonuçları

Öncelikle ilk UBI-PZR için kullanılan 5 µl kullanılıncı cDNA miktarı yaklaşık 50-80 ng olduğu düşünülerek hesaplanan cDNA miktarının yerine 3 µl cDNA kullanılıncı yeterli olacağı UBI-PZR sonucu belirlenmiş ve tüm cDNA kütüphanelerinin uygun mikrosatellit lokuslarının çoğaltımı için cDNA miktarı normalleştirildikten sonra her bir kütüphaneden 3 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Sentezlenmiş olan tek sarmallı cDNA agaroz jelde analiz edilerek kalitesi kontrol edilmiştir. Şekil 4.17'de gösterilen resimde yaklaşık 3 kb'den itibaren yukarıdan aşağıya etkin bir şekilde oluşmuş olan smear görüntü elde edilen cDNA'ların hem

boy hem de miktar olarak PZR koşullarına uygun kalitede cDNA sentezinin gerçekleştirildiğinin bir göstergesi olmuştur.



Şekil 4.17. Çalışmada oluşturulan cDNA agaroz jel elektroforesiz resmi. Sırasıyla soldan sağa büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve olgun tohum, büyüklük markırı

Bu çalışmada oluşturulmuş olan kaliteli cDNA kütüphanelerin yanı sıra oluşturuldukları doku ve organlarda özellikle seçilmiştir. Dönemlerin seçiminde özellikle tohumların fizyolojik dönemleri göz önüne alınmıştır. Biber bitkisinde tohumlar çiçeklenmeden 21 gün sonra en fazla su içermekte ve 35 gün sonra ise %1 düzeyde çimlenme olgunluğuna gelmektedir (Portis vd 1999, Estrada vd 2000) ve 65 gün sonra ise çimlenme olgunluğuna gelmektedir. Biber bitkisinde meyvede büyüme çiçeklenmeden 35 gün sonra fizyolojik olgunluğa ulaşmaktadır. Kullanılan dönemlerde doku ve organlar arasında fizyolojik dönemlerde en belirgin aşamalar

olan çiçeklenmeden sonra 15, 36 ve 65 günlük evreler seçilerek bu dokularda ifade edilen genlerin farklı dönemleri temsil etmeleri amaçlanmıştır (Huh vd 2001).

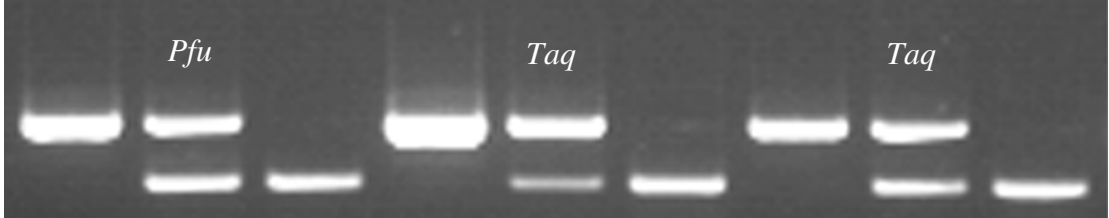
4.11. cDNA Kütüphanelerinin PZR Amplifikasyonu

Bu çalışmada farklı cDNA kütüphanelerinde bulunan mikrosatellit DNA bölgelerinin amplifikasyonu ve kütüphaneler arasındaki mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesi yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kütüphanelerdeki mikrosatellitlerin etkin ve doğru bir şekilde belirlenmesinde amplifikasyon enziminden kaynaklanacak hataların ortadan kaldırılması önemlilik göstermektedir. Bu nedenle bu tez kapsamında sonuçların güvenilir bir şekilde ortaya konabilmesi için 3 farklı amplifikasyon (DNA Polimeraz) enzim kaynağı kullanılmıştır.

Farklı enzim ve kaynakların güvenilirliğini kontrol etmek amacı ile *Taq* DNA Polimeraz Bioron firmasının, *Taq* DNA Polimeraz Fermentas firmasının ve *Pfu* DNA Polimeraz Fermentas firmasının üretmiş olduğu DNA Polimeraz enzimleri kullanılmıştır. Öncelikle Bioron firmasına ait olan *Taq* DNA polimeraz ile *Pfu* DNA Polimeraz enzimleri cDNA karışımı üzerinde UBI primer seti kullanılarak amplifikasyonları karşılaştırılmıştır. Amplifikasyon yoğunlukları arasında her hangi bir fark olmadığı tespit edildikten sonra ampikonlar değişik restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş ampikon DNA dizleri arasında da hiçbir fark olmadığı saptanmıştır.

PZR çalışmalarında kullanılan *Taq* DNA polimeraz hata düzeltme aktivitesinin olmaması nedeni ile genellikle 1-2 kb ampikonlarda yanlış nükleotit eklemeleri yapmaktadır. Diğer taraftan *Pfu* DNA polimeraz hata düzeltme aktivitesinden dolayı yanlış baz eklememektedir. Ancak bu çalışma kapsamında ampikon büyüklükleri genellikle 1 kb nin altına olmasından dolayı her iki enzim arasında bir fark görülmemiştir. Her üç amplifikasyon enzimi farklı AGi primer setleri kullanılarak oluşturdukları ampikonlar karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan enzim kaynakları arasında Şekil 4.18’de gösterildiği üzere her üç farklı enzim multipleks ve monopleks PZR işlemlerinde aynı sonuçlar vermiştir. Bu bulgular ışığında çalışmanın bundan sonraki transformasyon aşamasının “Ekli Adenin” prensibine bağlı olması ve *Pfu*

DNA Polimerazın bu özelliğinin olmaması yanında pahalı olması nedeniyle bu çalışmada *Taq* DNA Polimeraz (Bioron) kullanılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında Bioron ve Fermentas kaynaklı *Taq* DNA polimeraz enzimleri kullanılmıştır.



Şekil 4.18. Farklı amplifikasyon enzim kaynaklarının karşılaştırılması. Amplifikasyon ürünler soldan sağa sırasıyla normal PZR [AGi030], multipleks [AGi030 + AGi047] ve monopleks PZR [AGi047] primer setlerine aittir

4.12. Mikrosatellit Ekspresyon Profillerinin (MEP) Oluşturulması

Çalışmada 83 adet AGi primer seti 16 farklı cDNA ve Demre Sivrisi genomik DNA üzerinde uygulanmış ve oluşturulan ampikon paternlerine göre mikrosatellit ekspresyon profilleri (MEP) oluşturulmuştur. Literatür taramaları göz önüne alındığında mikrosatellitlerin bu şekilde sınıflandırılmaması nedeni ile bu tezle birlikte ilk kez böyle bir sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. Mikrosatellitler bu türde sınıflandırılması ile herhangi bir MEP grubuna giren mikrosatellitin fonksiyonu ile ilgili ipuçları bulunabileceği öngörülmüştür. Çalışmada belirlenmiş olan beş farklı MEP grubu sırasıyla açıklanmıştır.

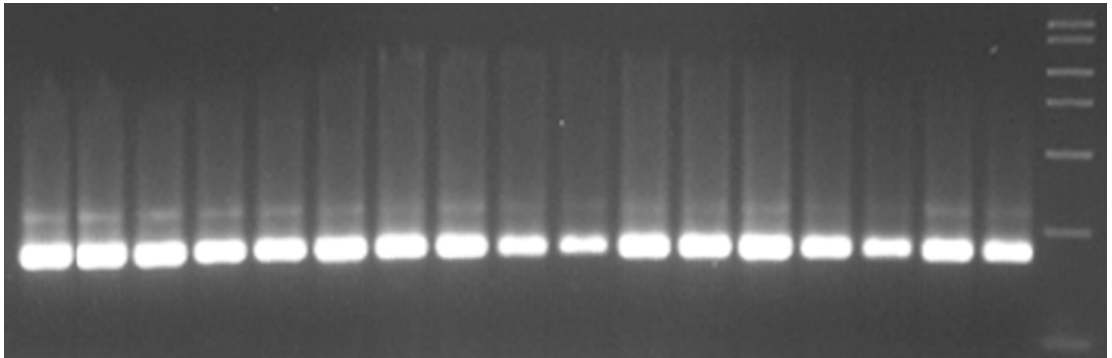
4.12.1. MEP TiP I

Mikrosatellit Ekspresyon Profili TiP I (MEP TiP I) 16 cDNA kütüphanesinde aynı amplifikasyon paterni oluşturan AGi ampikonları bu grubu dahil edilmiştir. Organ, doku ve gelişme dönemleri arasında aynı amplifikasyon paternini oluşturan ampikon DNA dizilerinin araştırılması amacı ile agaroz jel elektroforesiz çalışmalarında aynı paterni oluşturan ancak farklı kütüphanelerden alınan ampikonlara ait DNA dizileri karşılaştırılmış veya bu ampikonların CAPS-mikrosatellit yöntemi kullanılarak farklılıkları araştırılmıştır (Ince vd 2010b). Bu analizler yardımı ile MEP TiP I üç farklı alt gruba ayrılmıştır.

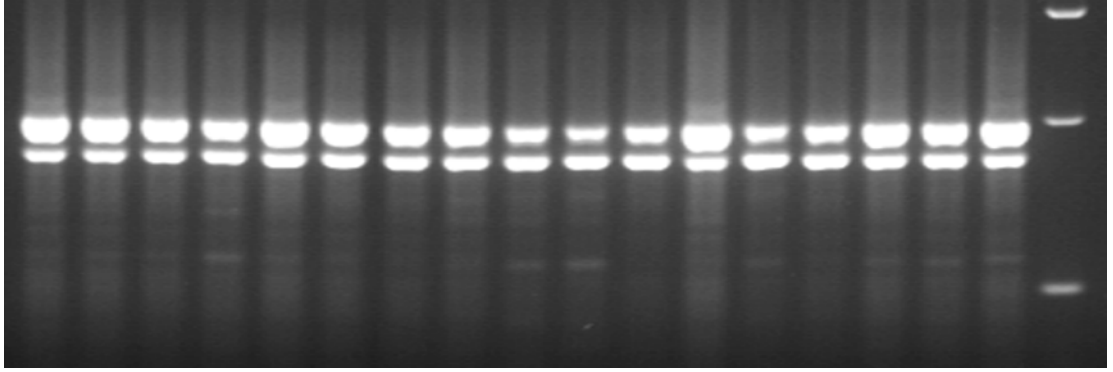
4.12.1.1. MEP TiP IA

Mikrosatellit lokusunun cDNA amplikonları ile genomik DNA amplikonu aynı boyda ve aynı paternde ise bu grup MEP TiP IA'ya dahil edilmiştir. AGi primer setinin 60 adedinden 39'u (%65) cDNA ve genomik DNA arasında aynı amplikon paterni oluşturmuştur (Çizelge 4.54).

MEP TiP IA grubuna giren mikrosatellit alanlarının üst veya alt kısımlarında cDNA ve genomik DNA amplikonlarına ait agaroz jel elektroforesiz ve CAPS-mikrosatellit analizi sonuçlarına dayanarak intron veya intronların bulunmadığı belirlenmiştir. Bu tip ekspresyon paterni veren AGi primer setinin 10 adedi tür içerisinde (DS ve PM687 arasında) polimorfik sonuç verirken 27 adedi türler arası (DS ve SA218 arasında) polimorfik sonuç vermiştir. Bu sonucun intron içeren mikrosatellitlerin tür içerisinde benzer genlerde bulunması nedeni ile daha az polimorfik sonuç verirken türler arasında daha fazla polimorfizm ortaya çıkardığı şeklinde yorumlanabileceği düşünülmüştür. Ancak bu durumun teyit edilmesi gerekmektedir. Şekil 4.19 ve 4.20'de 16 cDNA kütüphanesi ve genomik DNA'da aynı büyüklükte amplikon oluşturan sırasıyla AGi015 ve AGi038 primerlerinin agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.



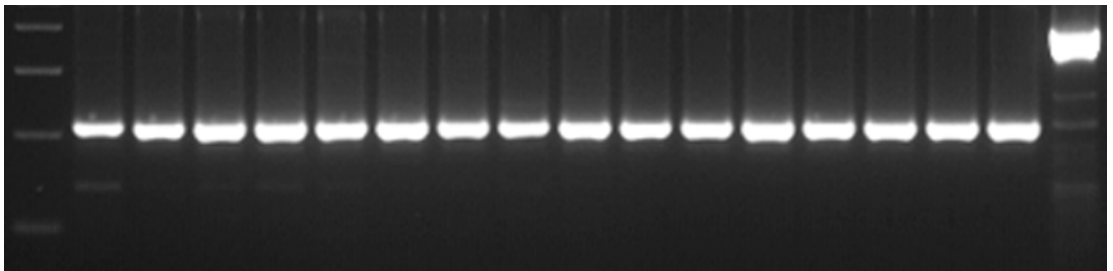
Şekil 4.19. AGi015-MEP 1A paterni. AGi015 primer setinin 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla: 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı



Şekil 4.20. AGi038-MEP IA paterni. AGi038 primer seti ile 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü. Sırasıyla: 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

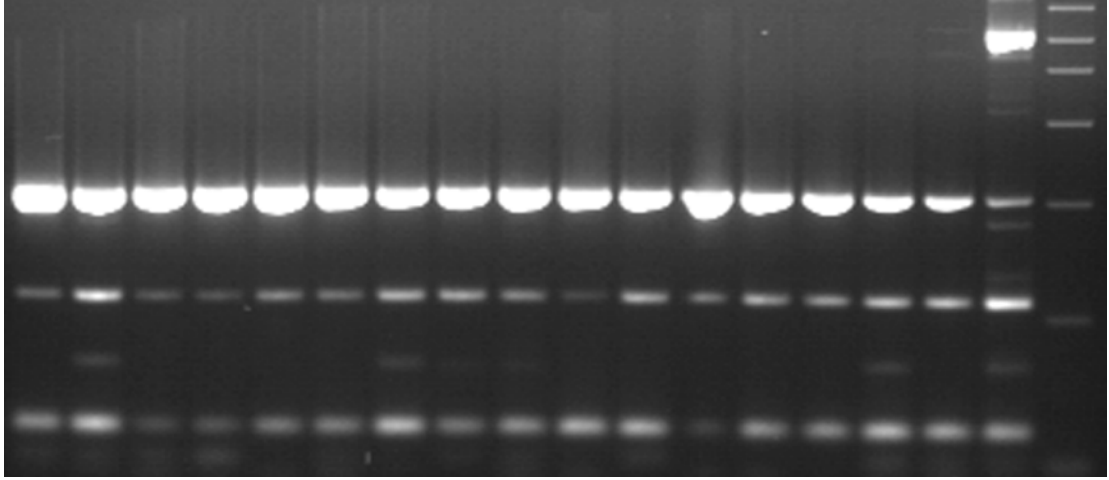
4.12.1.2. MEP TiP IB

Mikrosatellit lokuslarının 16 cDNA kütüphanesinde aynı büyüklükte ve paternde amplicon (Şekil 4.21) oluşturmasına rağmen genomik DNA da daha büyük amplicon oluşturan mikrosatellitler MEP TiP IB grubuna alınmıştır (Çizelge 4.54). Bu gruptaki primer çiftlerinin hem 16 cDNA hem de genomik DNA ampliconlarının restriksiyon enzimleriyle kesilmesi durumunda cDNA'dan farklı olarak genomik DNA üzerinde ekstra kesilmiş büyük bant görüntülerinin varlığının introndan kaynaklandığı göstermiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. MEP TiP IB-AGi019. AGi019 primer seti ile 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve genomik DNA

MEP TiP IB grubu mikrosatellitlerin kullanımıyla sekans karşılaştırma çalışmaları için genomik DNA ampliconlarının intron bölgelerinin gösterilebileceği düşünülmektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da EST'lerden dizayn edilen primer çiftlerinin genomik DNA ampliconları üzerinde intronların bulunduğu gösterilmiştir (Thiel vd 2003, Estany vd 2007, Cristanco ve Escobar 2008).



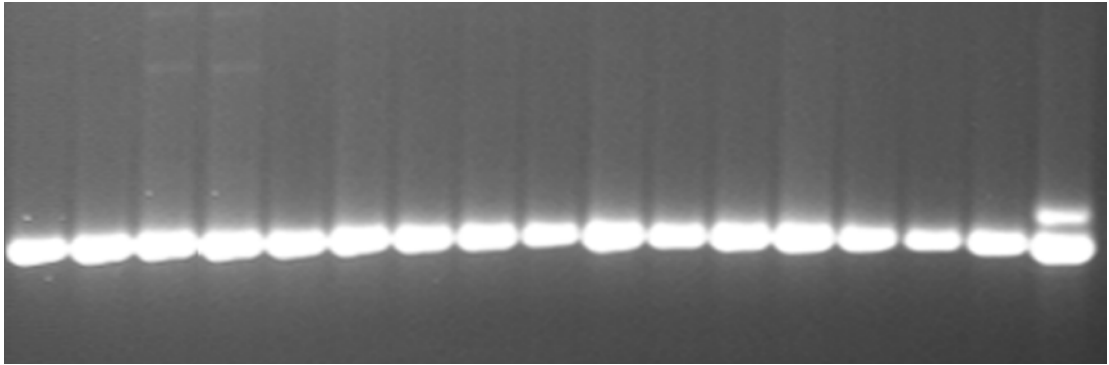
Şekil 4.22. MEP TiP IB-AGi028. AGi primer seti 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu ampliconların *Taq I* restriksiyon enzimiyle kesiminin jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA, PZR büyüklük markırı

MEP TiP IB primer setlerinin amplifikasyonu hem cDNA ve hem de genomik DNA'da gerçekleşmesi ancak farklı büyüklükte ampliconların elde edilmesi MEP TiP IB grubu mikrosatellit alanlarının yakınlarında alternatif siplisin olayının var olduğunu işaret etmektedir (Ince vd 2010b). Ancak bu siplisin olayının alternatif siplisin mi yoksa normal siplisin mi olduğunun araştırılması ile mikrosatellitlerin siplisin olayı üzerindeki rollerinin gelecekte çalışılabileceği düşünülmüştür.

4.12.1.3. MEP TiP IC

Bu gruba dahil edilen mikrosatellitler 16 cDNA kütüphanesinde aynı büyüklükte ve paternde amplicon oluştururken genomik DNA'da iki amplicon oluşturan AGi primer setlerinden oluşturulmuştur (Çizelge 4.54 ve Şekil 4.23).

MEP TiP IC grubunun varlığı EST tabanlı dizayn edilen mikrosatellit primerlerinin genomik DNA üzerinde transkripsiyona uğramayan bölgelerinin de amplifikasyonunu sağladığını göstermiştir. Bu durumda EST tabanlı primerlerin genomik DNA tabanlı analizlerde sadece ekson bölgelerine yönelik olmadığını intron bölgelerinin de çoğaltımını sağladığının göz önünde tutulması gerektiğini ortaya koymuştur (Thiel vd 2003, Estany vd 2007).



Şekil 4.23. MEP TiP IC-AGi027. AGi027 primeri setinin 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve genomik DNA

MEP TiP IC grubunun diğer bir özelliği ise aynı primer setinin genomik DNA da oluşturduğu amplikonlardan birinin transkripsiyona dahil edilen bölgeleri diğerinin ise transkripsiyona alınmayan bölgelerdeki allellerin elde edilebileceğini göstermiştir. Diğer bir söylemle MEP TiP IC grubu primer setleri cDNA ve gDNA üzerinde allelik varyasyonların ve transkripsiyona alınan ve alınmayan allellerden kaynaklandığını göstermektedir.

Bu grupta yer alan AGi021, AGi027, AGi032, AGi100 ve AGi111 primer çiftlerinin temsil ettiği bölgeler hem ekson hem de intron bölgelerini içermektedir. Bu primer çiftlerinden 2 adedi genomik DNA'da iki amplikon oluşturmuş ve bir amplikon büyüklüğü cDNA büyüklüğü ile aynı amplikon büyüklüğüne sahip olduğu görülmüştür. Diğer amplikonun ise farklı büyüklükte olduğu saptanmıştır. İki genomik DNA amplikonunun farklı lokuslardan üretilen amplikonlar olduğu ve bir

lokusta bulunan amplikonun transkripsiyona ve translasyona uğrarken diğer lokusta bulunan mikrosatellit bölgesinin transkripsiyona ve translasyona uğramadığı fikri ortaya çıkmıştır. MEP TiP IC grubuna dahil olan 5 primer setinin türler arası polimorfik sonuç verdiği bulunmuştur.

4.12.2. MEP TiP II

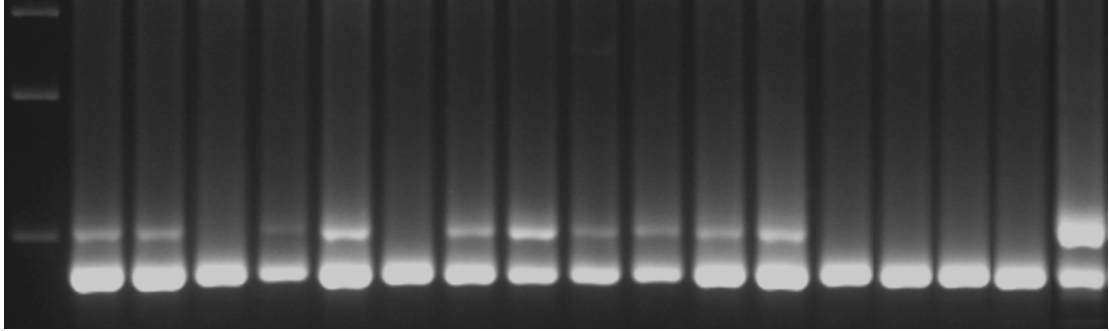
Mikrosatellit lokusuna ait amplikon paterninin 16 cDNA kütüphanesi içerisinde varlığı ya da yokluğu durumunda MEP TiP II grubu oluşturulmuştur (Çizelge 4.54). Bu gruba dahil olan mikrosatellit lokuslarında cDNA amplikonları doku, organ ve gelişme dönemine özgü amplifikasyon gösterdikleri için bazı dokulara ait cDNA'larda mikrosatellit lokusunun varlığı bazılarında ise yokluğu kütüphane spesifik amplikonlar olarak değerlendirilmiştir.

Bu grupta AGi014, AGi026, AGi047 ve AGi103 primer setlerinin amplikonları yer almıştır. MEP TiP II grubuna dahil edilen bu primer çiftlerinin PZR ile çoğaltımı sırasında içsel kontrol (internal) olarak tüm cDNA'larda çalıştığı ve aynı boyda monomorfik bant verdiği bilinen bir primer seti (AGi043 veya UBI) PZR reaksiyonuna eklenmiştir. Varlık/yokluk markırı olarak karşımıza çıkan mikrosatellit amplikonlarının PZR'dan kaynaklanabilecek bir sorun nedeniyle mi yoksa gerçek bir yokluk markırı olarak mı bulundukları konusunda emin olabilmek için aynı PZR reaksiyonu içerisinde internal primer seti kullanılmıştır.

AGi014 primer seti ile AGi043 primer setinin internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların agaroz jel paterni Şekil 4.26'da sunulmuştur. AGi014 primer setinin yanı sıra internal kontrol olarak AGi043 primer seti 265 bp büyüklüğünde monomorfik amplikonlar oluşturmuş bu yüzden 309 bp büyüklüğünde amplikon oluşturan AGi014 primer seti ile rahatlıkla kullanılabilmektedir.

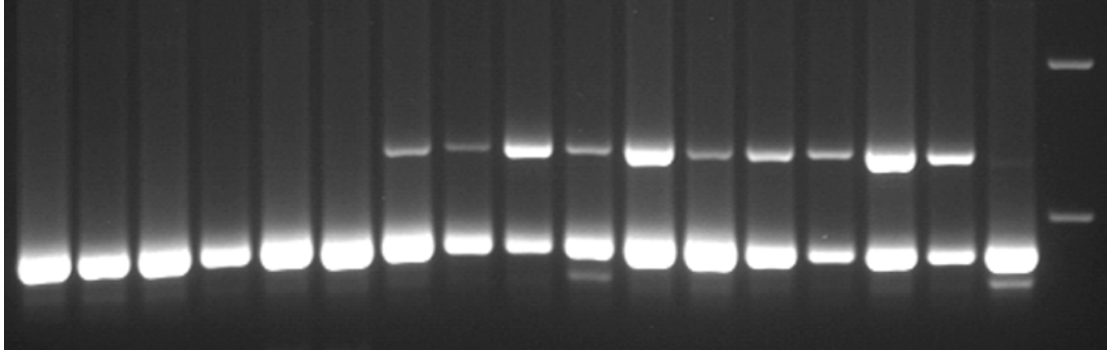
Şekil 4.24'de de görüldüğü gibi AGi014 primeri setinin kullanıldığı PZR sonucunda 65 ÇGS perikarp, 65 ÇGS plasenta, bütün olgunlaşmamış tohumlar (15, 36, 65 ÇGS) ve olgun tohum dokularında bu mikrosatellit lokusunda amplifikasyon

ürünü bulunmazken geri kalan doku organ ve gelişme dönemlerine ait cDNA kütüphanelerinde amplikon oluşturduğu belirlenmiştir. Burada her örnekte kullanılan AGi043 primer setinin tüm cDNA'larda oluşturduğu PZR amplikonları tüm cDNA kütüphanelerinde yapılan PZR çalışmalarında bir problem olmadığını kanıtı olmuştur.



Şekil 4.24. MEP TiP II-AGi014. AGi014 ve AGi043 primer setlerinin internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve genomik DNA

AGi026 primer seti 363 bp büyüklüğünde amplikon oluşturduğu belirlendikten sonra internal kontrol olarak yine 265 bp büyüklüğünde monomorfik amplikonlar oluşturan AGi043 primer setinin kullanılması öngörülmüştür. AGi026 primer seti ile AGi043 primer seti ile internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların agaroz jel görüntüsü Şekil 4.25'de verilmiştir. Şekil 4.25'de görüldüğü gibi AGi026 primeri setinin kullanıldığı PZR sonucunda genç ve olgun yapraklarla birlikte tomurcuk, çiçek parçacıkları, genç kök, sap ve bütün tohum dokularında (15, 36, 65 ÇGS veya 5 yıllık tohumlarda) bu mikrosatellit lokusunda amplifikasyon ürünü mevcutken geri kalan doku organ ve gelişme dönemlerine ait cDNA kütüphanelerinde amplikon oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu primer seti (AGi026) ile birlikte aynı PZR reaksiyonu içerisinde kullanılan AGi043 primer setinin tüm cDNA'larda oluşturduğu PZR amplikonları cDNA kütüphanelerinde yapılan PZR reaksiyonlarında bir problem olmadığını göstermiştir.

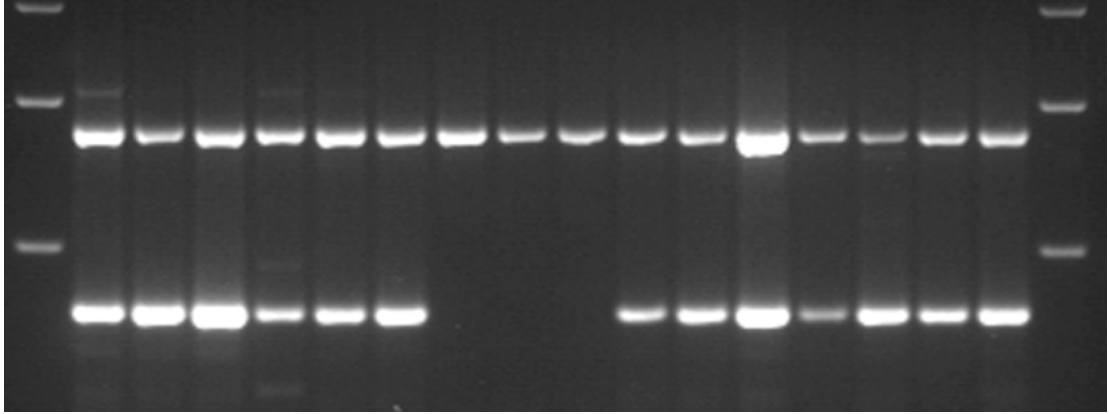


Şekil 4.25. MEP TiP II-AGi026. AGi026 AGi043 primeri setlerinin internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA’da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

MEP TiP II grubunda yer alan mikrosatellitleri taşıyan genlerin organ, doku veya gelişme dönemlerinde farklı ekspresyon gösterdikleri ve bu farklılığın agaroz jel elektroforez yönteminde varlık veya yokluk şeklinde görüldüğü bu çalışmada belirlenmiştir. Ancak yokluk (amplikonların agaroz jelde görülememiş olması) bu genlerin hiç ifade etmediği şeklinde yorumlanabilmesi ancak Real Time PZR çalışmaları ile belirlenebilir. Ancak bu çalışmada elde edilen verilerin mikrosatellit içeren genlerin dokular arasında farklı ifade olabileceklerini kesin bulgularla göstermekte ve bu hali ile bu tez kapsamında yayınlanmış bilimsel makale dışında mikrosatellitler organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü ifade edildikleri yönünde başka bir çalışma bulunmamaktadır (Ince vd 2010d).

AGi047 primer setinin 251 bp büyüklüğünde amplikon oluşturduğu saptandıktan sonra internal kontrol olarak 490 bp büyüklüğünde monomorfik amplikonlar oluşturan UBI primer setinin kullanılmıştır (Şekil 4.26). AGi047 primer setinin kullanıldığı PZR sonucunda genç ve olgun yapraklarla birlikte tomurcuk dokusunda bu mikrosatellit lokusunda amplifikasyon ürünü yokken geri kalan doku organ ve gelişme dönemlerine ait cDNA kütüphanelerinde 251 bp büyüklüğünde amplikonun varlığı tespit edilmiştir.

AGi047 primer seti ile birlikte aynı PZR reaksiyonu içerisinde kullanılan UBI primer setinin tüm cDNA'larda oluşturduğu PZR ampliconları cDNA kütüphanelerinde yapılan PZR reaksiyonlarında herhangi bir sorun olmadığı sonucunu vermiştir. AGi047 ampliconunda bulunan genin mikrosatellit içerdiği ancak bu genin biberde yaprak ve tomurcukta ifade etmediği öngörülmüştür.

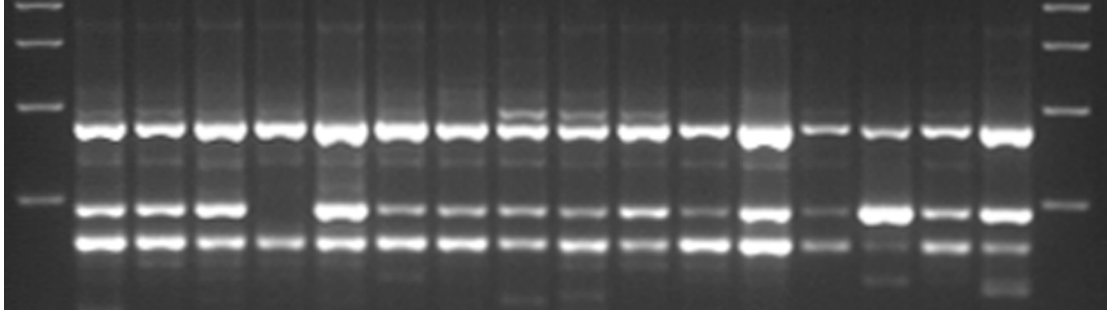


Şekil 4.26. AGi047 ve UBI primer seti ile internalli yapılan PZR. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

AGi103 primer setinin cDNA kütüphaneleri üzerinde 289 ve 270 bp büyüklüğünde iki adet amplicon oluşturduğu gözlenmiş, internal kontrol olarak 490 bp büyüklüğünde monomorfik ampliconlar oluşturan UBI primer setinin kullanılması kararlaştırılmıştır. AGi103 primer seti ile 16 cDNA ve genomik DNA'da meydana gelen ampliconların jel görüntüsü Şekil 4.27'de verilmiştir.

AGi103 primer setinden alınan PZR sonucunda sadece 15 ÇGS plaseenta dokusunda bu mikrosatellit lokusunda 289 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü alınmazken geri kalan tüm doku organ ve gelişme dönemlerine ait cDNA kütüphanelerinde iki adet (289-270 bp) büyüklüğünde amplifikasyon ürününün var olduğu saptanmıştır. Bu primer seti ile birlikte aynı PZR reaksiyonu içerisinde kullanılan UBI primer setinin tüm cDNA'larda oluşturduğu PZR ampliconları cDNA kütüphanelerinde yapılan PZR reaksiyonlarında herhangi bir sorun olmadığını

gösterdiği gibi 15 ÇGS plasenta dokusunda 270 bp büyüklüğünde ikinci amplikonun varlığı dikkat çekmiştir.



Şekil 4.27. MEP TiP II-AGi103. AGi103 UBI3 primer setlerinin internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA’da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

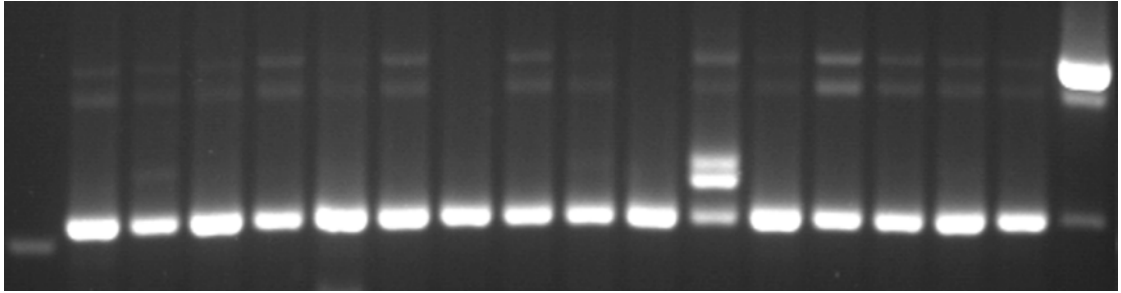
4.12.3. MEP TiP III

Mikrosatellit lokusuna ait amplikon paterninde 16 farklı cDNA kütüphanesi içerisinde bazı cDNA kütüphanelerinde ekstra bant oluşması (allelık varyasyon) durumunda MEP TiP III grubu meydana getirilmiştir (Çizelge 4.54). Bu gruba giren mikrosatellit lokuslarında cDNA amplikonları doku, organ ve gelişme dönemine özgü amplifikasyon gösterdikleri için bazı dokulara ait cDNA’larda mikrosatellit lokusunda bulunan ekstra bant doku, organ veya gelişme dönemine özgü markır olarak belirlenmiştir.

MEP TiP III grubunda AGi013, AGi016 primer çiftleri genç kök dokusunda diğer dokulardan farklı büyüklükte ekstra amplikon meydana getirirken AGi046 primer seti 15 ÇGS plasenta dokusunda diğer dokularda bulunmayan ekstra büyüklükte bir amplikon oluşturmuştur. Bu gruba giren primer çiftlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları amplikonlar ve bunların değerlendirilmesi sırasıyla yapılmıştır.

AGi013 primer setinin 16 cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturduğu amplikonların metafor agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.30'da sunulmuştur. AGi013 primer setinin mikrosatellit lokusunda 16 cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan PZR sonucu toplam 5 adet amplikon (270, 264, 170, 164, 158 bp) olduğu belirlenmiş bunlardan 3 adedinin genomik DNA üzerinde yapılan PZR sonucunda da elde edildiği saptanmıştır. Geri kalan 2 amplikonun ise sadece genç kök dokusuna özgü cDNA kütüphanesinde var olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan PZR'nun metafor agaroz jel elektroforez sonucu AGi013 primer seti ile çoğaltılan cDNA mikrosatellit lokusunda sadece genç kök dokusunda 170, 164 ve 158 bp büyüklüğünde 3 amplifikasyon ürünü elde edilirken geri kalan tüm doku organ ve gelişme dönemlerine ait cDNA kütüphanelerinde 158 bp büyüklüğünde tek amplifikasyon ürünü belirlenmiştir. Bu primer seti genomik DNA üzerinde 270, 264 ve 158 bp büyüklüğünde amplikonlar oluşturmuştur (Şekil 4.28).

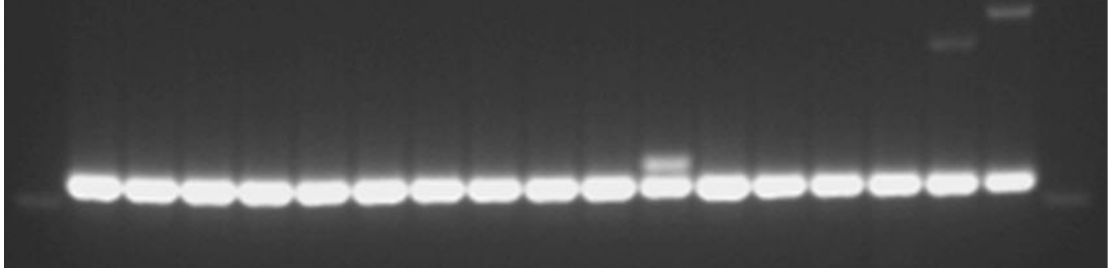


Şekil 4.28. MEP TiP III-AGi013. AGi013 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve genomik DNA

AGi013 amplifikasyon profili incelendiğinde genomik DNA'da ve diğer cDNA kütüphanelerinde yer almayan ancak genç kök dokusunda bulunan amplikonlar bulunmaktadır. Bu anlamda AGi013 primer seti kök dokusuna özgü amplikon verdiği görülmektedir. Bu çalışmada botanik açıdan incelendiğinde diğerlerinden oldukça farklı doku kök dokusudur. Bu durum genomik DNA üzerinde bulunan bir lokusun 15 farklı cDNA kütüphanesinde benzer ekspresyon göstermesine rağmen kök

dokusunda farklı ifade edebildiğini göstermektedir. Ancak bu tür gen regülasyonunda mikrosatellitlerin mi yoksa diğer bazı regülatör bölge veya genlerin mi etki ettiğini belirlemek için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (Dresselhaus vd 1999, Ayers vd 1997, Bao vd 2002).

AGi016 primer seti kullanılarak 16 cDNA kütüphanesinde yapılan PZR sonucu 165 ve 161 bp büyüklüğünde toplam 2 adet ampikon oluştuğu belirlenmiş bunlardan 1 adedinin (161 bp) genomik DNA üzerinde de bulunduğu saptanmıştır. Sadece genç kök dokusuna özgü cDNA kütüphanesinde var olan ekstra 165 bp büyüklüğündeki ampikon bu primer setinin çoğalttığı mikrosatellit lokusunda doku organ spesifik MEP TiP III ekspresyon profilinin göstergesi olmuştur (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. MEP TiP III-AGi016. AGi016 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA ve genomik DNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, , 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

AGi016 primeri seti ile çoğaltılan Demre Sivrisi biber çeşidinin genomik DNA’sı, PM687 biber çeşidi genomik DNA’sı, DS x PM687 genomik DNA’sı ve SA36 biber türü genomik DNA’sı üzerinde oluşturduğu ampikonlarda da ampikon büyüklüğü 161 bp olarak kaydedilmiştir. Bu durum AGi016 primer setinin kök dokusuna özgü ampikonun genomik DNA’da olmadığı ancak genomik DNA lokusunun transkripsiyonu sırasında RNA edisyonu veya alternatif siplisin regülasyonları ile oluşturulduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ancak bu yorumun doğruluğunun ve nedenlerinin başka bir çalışma ile teyit edilmesi gerekmektedir (Lue vd 1989, Dresselhaus vd 1999, Ayers vd 1997, Bao vd 2002, Krol vd 2007).

AGi046 primer seti kullanılarak 16 cDNA kullanılarak yapılan PZR sonucu 2 adet amplikon olduğu (371 ve 368 bp) belirlenmiş, bunlardan 368 bp büyüklüğünde bulunan amplikonun genomik DNA üzerinde de var olduğu görülmüştür. Dokular içerisinde yalnızca 15 ÇGS plasenta dokusuna ait cDNA kütüphanesinde var olan ekstra 371 bp büyüklüğünde bulunan amplikon doku organ spesifik ekspresyon profilini göstermiştir.

AGi046 ekspresyon profiline benzer mikrosatellit ekspresyonu AGi013 ve AGi016 primer setlerinde de görülmüştür. Dolayısı ile organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü bu ekspresyonların regülasyon mekanizmaları bu üç lokusta benzer olduğu öngörülmüştür. Mikrosatellit tekrar varyasyonunun çeltik'te yapılan çalışmalar da amilaz içeriği ile ilişkili olan waxy geninin 5'-UTR bölgesinde bulunan [GA/CT] tekrar sayısında meydana gelen değişimin genin transkripsiyonunu etkilediğini göstermiştir (Ayers vd 1997, Bao vd 2002). Ancak bu çalışmada elde edilen organ, doku ve gelişme dönemlerine özgü polimorfizme benzer bir sonuç literatürde bulunmamaktadır.

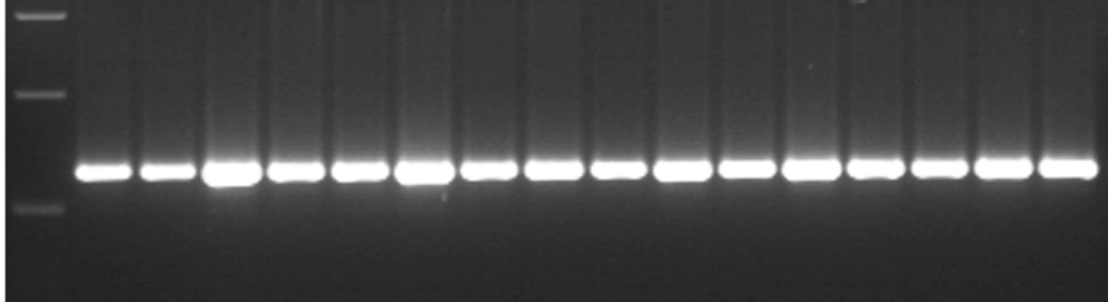
4.12.4. MEP TiP IV

Kullanılan primer çiftlerinin çoğalttığı mikrosatellit lokusuna ait amplikon paternlerinde 16 cDNA kütüphanesi arasında oluşan amplikonların yoğunluklarının farklı olması durumunda MEP TiP IV grubu oluşturulmuştur. Bu gruba giren mikrosatellit lokuslarında cDNA amplikonları doku, organ ve gelişme dönemine göre farklı yoğunlukta oldukları için bazı dokulara ait cDNA'larda mikrosatellit lokusunda bulunan bant yoğunlukları doku, organ veya gelişme dönemine özgü ekspresyon seviyesi farklılığı olarak değerlendirilmiştir.

MEP TiP IV grubunda AGi001, AGi002, AGi101, AGi116 primer çiftlerinin oluşturduğu amplikonlar yer almıştır. Bu gruba giren primer çiftleri cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları amplikon büyüklüklerine göre değerlendirilmiş ve aşağıda belirtilen iki alt gruba ayrılmıştır.

4.12.4.1. MEP TiP IVA

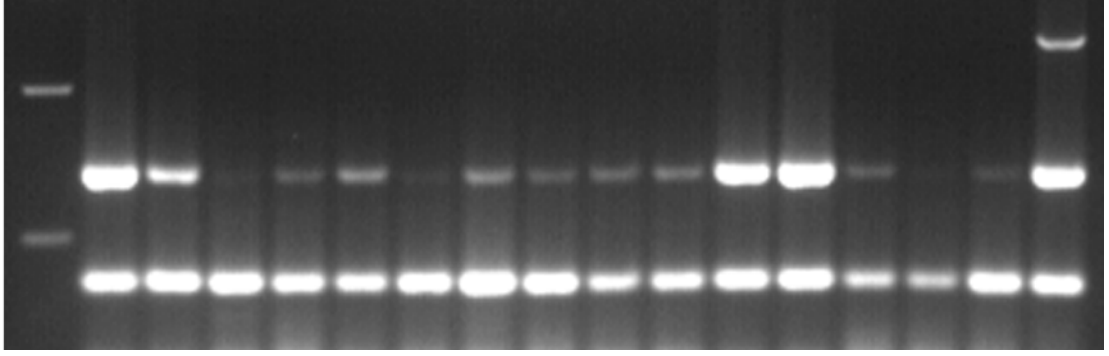
Kullanılan mikrosatellit lokusuna ait ampikon paternlerinde cDNA ve genomik DNA ampikon büyüklükleri aynı boyda ancak cDNA kütüphaneleri arasında yoğunluk farkı olanlar MEP TiP IVA alt grubu olarak değerlendirilmiştir. MEP Tip IVA grubunda AGi065, AGi101 ve AGi118 primer çiftleri yer almıştır (Çizelge 4.54). AGi065 primer setinin 16 cDNA üzerinde oluşturduğu ampikonların metafor agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.30'de verilmiştir. AGi065 primer setinin 16 cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan PZR analizleri sonucu 188 bp büyüklüğünde bir ampikon oluşturduğu görülmüş ve genomik DNA üzerinde aynı bant paternini bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.30. MEP TiP IVA-AGi065. AGi065 primer setinin yapılan PZR sonucu 16 cDNA'da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar ve olgun tohum

AGi065 primer setinin perikarp ve plasentanın 65 ÇGS döneminde daha fazla yoğun ampikon oluşturması ve bu fazla ampikon oluşumun üç farklı analizde de belirgin olarak görülmesi bu ampikonun temsil ettiği allelin biber meyvesinin olgun dönemlerinde daha fazla ifade edilen bir gen olabileceği öngörülmüştür. Bu öngörünün Real Time PZR analizleri ile teyit edilmesi gerekmektedir.

AGi101 primer setinin mikrosatellit lokusunda 16 cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan PZR sonucu 181 bp büyüklüğünde bir adet ampikon oluşturduğu görülmüş ve genomik DNA üzerinde aynı ampikon paterninin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. MEP TiP IVA-AGi101. AGi101 primer seti ile AGi100 primer seti ile internalli olarak yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar ve olgun tohum

AGi101 primer setinin dokular arasında elde edilen amplikonların yoğunluk farkının PZR’den kaynaklanmadığının kanıtı olarak AGi100 primer seti ile internalli olarak yapılan PZR sonucu çoğaltılan AGi101 cDNA mikrosatellit lokusunda amplikon yoğunluk farklılıkları değerlendirilmiştir.

AGi101 primer setinin oluşturduğu (Şekil 4.31) en yüksek amplikon yoğunluğu sap dokusunda, 15 ÇGS perikarp ve genç kök dokularında tespit edilmiştir. Diğer dokulardaki amplikon yoğunlukları incelendiğinde ise 15, 36 ve 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum, olgun tohum, 15 ve 36 ÇGS plaseenta, genç ve olgun yaprak dokularında eşit miktarda dağılım göstermiştir. Diğer taraftan en az amplikon yoğunluğu olanlar ise 65 ÇGS plaseenta ve 65 ÇGS perikarp dokuları olarak tespit edilmiştir. AGi101 primer seti ile çoğaltılan 15, 36 ve 65 ÇGS perikarp dokularında amplikon yoğunlukları değişim göstermiş, 15 ÇGS perikarp dokusundan elde edilen amplikon yoğunluğundan 65 ÇGS perikarp dokusu amplikon yoğunluğuna doğru aşamalı olarak azalttığı belirlenmiştir.

AGi101 mikrosatellit amplikonlarının farklı cDNA kütüphanelerinde oluşturdukları farklı ekspresyon yoğunlukları ve amplikonun genomik DNA’da var olması bu lokusun transkripsiyona alındığına ancak mRNA sentezinin özellikle sap, 15 ÇGS perikarp ve genç kök dokularında oldukça yüksek veya oluşturulan

mRNA'nın degradasyonunun bu dokularda oldukça yavaş gerçekleşirken yine aynı mRNA'nın 65 ÇGS plasenta ve 65 ÇGS perikarp dokularında daha kısa bir zamanda degradasyonunun gerçekleştiği veya ekspresyonunun daha yavaş gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Ancak bu öngörülerin teyit edilmesi gerekmektedir. Toutenhoofd vd (1998) mikrosatellitlerin gen ifadesine etkilerini araştırmışlar ve özellikle 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin gen transkripsiyonu üzerinde ya da gen regülasyonu üzerinde etki ettiklerini belirlemişlerdir. İnsanda bulunan calmodulin-1 (hCALM 1) geninin 5'-UTR bölgesinde düzenli bir şekilde [CAG]⁷ tekrarı sayısında meydana gelen bir azalmanın gen ekspresyon seviyesini %45 azalttığı Toutenhoofd vd (1998) tarafından bildirilmiştir. Ancak bu tez çalışmasında AGi101 mikrosatellit tekrar içeriğinde bir farklılık tespit edilemediğinden farklı bir gen regülasyon mekanizmasının var olduğu öngörülmüştür.

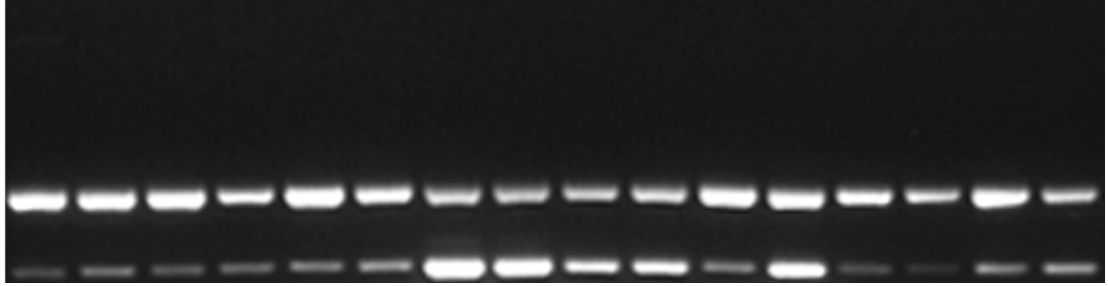
AGi118 primer setinin mikrosatellit lokusunda 16 cDNA ve genomik DNA üzerinde yapılan PZR sonucu 210 bp büyüklüğünde bir adet ampikon oluşturduğu saptanmıştır. AGi118 primeri setinin kullanıldığı PZR sonucunda en yüksek miktarda ampikon yoğunluğu oluşturan dokunun genç yaprak dokusu olduğu saptanmıştır. Diğer dokular içerisinde 36 ÇGS perikarp ve plasenta dokuları ile 65 ÇGS olgunlaşmamış ve olgun tohum dokularında en az ampikon yoğunluğu elde edilmiştir.

4.12.4.2. MEP TiP IVB

Mikrosatellit ekspresyon profiline göre her dokuda ampikon oluşturmaya rağmen dokular arasında ampikon yoğunlukları arasında fark bulundurarak bu gruba giren primer çiftlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları ampikon büyüklükleri farklı olanlar MEP TiP IVB alt grubuna dahil edilmiştir (Çizelge 4.54). MEP TiP IVB grubunda AGi001 ve AGi002 primerler setleri bu grup altında yer almıştır.

AGi001 primer seti ile 16 cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan PZR sonucu bir adet ampikon (180 bp) oluşturduğu belirlenmiştir. Genomik DNA üzerinde yapılan tarama sonucu ise 1200 bp büyüklüğünde ampikon oluşturduğu tespit edilmiştir.

Genomik DNA ve cDNA büyüklükleri arasında meydana gelen ampikon büyüklüğü farkının genomik DNA üzerinde intron bölgesinde bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bu öngörü sekans analizleri ve restriksiyon enzim analizleri ile teyit edilmiştir (Şekil 4.32).

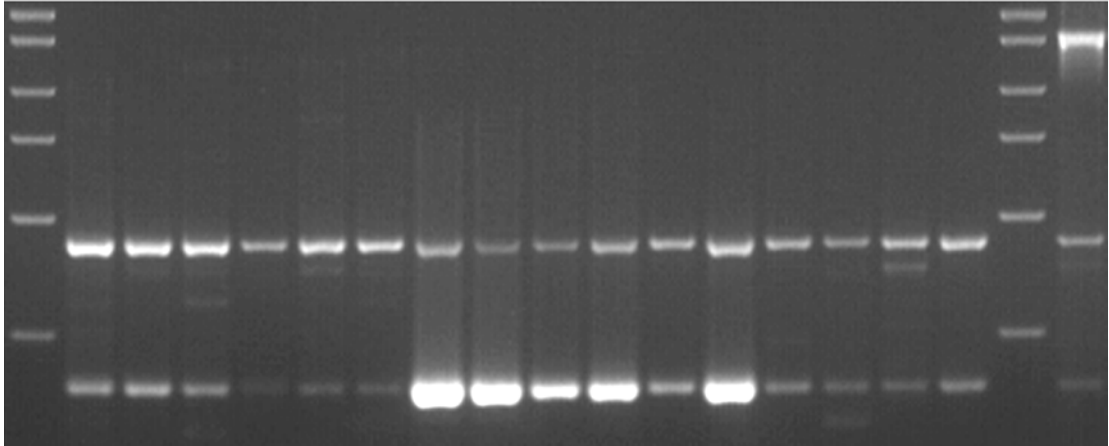


Şekil 4.32. MEP TiP IVB-AGi001. AGi001 AGi043 primer setlerini internalli olarak yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar ve olgun tohum

AGi001 primer seti 180 bp büyüklüğünde ampikon oluşturduğu belirlendikten sonra doku, organ ve gelişme dönemlerine göre meydana gelen ampikon yoğunluklarının PZR kaynaklı olmadığını görmek için internal kontrol olarak 265 bp büyüklüğünde monomorfik ampikonlar oluşturan AGi043 primer setinin kullanılmıştır. AGi001 primer setinin AGi043 primer seti ile internalli yapılan PZR sonucu 16 cDNA üzerinde oluşan ampikonların metafor agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.32’de sunulmuştur. Agaroz jel analizleri ile kütüphaneler arası ampikon yoğunluklarının PZR hatası olmadığı tespit edilmiştir.

AGi001 primeri setinin kullanıldığı PZR sonucunda en yüksek miktarda ampikon yoğunluğu oluşturan dokuların genç ve olgun yapraklar olduğu belirlenmiş bu dokuları sap dokusunda meydana gelen ampikon yoğunluğu takip etmiştir. Geri kalan dokular içerisinde tomurcuk ve çiçek parçacıkları dokularına ait ampikon yoğunluğu diğerlerine göre yüksek miktarda elde edildiği halde perikarp, plasenta, kök, olgunlaşmamış ve olgun tohum dokularında çok az seviyede ampikon yoğunluğu elde edilmiştir.

AGi002 primer seti ile 16 cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan PZR sonucu 245 bp büyüklüğünde bir adet ampikon meydana getirdiği genomik DNA üzerinde ise 1500 bp büyüklüğünde ampikon oluşturduğu saptanmıştır. AGi001 primer setinde olduğu gibi genomik DNA ve cDNA arasındaki ampikon büyüklüğü farkı genomik DNA üzerinde intron bölgelerinin varlığı nedeniyle oluşan ampikonların büyük olduğu sonucuna varılmıştır. AGi002 primer seti doku, organ ve gelişme dönemlerine göre elde edilen ampikon yoğunlukları farkının PZR reaksiyon hatası nedeniyle olmadığını belirlemek için internal kontrol olarak 490 bp büyüklüğünde monomorfik ampikonlar oluşturan ilk olarak UBI primer seti (Şekil 4.33) kullanılmıştır. Internal kontrol olarak kullanılan UBI primer seti ve AGi002 primer setlerinin oluşturduğu ampikonların incelenmesi ile yine yoğunluk farkının PZR hatası olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.33. MEP TiP IVB-AGi002. AGi002 ve UBI3 primer setlerinin yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, PZR büyüklük markırı ve genomik DNA

AGi002 primer setinin kullanıldığı PZR sonucunda elde edilen bulgulara göre en yüksek miktarda ampikon yoğunluğu AGi001’den elde edilen sonuçlarla benzer sonuçlar vererek genç ve olgun yapraklarda gözlenmiş bu dokuları sap, tomurcuk, çiçek parçacıkları dokularında oluşan ampikon yoğunluğu izlenmiştir. Geri kalan

dokular içerisinde perikarp, plasenta, kök, olgunlaşmamış ve olgun tohum dokularında ya hiç ya da çok az seviyede amplikon yoğunluğu saptanmıştır (Şekil 4.33).

4.12.5. MEP TiP V

Mikrosatellit lokusuna ait amplikon paterninin 16 cDNA kütüphanesi içerisinde tekrar sayısı farklılığı durumunda meydana gelen polimorfik amplikon profili MEP TiP V grubu mikrosatellit ekspresyon profile adı altında incelenmiştir (Çizelge 4.54). Bu gruba dahil olan mikrosatellit lokuslarında cDNA amplikonları doku, organ ve gelişme dönemine özgü amplifikasyon gösterdikleri için bazı dokulara ait cDNA'larda mikrosatellit lokusunun farklı amplikon sayısı ve farklı amplikon büyüklüğü nedeni ile MEP TiP V grubu oluşturulmuştur.

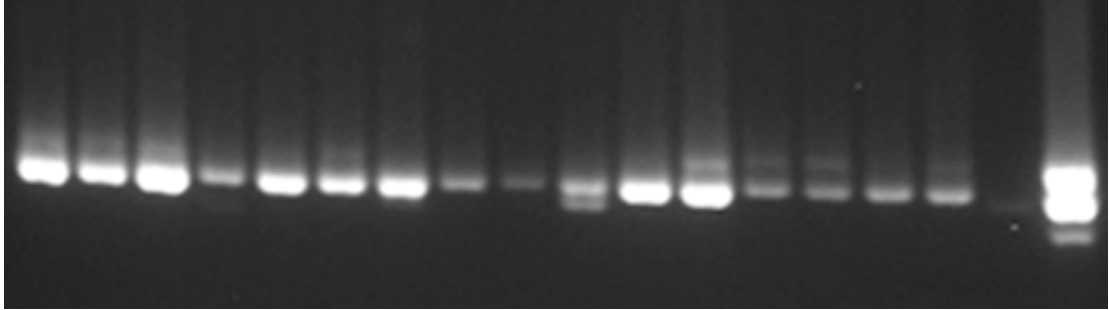
AGi primer setlerinden AGi010, AGi030, AGi039, AGi041, AGi064, AGi070, AGi078, AGi090, AGi091, AGi094 ve AGi117 bu grupta yerini almıştır. MEP TiP V ekspresyon profiline giren bu grup diğer bazı ekspresyon profillerinde olduğu gibi iki alt gruba ayrılmıştır (MEP TiP VA ve MEP TiP VB).

4.12.5.1. MEP TiP VA

Bu alt grupta yer alan primer çiftlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri aynı ama bazı dokulara özgü ve genomik DNA'da bir lokusun varlığı veya yokluğu dikkati çekmiştir. Bu grupta AGi010, AGi030, AGi039, AGi070, AGi078 ve AGi094 primer çiftlerinin oluşturduğu amplikonlar yer almaktadır.

AGi010 primer setinin oluşturduğu toplam 3 adet amplikondan 290 bp büyüklüğünde bulunan en küçük amplikon sadece genomik DNA ve çiçek parçacıklarına ait cDNA kütüphanesinde var olduğu tespit edilmiştir. Tüm cDNA kütüphanelerinde ve genomik DNA üzerinde etkin şekilde 305 bp büyüklüğünde amplikonun var olduğu görülmüştür. Ayrıca 320 bp büyüklüğünde elde edilen amplikonun bütün olgunlaşmamış tohum (15, 36, 65 ÇGS) dokularında, beş yıllık

olgun tohum, sap ve tüm perikarp dokularında (15, 36, 65 ÇGS) bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.34).

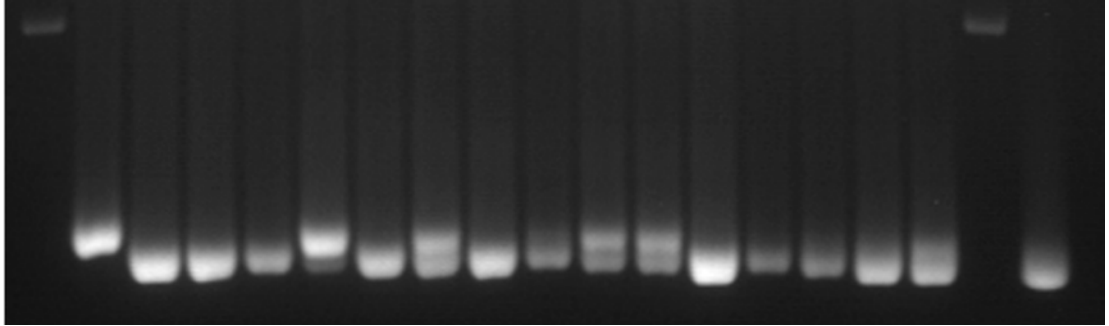


Şekil 4.34. MEP TiP VA-AGi010. AGi010 primer setlerinin yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, PZR büyüklük markırı ve genomik DNA

AGi010 primer setinin genomik DNA kalıp olarak kullanıldığında toplam 3 adet amplicon verdiği ancak bu ampliconlardan birinin hiçbir cDNA’da bulunmaması nedeni ile bu allelin transkripsiyona alınmadığı öngörülmüştür. Genomik DNA üzerinde bulunan diğer iki amplicon ise organ, doku veya gelişme dönemleri açısından bazı kütüphanelerde yer almış ve bazı kütüphanelerde ise tespit edilememiştir. Bu durum cDNA kütüphanelerinde genomik DNA kontaminasyonunun bulunmadığını teyit etmesi yanında transkripsiyona alınan mikrosatellit lokuslarının çok allelli olduklarını da göstermektedir.

AGi030 primer seti kullanılarak yapılan PZR çalışmaları sonucunda agaroz jel elektroforez işlemi sonucu elde edilen görüntüsünde toplam 3 adet (356, 344, 342 bp) amplicon oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.35). AGi030 primer setiyle elde edilen 3 amplikondan sadece 2 adedinin (356 bp, 344 bp) 36 ÇGS plaseenta, genç yaprak, çiçek parçacıkları, kök, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 5 yıllık olgun tohum dokularında mevcut olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan 3 amplikondan sadece biri (344 bp) 36 ve 65 ÇGS perikarp, 15 ve 65 ÇGS plaseenta, olgun yaprak, çiçek tomurcuğu, 15 ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum dokularında saptanmıştır. Sap dokusu üzerinde 342 bp

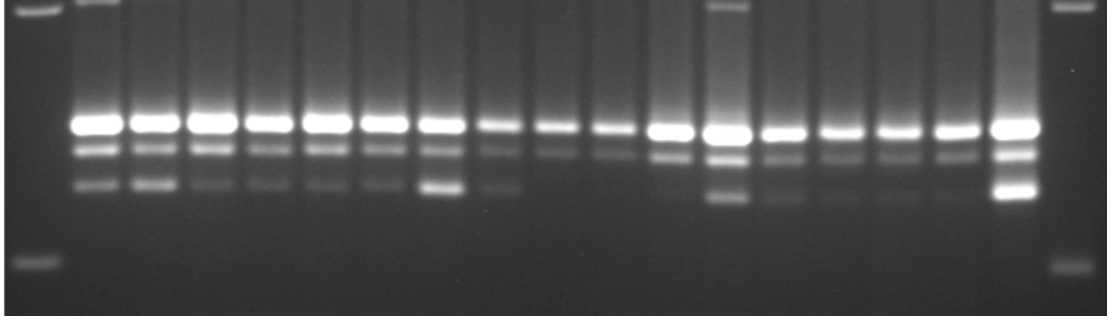
büyükliğünde bir amplikon meydana getirirken 15 ÇGS perikarp üzerinde sadece 356 bp büyüklüğünde bir amplikon oluşturmuştur.



Şekil 4.35. MEP TiP VA-AGi030. AGi030 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, PZR büyüklük markırı ve genomik DNA

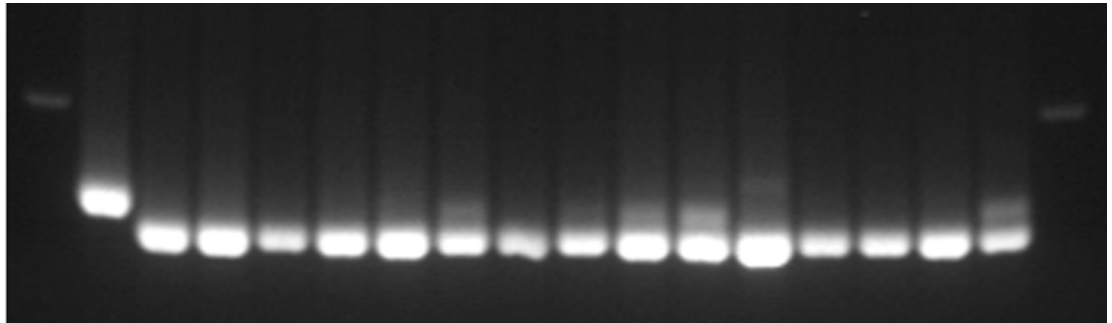
MEP TiP VA mikrosatellit profiline dahil edilen AGi030 primer seti diğer MEP setlerinden farklı olarak mikrosatellit DNA’nın cDNA kütüphanelerinde etkin bir allelik polimorfizm oluşturabileceğini ve polimorfizmin varlık veya yokluk, veya amplikon densitesi yanında tekrar farkları ile organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü polimorfizm oluşturabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

AGi039 primer seti kullanıldığında PZR’de toplam 3 adet (240, 219 ve 208 bp) amplikon oluşturmuş ve en küçük amplikon olan 208 bp büyüklüğünde bulunan amplikonun tomurcuk ve çiçek parçacıklarına ait cDNA kütüphanesinde var olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.36). AGi039 primer seti kullanılan tüm cDNA kütüphanelerinde ve genomik DNA üzerinde etkin şekilde 240, 219 bp büyüklüğünde amplikonlar oluşturmuştur. AGi039 primer seti ile çoğaltılmış olan transkriptlerin temsil ettiği iki farklı genin veya homolog genlerin bütün kütüphanelerde ekspresyonunun gerçekleştirildiği, üçüncü bir allel veya genin ise belirli organ doku veya gelişme dönemine özgü ifade ettiğini göstermiştir. AGi039 primer setinin oluşturduğu 3. allelde çiçek, tomurcuk, kök dokuları ile 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve 5 yıllık olgun tohum dokularında mikrosatellit içeren bir transkript üretmedikleri tespit edilmiştir.



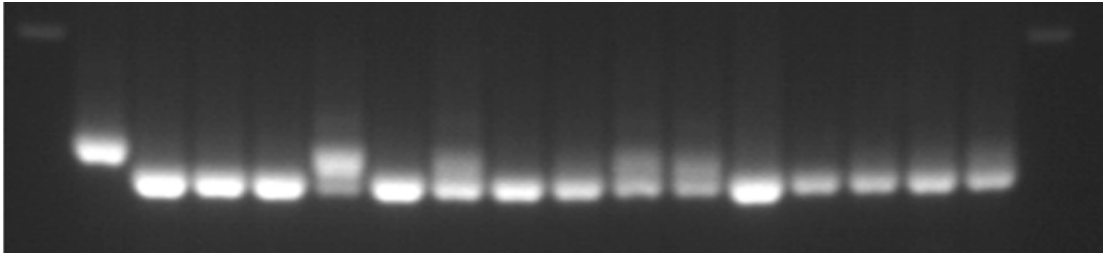
Şekil 4.36. MEP TiP VA-AGi039. AGi039 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum, genomik DNA ve PZR büyüklük markırı

AGi070 primer setinin cDNA kütüphaneleri üzerinde 269 ve 259 bp büyüklüğünde toplam 2 adet amplikon oluşturduğu belirlenmiştir. Genç yaprak, çiçek tomurcuğu, çiçek parçacıkları, kök, olgun tohum ve genomik DNA üzerinde her iki amplikonun bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.37). Sadece 15 ÇGS perikarp dokusu haricinde bulunan bütün dokularda 259 bp büyüklüğünde bulunan küçük bant bulunmuştur. AGi070 primer setiyle çoğaltılan dokulardan yalnızca 15 ÇGS perikarp dokusuna ait cDNA kütüphanesinden 269 bp büyüklüğünde tek amplikon elde edilmiştir. AGi070 primer setinin amplifikasyon profili yönünden AGi030 primer setine benzediği ancak AGi030 amplikonlarının daha fazla polimorfik oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.37. MEP TiP VA-AGi070. AGi070 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA'da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve PZR büyüklük markırı

AGi078 primer seti ile çoğaltılan cDNA kütüphanelerinde 2 adet ampikon elde edilmiştir. Ampikon büyüklükleri 260 bp ve 250 bp olarak belirlenmiş, yalnızca 15 ÇGS perikarp dokusuna ait cDNA kütüphanesi de ampikon yoğunluğu yüksek 260 bp büyüklüğünde tek bir ampikon belirlenmiştir. AGi078 primer setiyle elde edilen çift ampikonların ise (260 bp, 250 bp) 36 ÇGS plasenta, genç yaprak, çiçek parçacıkları ve kök dokularında var olduğu saptanmıştır (Şekil 4.38).



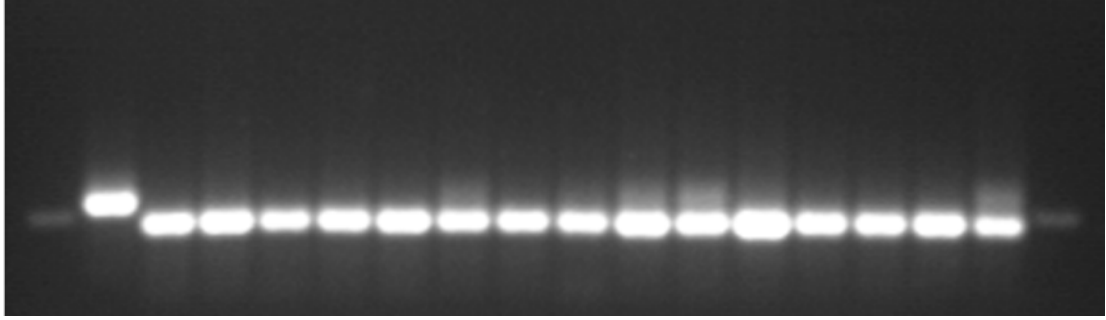
Şekil 4.38. MEP TiP VA-AGi078. AGi078 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum, olgun tohum ve PZR büyüklük markırı

Dokular içerisinde AGi078 primer seti ile 36 ÇGS plasenta dokusunda 260 bp büyüklüğünde bulunan ampikon yoğunluğu yüksek iken 250 bp büyüklüğünde bulunan ampikon yoğunluğu alt seviyede olduğu belirlenmiştir. Çiçek tomurcuğu ve kök dokularında her iki ampikon yoğunluğunun birbirine eşit düzeyde amplifiye olduğu gözlenmiştir. Geri kalan dokularda ise 250 bp büyüklüğünde bir ampikon meydana geldiği belirlenmiştir. Ampikonlar içerisinde 36 ÇGS plasenta ampikonları dikkat çekmektedir. Bu dokuda her iki ampikon farklı düzeyde ifade etmişken diğer dokularda ya eşit düzeylerde ya da allellerden sadece bir ifade edilmektedir. Biberde çiçeklenmeden 36 gün sonrası dönem gerek meyve gerekse tohum fizyolojisi açısından kritik bir dönem olması nedeni ile bu amplifikasyon paterni dikkati çekmektedir (Portis vd 1999).

AGi094 primer setinin cDNA kütüphaneleri üzerinde toplam 2 adet ampikon (156 ve 146 bp) oluşturduğu belirlenmiştir. Sadece 15 ÇGS perikarp dokusu haricinde bulunan bütün dokularda 146 bp büyüklüğünde bulunan küçük boyutlu tek ampikon

bulunmuştur. AGi094 primer setiyle çoğaltılan cDNA kütüphanelerinden yalnızca 15 ÇGS perikarp dokusuna ait cDNA kütüphanesinden 156 bp büyüklüğünde tek ampikon elde edilmiştir (Şekil 4.39).

AGi094 primer seti ile çoğaltılan transkriptin temsil ettiği genin iki farklı alleli olduğu bu allellerden birinin sadece 15 ÇGS perikarpta transkripsiyona alındığı diğer allelin ise 15 ÇGS perikarp dışındaki bütün organ, doku veya gelişme döneminde var olduğunun tespiti ile AGi094 primer setinin biber kütüphanelerinden 15 ÇGS perikarpa ait kütüphanenin teşhisinde kullanılabileceği öngörülmüş ve bu tür mikrosatellit analizlerinin ise doku fingerprinting kullanılabileceği öngörülmüştür.



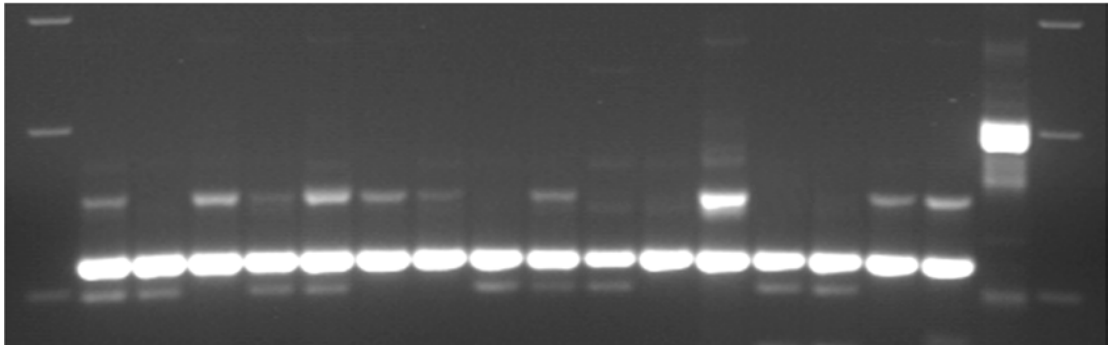
Şekil 4.39. MEP TiP VA-AGi094. AGi094 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohumlar, olgun tohum ve PZR büyüklük markırı

4.12.5.2. MEP TiP VB

MEP TiP VB grubunda yer alan primer setlerinin cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdukları amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bu grupta AGi041, AGi064, AGi090, AGi091 ve AGi117 primer setlerinin amplifikasyon ürünleri yer almaktadır (Çizelge 4.54). AGi041 primer seti tüm cDNA kütüphaneleri üzerinde toplam 3 adet ampikon (221, 165 ve 148 bp) oluşturmuştur (Şekil 4.40).

AGi041 primer seti sap dokusuna ait cDNA kütüphanesinde 221 bp büyüklüğünde oluşturduğu ampikon yoğunluğunun yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. Aynı

amplikon için 15 ÇGS ve 65 ÇGS perikarp, 36 ÇGS ve 65 ÇGS plasenta, çiçek tomurcuğu, 65 ÇGS tohum ve olgun tohum dokularında orta seviyede 15 ÇGS plasenta ve genç yaprak dokularında ise bazal seviyede amplikon yoğunluğuna sahip oldukları görülmüştür. Bu amplikonun 36 ÇGS perikarp, olgun yaprak, çiçek tomurcuğu, kök, 15 ÇGS ve 36 ÇGS olgunlaşmamış tohum dokularında var olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca genomik DNA üzerinde de 221 bp büyüklüğünde bir amplikon oluşturmamıştır.



Şekil 4.40. MEP TiP VB-AGi041. AGi041 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum, olgun tohum ve genomik DNA, PZR büyüklük markırı

AGi041 primer seti kullanılarak tüm cDNA kütüphanelerinde elde edilen 165 bp büyüklüğündeki amplikon bütün dokularda yüksek seviyede amplifikasyon oluşturmuşken genomik DNA üzerinde de bu büyüklükte bir amplikon oluşturmamıştır. Ayrıca sadece 65 ÇGS perikarp, 65 ÇGS plasenta, genç yaprak, kök, sap, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve olgun tohum dokularında mevcut olmayan diğer dokularda ise bazal düzeyde ifade bulan 148 bp büyüklüğünde üçüncü amplikonun var olduğu saptanmıştır. Genomik DNA üzerinde ise tüm tarama sonuçları dikkate alınarak sadece 305 bp büyüklüğünde bir amplikon oluşturduğu tespit edilmiştir.

AGi041 primer setinin oluşturduğu amplikonlar incelendiğinde genomik DNA’da olmayan ancak cDNA bulunan amplikonların varlığı dikkati çekmektedir. Bu farklılık çalışmada kullanılan cDNA kütüphanelerinde genomik DNA kontaminasyonunun

olmadığını göstermesi yanında mikrosatellitlerin gen regülasyonunda görev aldıklarını da göstermektedir. Genomik DNA’da büyük bir ampikonun cDNA’da daha küçük ve polimorfik ampikonların varlığı mikrosatellit alanının bu allellerin UTR bölgesinde olduğu işaret etmektedir. Hulzink vd (2002) araştırmalarında *ntp303* geninin 5’-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin transkripsiyon etkinliğinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Martienssen ve Colot (2001) *Arabidopsis* genlerinin 5’-UTR bölgelerinde bulunan [AG]_n tekrarlarının bu genlerin antisens transkripsiyonunu etkilediğini tespit etmişlerdir.

AGi064 primer seti cDNA kütüphaneleri üzerinde toplamda 4 adet ampikon (172, 170, 166 ve 164 bp) üretirken genomik DNA üzerinde 1439 bp büyüklüğünde yalnızca bir adet ampikon oluşturduğu tespit edilmiştir. cDNA kütüphaneleri üzerinde AGi064 primer seti ile yapılan PZR çalışmaları sonucu 15 ÇGS perikarp, kök ve olgun tohum dokularında 4 ampikon profili yer alırken 15 ve 36 ÇGS plasenta, genç yaprak ve sap dokularında 3 ampikon profili yer almıştır. Geri kalan dokuların tamamında ise çift ampikon profili gözlenmiştir.

AGi064 primer seti ile çoğaltılan cDNA kütüphanelerinin tamamında en yoğun sap dokusunda olmak üzere 172 bp büyüklüğünde ampikonun varlığı saptanmıştır. Perikarp dokusundan 15 ÇGS gelişme dönemine ait cDNA kütüphanesinin yanı sıra 15 ve 36 ÇGS plasenta, genç yaprak, kök, sap ve olgun tohum dokularında en yoğun sap dokusunda olmak üzere diğer dokularda bazal seviyede 170 bp büyüklüğünde ikinci ampikonun var olduğu görülmüştür. cDNA kütüphanelerinin oluşturulduğu dokuların tamamında yüksek yoğunlukta 166 bp büyüklüğünde ampikon olduğu tespit edilmiştir. Dördüncü 164 bp büyüklüğünde olan ampikonun sadece 15 ÇGS perikarp, genç kök ve olgun tohum dokularında var olduğu belirlenmiştir.

AGi090 primer seti cDNA kütüphaneleri üzerinde 4 ampikon üretmiş ve ampikon büyüklükleri 280, 277, 270 ve 268 bp arasında değişmiştir. Genomik DNA üzerinde ise 2000 bp büyüklüğünde bir adet ampikon oluşturduğu görülmüştür. AGi090 primer seti ile 15 ÇGS perikarp, 15 ve 36 ÇGS plasenta, ve sap dokularında 3 ampikon profili geri kalan dokularda ise 2 ampikon profili gözlenmiştir. Bu primer

seti ile çoğaltılan cDNA kütüphanelerinden sap dokusuna ait cDNA kütüphanesinde 280 ve 277 bp büyüklüğünde ampliconlar yoğun diğer dokuların genelinde ise 270 bp büyüklüğünde bulunan ampliconlar daha yoğun olduğu belirlenmiştir.

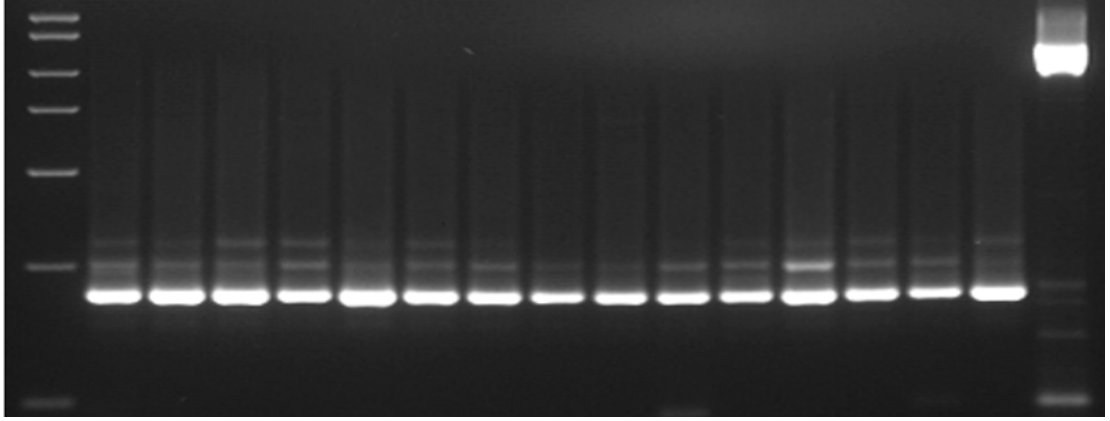
AGi090 primer seti ile 15 ÇGS gelişme döneminde bulunan perikarp dokusunun cDNA kütüphanesi haricinde bulunan tüm cDNA kütüphanelerinde 280 bp büyüklüğünde amplicon varlığı tespit edilmiştir. Analiz edilen tüm cDNA kütüphanelerinde 270 bp büyüklüğünde bulunan ampliconun mevcut olduğu saptanırken 277 bp büyüklüğünde olan ampliconun yalnızca 15 ÇGS perikarp, 15 ve 36 ÇGS plasenta ve sap dokularında bulunduğu görülmüştür. Yine 268 bp büyüklüğünde bulunan ampliconun sadece 15 ÇGS perikarp ve kök dokularında var olduğu tespit edilmiştir.

AGi091 primer seti çalışmada kullanılan cDNA kütüphaneleri üzerinde 275, 273, 256 ve 254 bp olarak toplam 4 amplicon meydana çıkarmıştır. Genomik DNA üzerinde ise çift amplicon (1600 ve 800 bp) oluşturduğu saptanmıştır. Yapılan PZR analizi elde edilen sonuçlara göre sadece 15 ÇGS perikarp dokusunda 3 amplicon diğer dokularda ise 2 bant profili gözlenmiştir. Bu primer seti ile 15 ÇGS perikarp dokusu haricinde bulunan bütün cDNA kütüphanelerinde 275 bp büyüklüğünde ampliconun var olduğu belirlenirken yalnızca 15 ÇGS perikarp dokusu üzerinde 273 bp ve 254 bp büyüklüğünde ampliconların mevcut olduğu saptanmıştır. Tüm cDNA kütüphanelerinde ise 256 bp büyüklüğünde bulunan amplicon tespit edilmiştir.

AGi091 primer seti ile analiz edilen cDNA kütüphanelerinden sap dokusuna ve 15, 36 ÇGS plasenta dokularına ait cDNA kütüphanesinde 275 bp büyüklüğünde ampliconlar yoğun iken 36, 65 ÇGS perikarp, genç yaprak ve olgun tohum dokularında 256 bp büyüklüğündeki ampliconların diğerlerine göre yoğun olduğu saptanmıştır. Bunların haricinde kalan cDNA kütüphanelerinde ise amplicon yoğunluğu birbirlerine eşit düzeyde olduğu belirlenmiştir.

AGi117 primer setinin cDNA kütüphaneleri üzerinde 312, 302 ve 290 bp büyüklüğünde 3 adet amplicon oluşturduğu görülmüştür. Tüm perikarp dokuları başta

olmak üzere 36 ÇGS plasenta, sap ve olgun tohum dokularında en yüksek yoğunlukta 290 bp büyüklüğünde bulunan ampikon yoğunluğu bulunurken diğer dokularda bu ampikon yoğunluğu daha az ve birbirlerine eşit olarak saptanmıştır (Şekil 4.41). Bir diğer ampikon olan 312 bp büyüklüğünde elde edilen ampikon ise olgun yaprak, çiçek tomurcuğu ve çiçek parçacıkları dokuları haricinde kalan tüm dokularda bazal düzeyde amplifikasyon göstermiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. MEP TiP VB-AGi117. AGi117 primer seti ile yapılan PZR sonucu 16 cDNA’da oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü. Sırasıyla soldan sağa PZR büyüklük markırı, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS perikarplar, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS plasentalar ve genç yaprak, olgun yaprak, tomurcuk, çiçek parçacıkları, kök, sap, 15 ÇGS, 36 ÇGS, 65 ÇGS olgunlaşmamış tohum ve genomik DNA

Çizelge 4.54. MEP göre mikrosatellit primer çiftlerinin dağılımı

MEP	ID	MB	MEP	ID	MB
TIP IA	AGi003	[CTTC] ₄	TIP IB	AGi044	[CT] ₁₀
TIP IA	AGi004	[AT] ₁₂	TIP IB	AGi049	[CCTCT] ₄
TIP IA	AGi005	[TGCAA] ₄	TIP IB	AGi051	[CTTC] ₅
TIP IA	AGi007	[AATT] ₄	TIP IB	AGi053	[AT] ₁₀
TIP IA	AGi012	[AAAAAT] ₄	TIP IB	AGi060	[ATA] ₇
TIP IA	AGi015	[AAAG] ₄	TIP IB	AGi062	[TCT] ₈
TIP IA	AGi008	[AT] ₁₀	TIP IB	AGi071	[CCACGA] ₄
TIP IA	AGi009	[GATT] ₅	TIP IB	AGi083	[CAT] ₆
TIP IA	AGi020	[AAGG] ₄	TIP IB	AGi088	[CT] ₁₁
TIP IA	AGi023	[CAA] ₇	TIP IB	AGi092	[CAT] ₈
TIP IA	AGi029	[ATCA] ₄	TIP IB	AGi095	[CAT] ₉
TIP IA	AGi031	[AGA] ₇	TIP IB	AGi102	[GGA] ₁₄
TIP IA	AGi033	[CAA] ₉	TIP IB	AGi105	[GAA] ₁₂
TIP IA	AGi038	[GAAGAG_TGA] ₄₋₇	TIP IC	AGi021	[TTTA] ₄
TIP IA	AGi042	[AAC] ₇	TIP IC	AGi027	[TTTA] ₄
TIP IA	AGi043	[GT] ₁₀	TIP IC	AGi032	[CTT] ₁₀
TIP IA	AGi045	[CAA] ₇	TIP IC	AGi100	[TTC] ₁₀
TIP IA	AGi048	[TTC] ₇	TIP IC	AGi111	[CT] ₁₃
TIP IA	AGi052	[AGA] ₇	TIP IIA	AGi014	[AT] ₁₃
TIP IA	AGi054	[TTC] ₇	TIP IIA	AGi026	[ACC] ₇
TIP IA	AGi055	[AAAACA] ₅	TIP IIA	AGi047	[TTCT] ₅
TIP IA	AGi056	[AGA] ₉	TIP IIA	AGi103	[AG] ₁₉
TIP IA	AGi057	[ATT.AAG] ₈₋₆	TIP III	AGi013	[ACACAG] ₅
TIP IA	AGi068	[TTG] ₈	TIP III	AGi016	[AATT] ₅
TIP IA	AGi080	[CAT] ₇	TIP III	AGi046	[TAA] ₇
TIP IA	AGi086	[CTG] ₁₃	TIP IVA	AGi001	[TCT] ₇
TIP IA	AGi096	[CAT] ₇	TIP IVA	AGi002	[TCT] ₇
TIP IA	AGi098	[AGA] ₁₂	TIP IVB	AGi065	[TAAT] ₅
TIP IA	AGi104	[CTG] ₁₃	TIP IVB	AGi101	[TCA] ₁₃
TIP IA	AGi108	[CAA] ₁₂	TIP IVB	AGi118	[TCT] ₇
TIP IA	AGi110	[TCA] ₁₃	TIP VA	AGi010	[TTCGGG] ₄
TIP IA	AGi112	[ATC] ₁₆	TIP VA	AGi030	[CA] ₁₁
TIP IA	AGi113	[CAA] ₁₄	TIP VA	AGi039	[CCCGAA] ₅
TIP IA	AGi115	[TCA] ₁₀	TIP VA	AGi070	[CT] ₁₄
TIP IA	AGi120	[TTTTTC] ₄	TIP VA	AGi078	[CA] ₁₁
TIP IA	AGi121	[CA] ₁₅	TIP VA	AGi094	[CT] ₁₄
TIP IA	AGi124	[AT] ₁₄	TIP VB	AGi041	[TA] ₁₅
TIP IA	AGi126	[TGA] ₂₂	TIP VB	AGi064	[TC] ₁₅
TIP IA	AGi127	[AT] ₁₆	TIP VB	AGi090	[TC] ₁₅
TIP IB	AGi019	[AAG] ₇	TIP VB	AGi091	[TC] ₁₅
TIP IB	AGi028	[CTGCTC] ₄	TIP VB	AGi117	[TTTC] ₄
TIP IB	AGi040	[CGTGAC] ₄			

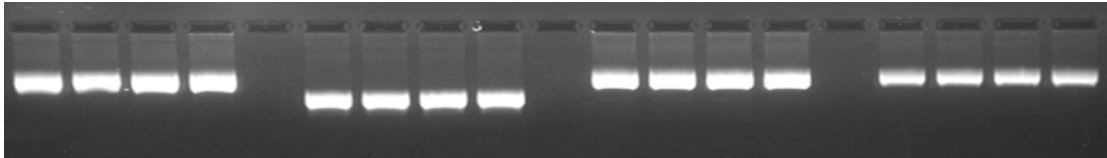
MEP: mikrosatellit ekspresyon profili, MB: mikrosatellit motif bölgesi

4.13. MEP Grubu Amplikonların Sekans Analizleri

AGi mikrosatellit primer setlerinin 16 cDNA ve genomik DNA üzerinde oluşturdıkları paternlere göre belirlenmiş olan MEP gruplarının karakterizasyonu için kütüphaneler içerisinde polimorfizm gösteren amplikonlar klonlanarak sekans dizileri belirlenmiş ve biyoinformatik yaklaşımlarla MEP gruplarının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.13.1. MEP grubu amplikonların klonlanması

MEP gruplarından klonlanması planlanan amplikonlar uygun AGi primer seti ile 4 tekerrürlü PZR çalışmaları yürütülmüş ve agaroz jel elektroforez görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.42). Agaroz jel elektroforez görüntüsünde tek bant olması ve spesifik olmayan amplikonların elimine edilmesi tüm klonlama çalışmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi için önemlidir. Agaroz jelde birden fazla bant profilinin gözlenmesi ya da beklenen büyüklükte amplikonların bulunmaması durumunda çalışmanın tekrar yapılması zorunluluktur. Klonlama aşamasında her zaman vektöre küçük amplikonların entegrasyonu daha etkin bir şekilde gerçekleştiği için çalışmada iki amplikon üreten cDNA kütüphanelerine ait amplikonlar jelden ayrı ayrı alınarak farklı PZR çalışmalarında tekrar çoğaltılmış ve ayrı vektörlere transfer edilmiştir.



Şekil 4.42. MEP gruplarının klon amaçlı 4'lü PZR amplifikasyonları

Transformantları (vektör + insert) taşıyan rekombinant bakteri kolonilerinin seçiminde LB Amfisilin Katı (pH 7.5) ortamına ilave edilen IPTG ve Xgal kimyasallarından yararlanılmıştır. Ortama ilave edilen IPTG'nin Beta-galaktosidaz genini transkripsiyonunu teşvik ederek oluşan enzimin Xgal'ı substrat olarak kullanıp parçalanması ile bu substrattın mavi renk oluşturduğu bilinmektedir.

Mikrosatellit amplikonlarının β -galaktosidaz geninin içerisine yerleşmesi ile insersionel inaktivasyon gerçekleştiği için Xgal substratı parçalanmamış ve beyaz

koloniler oluşmuştur (Şekil 4.43). Beyaz renkli koloni üzerinde insert taşıyan vektörü bulunduran bakteri kolonisi olduğu için katı plaka ortamından bir lup yardımıyla alınarak Amfisilin içeren LB sıvı (pH 7.5) kültüründe çoğaltılmıştır.

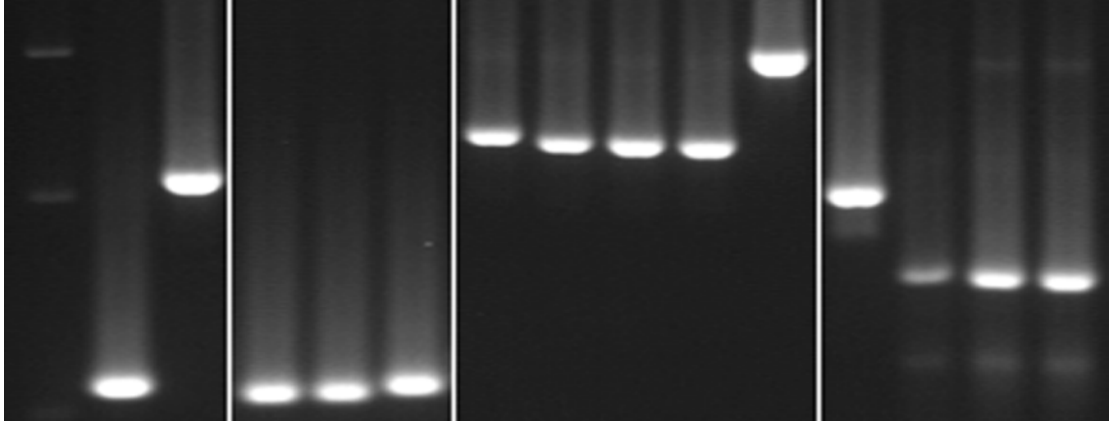


Şekil 4.43. İnsert pozitif klonların mavi-beyaz analiz yöntemi ile seçimi

Kullanılan transformasyon sisteminde beyaz koloniler üzerinden seçim yapıldığı için herhangi bir şekilde klonlanmak istenen gen parçacığını kırılması ve aktarım sırasında bu kırılan parçalardan yalnızca birinin transfer olması ve renk ile seçim yapıldığında hatalı sonuçlar alınabilmesi gibi durumlar için hedeflenen DNA'nın aktarılıp aktarılmadığının belirlenmesi zorunluluk arz etmiştir. Transformantların hedeflenen mikrosatellit bölgesini doğru içerip içermediğinin teyidi için hem PZR yöntemi hem de restriksiyon enzim yöntemi kullanılmıştır.

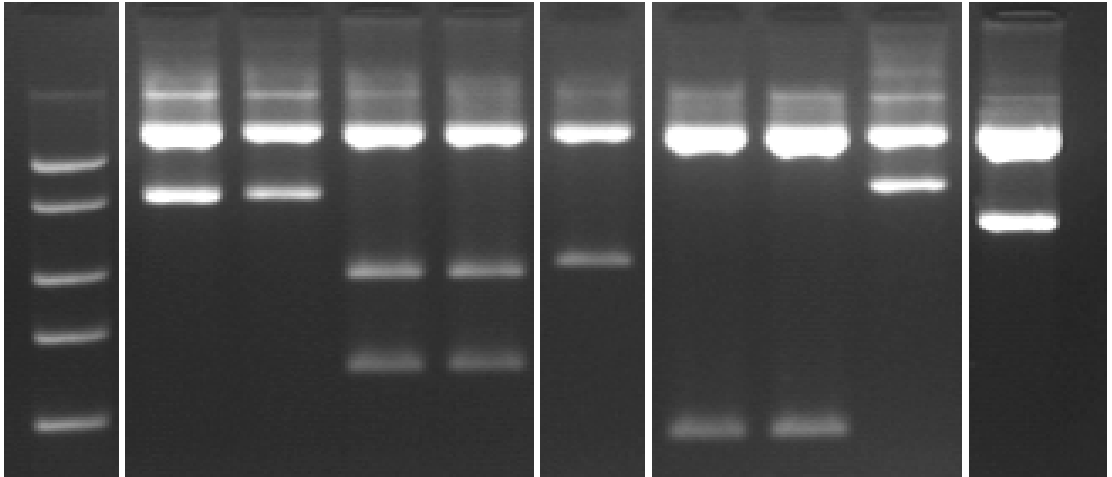
Teyit yöntemlerinden ilki olan PZR yönteminde Fermentas *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak her lokusu temsil eden primer çiftleri kullanılarak PZR yapılmıştır. Plazmit DNA ekstraksiyonu yapıp 100 µl elüsyon çözeltisi içerisinde çözülen DNA örneğinden 5 µl kullanılmıştır. PZR sonucunda metafor agaroz jel elektroforez yöntemiyle alınan amplikonlar ve onlarla beraber kontrol yürütülen her

bir allele ait PZR fragmenti ile büyüklükleri kıyaslanarak hedeflenen bölgenin transfer edilip edilmediği belirlenmiştir (Şekil 4.44). Bu teyit işlemi ile bir taraftan sekanslama çalışmalarına ayrılan bütçenin etkin bir şekilde kullanılması sağlanmış diğer taraftan ise sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği artırılmıştır.



Şekil 4.44. MEP pozitif klonların PZR yöntemiyle teyit edilmesi

İkinci yöntem olan restriksiyon enzimleriyle kesim yönteminde ise vektör üzerinde çoklu klonlama bölgesinin uç kısımlarında hedef bölgesi bulunan *EcoR* I ve *Hind* III restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Ligasyon içermeyen toplam plazmit büyüklüğünün 2886 kb olduğu bilindiği için kesim yapıldığı zaman beklenen büyüklükte ampikon içerip içermediği kolayca belirlenebilmiştir (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. MEP pozitif klonların RE kesim yöntemiyle teyit edilmesi

4.13.2. MEP grubu ampliconların sekans dizilerinin belirlenmesi

Sekanslama (DNA Dizi Analizi) DNA üzerinde bulunan baz dizilerinin içeriğini ve sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Çalışmada DNA Dizi Analizi Macrogen Inc. (Güney Kore) Firmasına yaptırılmıştır. Sekansların doğruluğu amacı ile bütün klonlar 2 tekerrürlü olarak sekanslatılmış ve her örnek çift yönlü ileri ve geri sekanslama primerleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.46). Bu durumda her pozitif klondan elde edilen plazmit 4 kez sekans analizine tabi tutulmuş ve her amplicon için en az 2 plazmit kullanıldığı göz önüne alındığında elde edilen sekans dizilerinin güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan dizi analizlerinde yaklaşık 1000 nükleotit uzunlukta okuma gerçekleştirilmesine rağmen bu çalışmada 600 nükleotit uzunluğundaki okumalar:

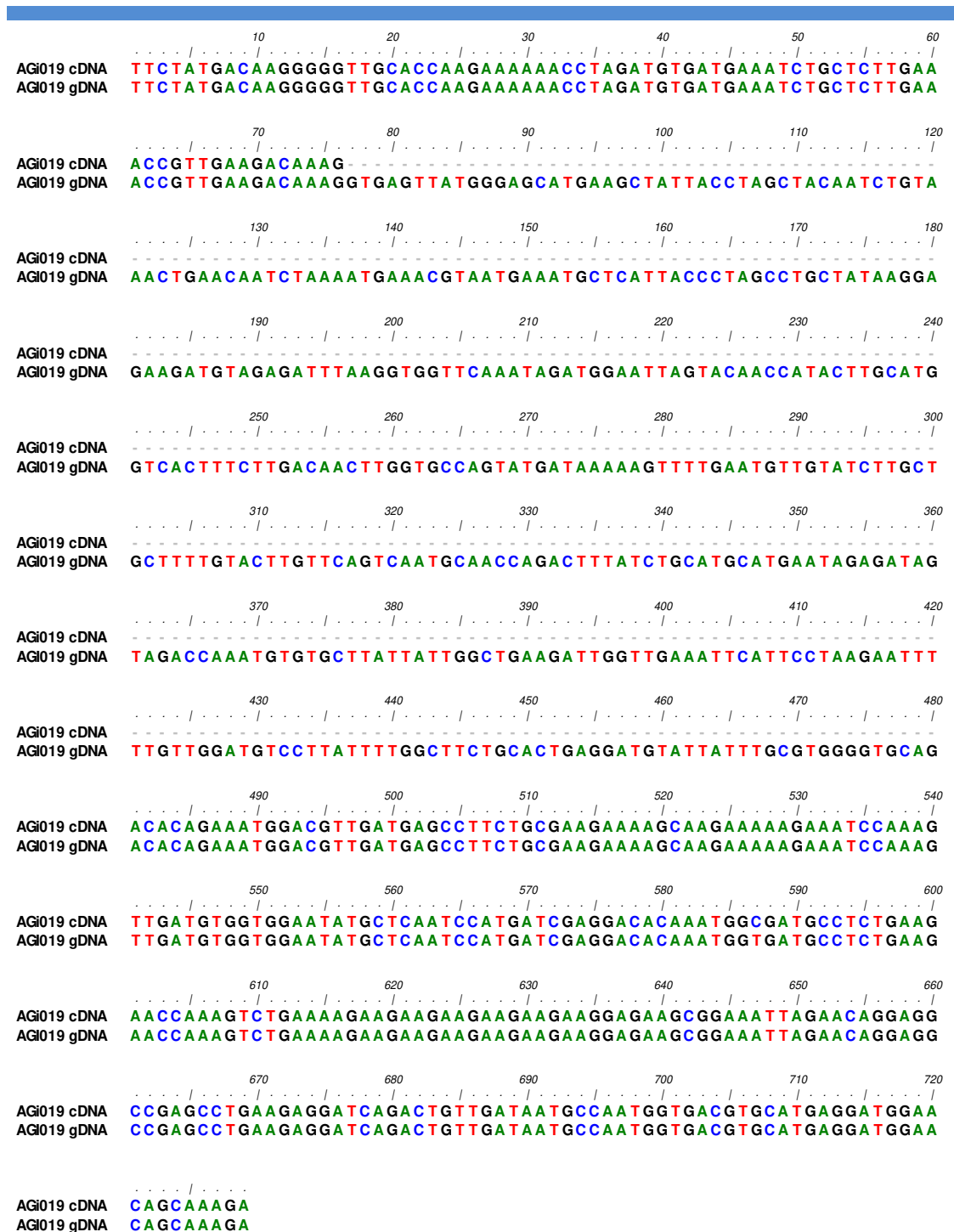
- i) İleri ve geri primer dizileri ile yapılan sekanslama çalışmaları arasındaki uyumluluk,
- ii) Her bir amplicon dizisi en az 2 tekerrürlü olarak belirlenmiş ve bu tekerrürler arasındaki uyumluluk bilgisine,
- iii) Sekanslama da nükleotit bilgisinin güvenilirlik skoru olan minimum Q20 (%99 güven sınırı ile her 100 baz içerisinde sadece 1 baz için hatalı okuma ihtimali) ve üzerindeki değerler dikkate alınmış,
- iv) Her okumada orijinal AGi primerlerinin nükleotit bilgilerini bulundurulmasına göre belirlenmiştir.

Bu kriterler dışında kalan amplicon klon DNA dizileri için çalışma tekrar klonlama aşamasında itibaren yeniden yapılarak yeniden klonlama yapılmış ve dizi analizi için tekrar gönderilerek yeniden dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans dizilerinin doğruluğunu arttırmak amacı ile sekanslanmış olan her bir amplicon dizisi Sequencher ve BioEdit programları yardımı ile eşleştirilmiştir. Bu tür yaklaşımlarla elde edilen sekans dizilerinin doğruluğu teyit edilmiştir. Her bir amplicona ait DNA dizisi GenBank verileri ile karşılaştırılarak bu dizilerin vektör dizileri veya herhangi bir mikroorganizmaya ait olmadıkları teyit edilmiştir.

4.14. MEP Grubu Amplikonların Karakterizasyonu

Sekanslama analizi sonrasında elde edilen DNA verileri üzerinde her bir mikrosatellit lokusuna ait primer çiftlerinin ileri ve geri sekans bilgileri bire bir eşlenerek bulunmuş ve sekans üzerinde primer dizi bilgisi dışında kalan vektöre ait olabilecek dizi bilgileri uzaklaştırılmıştır. Analizler sonucu klonlanmış cDNA ve genomik DNA amplikonları mikrosatellit DNA alanlarının (MDA) varlığı bu çalışmada kullanılan AGi primer setlerinin gerçekte (*in vitro*) mikrosatellit alanlarını içeren lokuslara özgü olduğunu kanıtlamıştır. cDNA amplikonların DNA dizi analizlerinde ve genomik DNA amplikon dizilerinde var olan MDA'ların varlığı EST tabanlı mikrosatellit analizlerinin konvensiyonel mikrosatellit primer çiftlerinin belirleme analizlerine alternatif bir yöntem olduğu teyit edilmiştir (Polat vd 2009).

Agaroz jel analizleri ile amplifikasyon paternlerine göre belirlenmiş olan ve bir önceki bölümde sunulmuş olan MEP gruplarının teyidi amacı ile MEP TiP IA amplikonlarının DNA dizilerinin incelendiğinde kütüphaneler arasındaki amplikon dizilerinin ve genomik DNA dizilerinin aynı olduğu görülmüştür. cDNA ve genomik DNA amplikonlarının sekans bilgileri transkripsiyona alınan DNA'ların mikrosatellit içerdiklerini ve ekson bölgelerinde bulunduklarını göstermiştir. MEP TiP IB grubunda yer alan amplikon DNA dizilerinin incelenmesi ile genomik DNA amplikonlarında intron bölgelerinin bulunduğu sekans dizileri ile de teyit edilmiştir (Şekil 4.47). Özellikle büyük amplikon oluşturan AGi primer setlerinin bir kısmı farklı biber çeşit ve türlerinde monomorfik ve oldukça büyük moleküler ağırlıkta amplikonlar oluşturmaları EST tabanlı mikrosatellit markırlarının önemli bir dezavantaj olduğunu göstermekle birlikte bu durumun CAPS-mikrosatellit analiz yöntemi ile büyük oranda ortadan kaldırılabilceği belirlenmiştir (Ince vd 2010b). DNA sekans verileri incelendiğinde cDNA kütüphaneleri arasında amplikon paternlerinin farklı olduğu belirlenen AGi primer setleri tarafından oluşturulan amplikonlar arasında MDA polimorfizminin var olduğu sekans düzeyinde belirlenmiş, cDNA'da mikrosatellitlerin varlığının teyidi olması yanında polimorfik amplikonlarında var ve polimorfizmin temelini mikrosatellit alanlarından nükleotitlerin sayılarının artması veya azalması şeklinde olduğunu göstermiştir.



Çalışmada incelenen organ, doku ve gelişme dönemlerine ait cDNA'lar arasında oldukça farklı amplikon paterni oluşturan AGi030 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesinin 356, 346, 344 bp büyüklüğünde oluşturduğu amplikonlar arası farklılığın amplikon sekanslarının hangi bölgelerinde olduğunu belirlemek için 3 bant paterninin DNA dizileri incelenmiştir. Sekanslama analizi sonrasında AGi030 primer setinin 15 ÇGS perikarp dokusu cDNA kütüphanesi üzerinde oluşturduğu 356 bp büyüklüğündeki amplikon üzerinde [CA] dinükleotit motifinin 16 kez tekrar oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer dokulardan 36 ÇGS perikarp dokusunda ise aynı dinükleotit motifinin 10 kez tekrar ederek 344 bp büyüklüğünde bir amplikon oluştururken sap dokusu üzerinde 9 [CA] tekrarı meydana getirdiği ve 342 bp büyüklüğünde bir amplikon oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.48).

Günümüze dek yapılan mikrosatellit analizlerinde farklı dokularda ifade edilen aynı mikrosatellit bölgelerine ait ardışık tekrar farklılığı saptanmamıştır. Bu çalışmada ilk olarak mikrosatellit tekrar sayısı farklılığı ile farklı dokularda ifade bulan mikrosatellitlerin varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.48'de gösterildiği gibi BioEdit programı ile üç farklı kütüphaneye ait sekans verileri hizalama ve homoloji işlemlerine tabi tutulmuş ve translasyon sonucu oluşabilecek amino asit dizileri belirlenmiştir. Bu işlemlerin sonrasında her iki sekans üzerinde de ileri ve geri primer bağlanma bölgeleri tespit edilmiş ve tekrar bölgesi üzerindeki ardışık tekrar farklılığı gösterilmiştir. Mikrosatellit lokusunu temsil eden AGi030 primer setinin her üç cDNA kütüphanesi üzerinde oluşturduğu amplikona ait sekans bilgisi üzerinde ökaryotik genomlara yaklaşık universal düzeyde translasyona başlangıç işareti olan metionin (M) amino asitinin kodlandığı bir ATG kodonu saptanmıştır. Metionin amino asitinin kodunu 15 ÇGS perikarp dokusunda seksen sekizinci bazdan itibaren başlarken 36 ÇGS perikarp dokusunda yetmiş altıncı bazdan başlamış olduğu görülürken, ATG'nin sap dokusunda yetmiş dördüncü bazdan başladığı tespit edilmiştir.

Sekans analizlerinde AGi030 primer setinin oluşturmuş olduğu 3 farklı amplikondan hiç birisinin Open Reading Frame (ORF)'i üzerinde ökaryotlarda universal olarak bulunan TGA, TAG veya TAA stop kodonlarına rastlanmamış ve her

3 amplikonun ORF'si ucu açık olan bir gen parçacığının devamı olduğu ve doku, organ ve gelişme dönemine özgü ifade ettiği ve birbirleri arasındaki tek farkın mikrosatellit alan bölgesindeki tekrar sayısı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.48).

AGi030 amplikon sekans dizileri incelendiğinde 15 ÇGS perikarp dokusunun amplikonunda toplamda 16 [AC/TG] dinükleotit dizisi içererek tekrar bölgesinin translasyonu ile oluşacak Histidin-Triosin (HT) amino asit tekrarları meydana getirebileceği gözlenmiştir. Diğer taraftan tüm dokularda ifade bulan 10 [AC/TG] tekrar sayısı içeren amplikon ve sap dokusunda ifade bulan 9 [AC/TG] tekrar sayısı içeren amplikonda istisnasız yine HT amino asit tekrarının varlığı tespit edilmiştir. Bu üç farklı dokunun cDNA dizisi üzerindeki tek farklılığın dinükleotit tekrar sayısı farklılığı olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığı altında mikrosatellitlerin organ, doku ve gelişme dönemlerine özgü genlerin üzerinde bulunduğu ve tekrar farklılığının bu genlerin translasyonu sonucu oluşturdukları amino asit tekrarlarına neden olduğu AGi030 örneği ile görülmüştür. Ancak organ, doku ve gelişme dönemlerine göre ifade edilen genlerin bu spesifik ifadesinin mikrosatellitlerden mi kaynaklandığı yoksa mikrosatellit dışında diğer bazı faktörler tarafından mı kontrol edildiği dair bilgi elde edilememiştir. Gen ifadelerinde promotörlerin ve/veya UTR bölgelerinin etkisi olduğu bilinmektedir ancak AGi030 lokusu örneğinde kodlayan bölgedeki polimorfizm varlığı diğer bir gen kontrol yöntemi olan post-transkripsiyonel modifikasyonlardan mı kaynaklandığını araştırmak için yeni araştırmaların yapılması gerekmektedir (Brohede vd 2003).

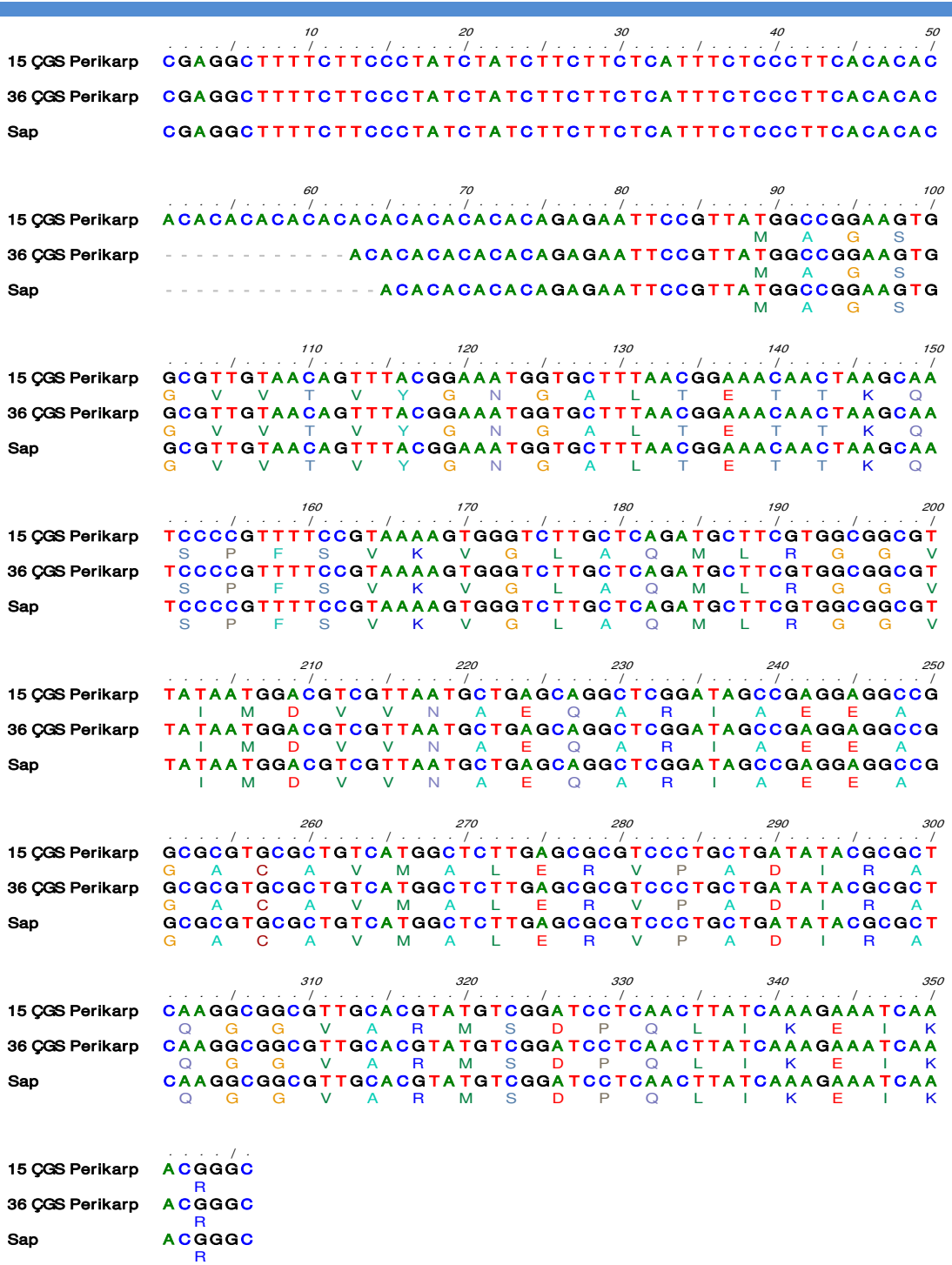
Sharma vd (2007) mikrosatellitlerde [TG/CA] sayısında meydana gelen artışın transkripsiyon cis-modülatör bölgesi ile negatif bir korelasyon içinde olduğunu mikrosatellit artışının bulundukları genlerin transkripsiyon seviyesini düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Ancak Sharma vd (2007) bu durumu genlerin intron bölgelerindeki mikrosatellit varlıklarını araştırdığı çalışmalarında tespit etmişlerdir.

AGi030 DNA sekans verilerinin GenBank verilerine dayanılarak yapılan homoloji analizlerinde hiçbir homoloji belirlenememiştir. Bu durum AGi030 lokusu DNA dizisinin sıra dışı bir lokus ve daha önce çalışılmamış olduğunu göstermektedir.

Genler üzerinde bulunan mikrosatellit varyasyonlarının etkilerini araştıran çalışmalarda bakteri ve mayada hücrede hücre duvarı proteinlerinin kodlayan bölgelerde bulunan tekrar sayılarındaki artışın adezyon ve patojenlere dayanıklılık gibi olaylarla ilişkili olduğu, insanda Huntington hastalığı *HD* genlerinin [CAG] tekrar sayısındaki artışın, *Drosophila*'da sinir sistemi gelişimini kontrol eden trinükleotit tekrarlı dizilerin uzunluğundaki varyasyon ile ilişkili olduğu görülmüştür (Karlin ve Burge 1996, Fondon ve Garner 2004). Ancak bitkilerde kodlayan bir mikrosatellitin neden olduğu herhangi bir genetik etki günümüze dek belirlenmemiştir.

AGi030 amplikonlarının cDNA kütüphaneleri ve genomik DNA agaroz jel analizleri ve sekans dizileri analizlerinin birlikte yorumlanması ile aşağıda listelenen çıktılara ulaşılmıştır.

- i) Mikrosatellitler organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü genler üzerinde bulunmaktadır.
- ii) Mikrosatellit amplikon farklılıkları mikrosatellit alanlarında bulunan tekrar eden nükleotitlerden kaynaklanmaktadır. Bu durum genomik ve cDNA'da benzerlik göstermektedir.
- iii) Mikrosatellitler protein kodlayan ve UTR bölgelerde bulunabilmektedir.
- iv) Genlerin UTR bölgelerde bulunan mikrosatellitler proteinlerin amino asit dizilerini değiştirmemekle birlikte yoğun olarak mikrosatellit içermektedir.
- v) UTR'lerde bulunan mikrosatellitler genlerin organ, doku veya gelişme dönemlerinde farklı ifade oluşturmalarına katkılar sağlayabilmektedir. Örneğin kinaz geni 3'-UTR bölgesinde bulunan [CTG] mikrosatellitindeki tekrar sayısındaki artış transkripsiyon akışını etkilediği belirlenmiştir (Ranum ve Day 2002).



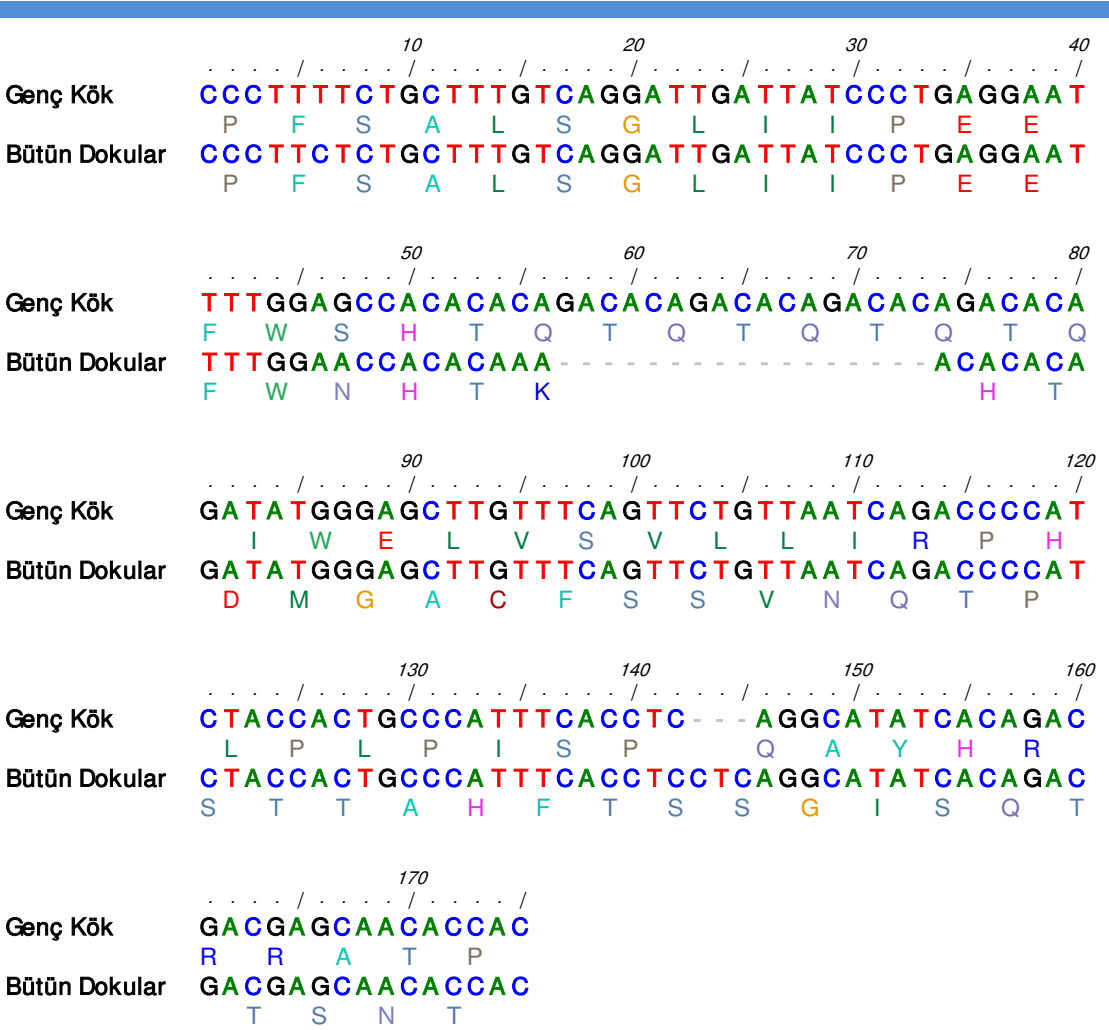
Şekil 4.48. MEP TiP VA-AGi030 sekans analizi. Klonlanmış AGi030 ampliconunun 15 ÇGS perikarp, 36 ÇGS perikarp ve sap dizilerinin eşleştirilmesi ile polimorfik bölgenin tekrar sayısının azlığı veya fazlalığından kaynaklandığı saptanmıştır

AGi013 primer setinin genç kök dokusu cDNA kütüphanesi üzerinde oluşturduğu 170 bp'lik büyük amplikon ile geri kalan bütün dokularda (genç kök dahil) bulunan küçük boydaki 158 bp'lik amplikonu bulunan mikrosatellitler karşılaştırıldığında genç kök dokusunda [ACACAG/CTGTGT] hekzanükleotit tekrarının beş kez tekrarlanırken küçük amplikonda bu tekrarın sadece 1 kez bulunduğu belirlenmiştir. Şekil 4.49'da gösterildiği gibi iki sekans hizalama işlemi sonrasında her iki sekans üzerinde de ileri ve geri primer bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. Bu bölge haricinde kalan sekans üzerinde mikrosatellit tekrar bölgesi genç kök dokusu ve 15 ÇGS perikarp dokusuna ait sekans bilgisi arasında fark oluşturan bölgenin mikrosatellit bölgesi olduğu tespit edilmiştir.

Mikrosatellit dizisinde meydana gelen değişikliğin translasyon sonrasında oluşabilecek protein yapısında amino asit dizilimini farklılaştırabilecek ya da protein yapısını değiştirerek farklı bir protein oluşturabileceği düşüncesi ile sekans başlangıcından itibaren meydana gelen amino asit dizilimleri değerlendirilmiştir. Genç kök dokusuna ait 170 bp büyüklüğünde bulunan sekans üzerinde translasyon başlangıç işareti olan metionin amino asitinin kodlanacağı bir ATG kodonu tespit edilmemiştir. Bunun yanı sıra bu sekans üzerinde translasyonu durdurma işareti olarak herhangi bir stop kodonuna da rastlanmamıştır. Ayrıca diğer dokularda bulunan sekanstan farklı olarak tekrar bölgesinin treonin (T) ve glutamin (Q) amino asitlerini 5 çift olarak peş peşe bir arada bulunduğu tespit edilmiştir. Başlangıç ve bitiş kodonlarının bulunmadığı bu sekans üzerinde diğer dokularla ortak 158 bp büyüklüğünde bulunan sekanstan farklı olarak bu sekans dizisinin mikrosatellitin devreye girmesi ile bambaşka bir protein oluşturan sekansın bir parçası olduğu düşünülmüştür (Sangwan vd O'Brian 2002).

Tüm dokularda ifade bulan 158 bp büyüklüğünde bulunan sekans incelendiği zaman ise mikrosatellit bölgesinin değişime uğrayarak mikrosatellit özelliğinin tek diziye inmesi ile kaybolmuş olması ile dikkat çekmiştir. Mikrosatellit bölgesinin ortadan kalkması ile bu bölge sonrasında oluşabilecek tüm amino asitlerin değiştiği görülmüştür.

Ayrıca mikrosatellit (mikrosatellit içermeyen) bölge sonrasında değişen amino asit dizilimine bağlı olarak metionin amino asitinin sentezlenebileceği başlangıç kodonunun var olduğu ve translasyonun sonlanabileceği bir stop kodonunun bulunmadığı saptanmıştır. Bu durumda bu 158 bp büyüklüğünde bulunan dizinin de farklı bir protein oluşturduğu kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.49. AGi013 amplikonların sekans karşılaştırması. 15 ÇGS perikarp ve genç kök dokularından AGi013 primer setinin sekanslama sonucu

AGi013 örneğinde olduğu gibi sekans üzerinde mikrosatellit bölgesinin ortadan kalkmış olması translasyon sonrası oluşan polipeptit zincirinin değişmesine neden olmaktadır. AGi013 primer seti ile cDNA analizleri sonucu mikrosatellitlerin varlığının veya yokluğunun gen regülasyonunda etkin bir şekilde yer aldığını

göstermiştir. AGi013 lokusu genomik DNA üzerinde bulunmasına rağmen transkripsiyonu sadece genç kök dokusu üzerinde gerçekleşmekte diğer dokularda ise bulunmamaktadır. Kök dokusuna özgü ekspresyonda mikrosatellit bölgesinin transkripsiyon ve translasyona girerek farklı bir polipeptit oluştururken diğer dokularda ise bu mikrosatellit bölgesinin transkripsiyona alınmadığı görülmüştür. Ökaryotlarda bu tür gen regülasyonu oldukça yaygındır ancak mikrosatellitlerin bu tür regülasyonda görev aldığı kesinlik kazanmamıştır. Kodlayan bölgelerde mikrosatellitin uzaması ya da kısalmasının morfolojik evrime neden olduğu yönünde çeşitli bulgular vardır (Fondon ve Garner 2004). Çeşitli araştırmalarda kodlayan bölgelerde dinükleotit mikrosatellit motifinin sayısında meydana gelen artışın transkripsiyon seviyesini düşürdüğü iddia edilmiştir (Okladnova vd 1998, Gao vd 2004, Sharma vd 2007).

AGi016 primer seti genç kök dokusu ve 15 ÇGS perikarp dokusu ampliconları kullanılarak yapılan sekanslama çalışmaları sonucu farklı boyda amplicon ürünü bulunan genç kök dokusunda [AATT/TTAA] tetranükleotit tekrar sayısı dört, genç kök dokusunda [AATT/TTAA] tekrarı altı, tüm dokularda ise [AATT/TTAA] mikrosatellitinin tekrar sayısı beş olarak saptanmıştır (Şekil 4.50).

Genç kök dokusuna ait 165 bp büyüklüğünde bulunan sekans üzerinde metionin amino asitinin kodlandığı bir ATG kodonunun mikrosatellit tekrar dizisinin bitiminden hemen sonra yer aldığı tespit edilmiştir. 15 ÇGS perikarp dokusuna ait sekans dizisi üzerinde bir başlangıç kodonu bulunmadığı gibi yer yer durdurma kodonlarının var olduğu görülmüştür. Ayrıca iki sekans arasında tekrar bölgesine kadar aynı olan amino asit dizilimi tekrar bölgesinden sonra tamamen değişmiştir. Genç kök dokusuna ait olan ekstra bant paterninin bir protein yapısına katıldığı ancak tekrar bölgesinin translasyon başlama bölgesine göre 5'-UTR bölgesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu durum yine mikrosatellit bölgesinin gen regülasyonu veya translasyon faktörlerinin tanıma bağlanma bölgeleri ile ilişkili olabileceği fikrini doğurmuştur (Şekil 4.50).

		10	20	30	40
Genç Kök	G A T G C T G T T C G T G A C T G C G G A T T A T T T A T C T A A G G G T G G T				
Bütün Dokular	D A V R D C G L F I * G W				
		50	60	70	80
Genç Kök	G A A A A G G G G A T T T T C T C T C C T A T G C A T A T G A T T C T C T G C A				
Bütün Dokular	* K G D F L S Y A Y D S L Q				
		90	100	110	120
Genç Kök	G A A A A C C T G A A G A G T A A T T A A T T A A T T A A T T A A T T G				
Bütün Dokular	K T * R V I N * L I N * L				
		130	140	150	160
Genç Kök	A C C A T G G A G G T T C A T T T C A C T C T T G T T G T T T T T C A T C T T G				
Bütün Dokular	T M E V H F T L V V F H L				
Genç Kök	G G C G A A T				
Bütün Dokular	G R				
Genç Kök	G G C G A A T				
Bütün Dokular	G E				

Şekil 4.50. AGi016 primer seti amplikonlarının karakterizasyonu. Bütün dokuları temsilen 15 ÇGS perikarp dokusundan ve genç kök dokusundan elde edilen cDNA'lar üzerinde AGi016 primer setinin DNA sekansları

AGi016 lokusundan elde edilen bilgilere dayanarak protein kodlamayan gen bölgelerinde mikrosatellitlerin varlığı teyit edilmiştir. Daha önceki yapılmış çalışmalarda değişik araştırmacılar tarafında 5'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitlerin gen regülasyonuna etki ettiği belirlenmiştir (Li vd 2004). Örneğin insan calmodulin-1 (hCALM1) geninin 5'-UTR bölgesinde bulunan [CAG] tekrarlı dizisi uzaklaştırıldığı zaman genin ekspresyon seviyesinin %45 oranında azaldığı bildirilmiştir (Toutenhoofd vd 1998). Ayrıca 5'UTR bölgelerinde yer alan mikrosatellitlerin gen ekspresyon seviyesinin düzenlenmesi üzerine etkileri olduğu çeşitli araştırmalarda vurgulanmıştır (Ganapathi vd 2005, Eller vd 2007).

AGi013 lokusu ile AGi016 lokusu karşılaştırıldığında ise her iki lokusta bulunan mikrosatellit varyasyonunun gen regülasyonu ile ilgili olduğu ancak gen regülasyon mekanizmalarının farklı olabileceği öngörülmüştür. AGi013 lokusunda mikrosatellit tekrar sayısının azaltımı yada artırımı genç kök spesifik ekspresyona neden olurken AGi016 lokusunda mikrosatellitin UTR bölgesinde yer alarak transkripsiyonun farklı bir şekilde kontrol edildiği görülmüştür.

AGi064 primer setinin dokular içerisinde farklı bant paterni gösterenlerden 36 ÇGS perikarp, sap, genç yaprak ve olgun tohum dokularından alınan amplikonlar sekanslanmıştır. Dizi analizi ile AGi064 primer setinin 36 ÇGS perikarp dokusunun cDNA kütüphanesi üzerinde 172 bp büyüklüğündeki amplikon oluşturduğu ve bu amplikon üzerinde 18 tekrar sayısına sahip dinükleotit [AG] mikrosatellit motifi bulunduğu saptanmıştır. Sap dokusunda sekans analizi sonucu 170 bp olduğu ve sekans üzerinde farklı bölgenin mikrosatellit tekrar sayısında meydana gelen azalmadan kaynaklanarak olduğu görülmüştür. Genç yaprak dokusu sekans analizinde ise 166 bp büyüklüğünde bulunan amplikonun üzerinde mikrosatellit motifinin 15 kez tekrar ettiği belirlenmiştir. Olgun tohum cDNA kütüphanesi üzerinde mikrosatellit motifinin tekrar sayısının 14 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.51).

AGi064 primer seti kullanılarak elde edilen amplikonlardan 172 bp ve 166 bp'nin sekans analiz sonuçları incelendiğinde ATG kodonu ile başlayan ve üzerinde hiç stop kodonu bulundurmayan bir ORF olduğu görülmüştür. Diğer taraftan örneğin 15 ve 36 ÇGS plasenta dokusunda yer alan 170 bp uzunluğundaki amplikon DNA dizisinde 146 bp de TGA stop kodonunun bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.51). Bu 170 bp'lik sekansta AG nükleotit delesyonu sonucu stop kodonu oluşmuş ve translasyon sonlandırma işleminin gerçekleştiği düşünülmüştür. Olgun tohum dokusunda var olan 164 bp uzunluğundaki amplikon üzerinde stop kodonunun 144 bp de olduğu saptanmıştır. Burada da stop (durdurma) kodonu dinükleotit tekrar üzerinde oluşan delesyon sonucu meydana geldiği saptanmıştır.

		10	20	30	40
Bütün Dokular		A G C A T C C A T C T T G A C T G A A G A G G A T G G T G C C A C T A A C A C A			
Sap		A G C A T C C A T C T T G A C T G A A G A G G A T G G T G C C A C T A A C A C A	M V P L T H		
Bütün Dokular		A G C A T C C A T C T T G A C T G A A G A G G A T G G T G C C A C T A A C A C A			
Olgun Tohum		A G C A T C C A T C T T G A C T G A A G A G G A T G G T G C C A C T A A C A C A	M V P L T H		
		50	60	70	80
Bütün Dokular		T T C A C T G C T G C T A A G G A C G G C G A C A G C C T T C A C C A T T T T T			
Sap		T T C A C T G C T G C T A A G G A C G G C G A C A G C C T T C A C C A T T T T T	S L L L R T A T A F T I F		
Bütün Dokular		T T C A C T G C T G C T A A G G A C G G C G A C A G C C T T C A C C A T T T T T			
Olgun Tohum		T T C A C T G C T G C T A A G G A C G G C G A C A G C C T T C A C C A T T T T T	S L L L R T A T A F T I F		
		90	100	110	120
Bütün Dokular		G T A T G T G A T C T C A G G G T A C C C C T T G T T T G G C T A G A G A G A G			
Sap		G T A T G T G A T C T C A G G G T A C C C C T T G T T T G G C T A G A G A G A G	V C D L R V P L V W L E R		
Bütün Dokular		G T A T G T G A T C T C A G G G T A C C C C T T G T T T G G C T A G A G A G A G			
Olgun Tohum		G T A T G T G A T C T C A G G G T A C C C C T T G T T T G G C T A G A G A G A G	V C D L R V P L V W L E R		
		130	140	150	160
Bütün Dokular		A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G T G A T A G T G T G C T			
Sap		A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G - - T G A T A G T G T G C T	E R E R E R E R E S D S V L		
Bütün Dokular		A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G - - - - T G A T A G T G T G C T	E R E R E R E R E S D S V L		
Olgun Tohum		A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G - - - - - T A G T G T G C T	E R E R E R E R E S D S V L		
		170			
Bütün Dokular		G A T A A C G A G A A G			
Sap		G A T A A C G A G A A G	I T R		
Bütün Dokular		G A T A A C G A G A A G	D N E K		
Olgun Tohum		G A T A A C G A G A A G	D N E K		

Şekil 4.51. AGi064 primer setinin ampliconlarının sekans karakterizasyonu. 36 ÇGS perikarp, genç yaprak, sap ve olgun tohum dokularında AGi064 primer seti sekans analizi

AGi064 primer setinin oluşturmuş olduğu amplikon dizileri incelendiğinde mikrosatellit varyasyonunun i) kodlayan bölgelerdeki varyasyonla amino asit zincirinin değiştiği, ii) amino asit zincirinin kısalarak amino asit zincirinin prematüre bir şekilde oluşabildiği ve iii) mikrosatellitleri üzerinde taşıyan genlerin gen ekspresyonunu etkiledikleri saptanmıştır.

Dinükleotit mikrosatellit motiflerinde meydana gelen artışların transkripsiyon seviyesini azalttığı bildirilmiştir (Sharma vd 2007, Okladnova vd 1998). Ayrıca dinükleotit mikrosatellit motiflerinde meydana gelen artış ya da azalış direkt olarak kodon yapısını etkilemektedir. Örneğin [GA/CT] mikrosatellit motifinde kodon kayması ile [GAG]_n kodonu arjinin amino asidine, [AGA]_n kodonu glutamin amino asidine, [UCU]_n kodonu alanin amino asidine ve [CUC]_n kodonu lösin amino asidine dönüşebilmektedir. Çeşitli kaynaklara göre özellikle [GA/CT] mikrosatellit motiflerini içeren EST'lerde (Kantety vd 2002) %8 alanin ve %10 lösin amino asitlerinin (Lewin 1994) fazlalığının varlığı bu durumdan kaynaklanmaktadır.

AGi070 primer setinin dokular içerisinde farklı bant paterni gösteren 15 ÇGS plasenta ve perikarp dokularında oluşan tek amplikon, olgun tohum dokusunda ise meydana gelen iki amplikon sekanslanmıştır. Sekanslama analizi sonucu AGi070 primer setinin kullanılan 15 ÇGS perikarp dokusu cDNA kütüphanesindeki 269 bp büyüklüğündeki amplikonda [CT] mikrosatellit motifinin 14 kez tekrar oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer dokulardan 15 ÇGS plasenta dokusunda ise aynı primer seti ile elde edilen ikinci amplikonun büyüklüğünün 259 bp olduğu ve 5 tekrarlık azalma nedeniyle [CT] mikrosatellit motifinin 9 kez tekrar ettiği saptanmıştır.

AGi070 primer setiyle olgun tohum dokusu cDNA kütüphanesi üzerinde ise her iki amplikonun yapılan sekans analizinde 269 bp ve 259 bp büyüklüğünde mikrosatellit motifinin 14'er ve 9'ar kez tekrar ettiği tespit edilmiştir. AGi070 primer seti ile oluşturulan amplikonlarında mikrosatellit bölgesinin tamamen UTR bölgesinde bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.52).

UTR bölgelerinde bulunan mikrosatellitlerin gen ifadelerin etkileri araştıran Ranum ve Day (2002) tarafından kinaz geninin 3'-UTR bölgesinde bulunan [CTG] tekrarının üzerinde meydana gelen artışın miotonik distrophi type 1'e (adelenin genişlememesi nedeniyle kasın spazm geçirmesi) sebep olarak transkripsiyon akışını etkilediği bulunmuştur. AGi070 primer setinin amplikonunda bulunan mikrosatellit büyük bir ihtimalle kodladığı genin 5' ucunda (5'-UTR) olduğu sekans analizleri ile ortaya konmuştur. İnsan ve fare genomunda bulunan genleri inceleyen Lawson ve Zhang (2008) genlerin 5'-UTR kısmında bulunan mikrosatellitlerin doku spesifik özellikte olduğunu göstermişlerdir.

AGi046 primer setinin diğer dokularla arasında farklı boyda bulunan amplikon ürünü 15 ÇGS plasenta dokusunda [ATT/TAA] tekrar sayısının hem 8 adet hem de 7 adet tekrar ettiği belirlenmiştir. Diğer doku, organ ve gelişme dönemlerine ait dokularda [ATT/TAA] tekrarı 7 kez tekrar meydana getirmiştir. Bu primer setinin çoğalttığı mikrosatellit lokusundan elde edilen sonuçlar gelişme dönemi spesifik ekspresyon profilinin bir kanıtı olmuştur.

4.15. MEP Gruplarının Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında 16 cDNA ve genomik DNA amplifikasyon paternlerine göre belirlenmiş ve sekans dizilerine göre de teyidi gerçekleştirilmiş olan MEP grupları:

- i) Mikrosatellit motif içeriklerine,
- ii) Mikrosatellit motiflerinin kodlayan ve kodlamayan (UTR) bölgelerindeki bulunmalarına,
- iii) Mikrosatellitlerin doku, organ ve gelişme dönemine spesifik veya housekeeping fonksiyonlarına,
- iv) Homoloji analizlerine göre sınıflandırılmaları gerçekleştirilmiştir.

4.15.1. Motifler yönünden MEP gruplarının incelenmesi

Çalışmada kullanılan toplam 83 AGi primer seti mikrosatellit motif içerikleri yönünden analiz edildiğinde MEP TiP I grubunun trinükleotit motif bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.55).

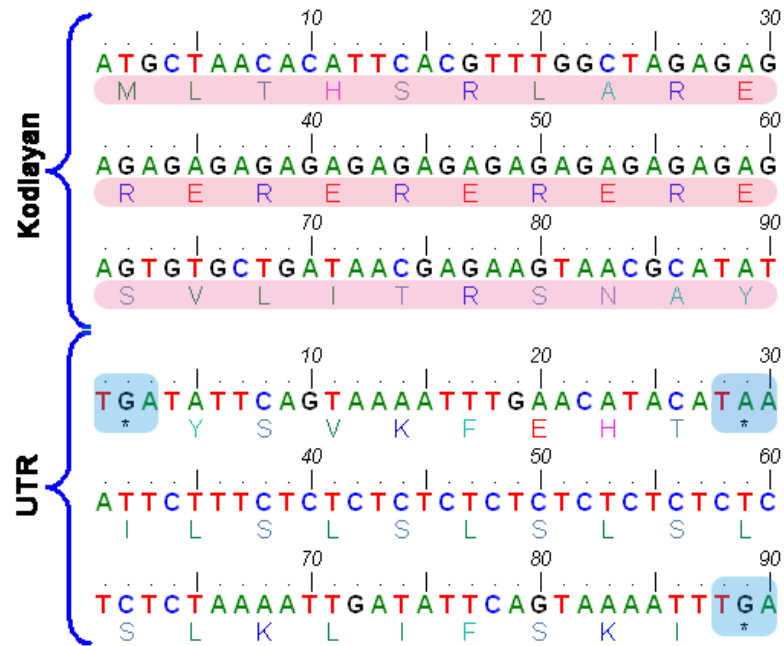
Çizelge 4.55. MEP gruplarında mikrosatellit motif içerikleri

	<i>TiP I</i>			<i>TiP II</i>	<i>TiP III</i>	<i>TiP IV</i>		<i>TiP V</i>	
	A	B	C			A	B	A	B
Dinükleotit	6	3	1	2	-	-	-	4	4
Trinükleotit	21	8	2	1	1	2	2	-	-
Tetranükleotit	6	1	2	1	1	-	1	-	1
Pentanükleotit	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Hekzanükleotit	3	3	-	-	1	-	-	-	2
Bileşik	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	39	16	5	4	3	2	3	4	7

Çizelge 4.55’de gösterildiği üzere MEP TiP I %51.67 gibi büyük bir orantıda trinükleotit mikrosatellit motifi içerirken %3.33 oranında pentanükleotit motifi içermektedir. Çalışmada kullanılan AGi primer setlerinden sadece 2 adedi bileşik (compound) mikrosatellit motifi ile ampikon oluşturmakta olup bunların her ikisinde MEP TiP I grubunda yer almıştır. MEP TiP I grubu dışındaki diğer MEP gruplarının genel anlamda dinükleotit motiflerce zengin olduğu görülmüştür.

4.15.2. Mikrosatellit motiflerinin kodlayan ve kodlamayan (UTR) bölgelerde dağılımları

Sequencher programı kullanılarak 83 AGi primer setinin elde edildiği EST dizileri kontig analizlerine alınarak gruplandırmaları yapılmış ve BioEdit ve ExPasy programları kullanılarak elde edilen bu dizilerin mikrosatellit alanları göz önüne alınarak herhangi bir amino asit kodlayan (kodlayan) ve herhangi bir amino asit kodlamayan genlerin 5’- veya 3’- uç bölgelerinde bulunan bölgeler olarak (UTR) sınıflandırılmıştır. Şekil 4.53’de amino asit kodlayan ve kodlamayan (UTR) örneği gösterilmektedir.



Şekil 4.53. Amino asit kodlayan ve UTR bölgesinde bulunan mikrosatellitler. Şekilde altta verilen cDNA dizisinde iki adet stop kodunun (TGA ve TAA) varlığı bu mikrosatellit DNA'nın UTR bölgesinde olduğunu göstermektedir

Amino asit kodlayan bölgelerde mikrosatellit içeren mevcut sekans üzerinde translasyon sonucu oluşabilecek 6 farklı ihtimalli amino asit dizilimleri belirlenmiştir. İncelenen sekans üzerinde bir açık okunabilir bölgenin olup olmadığı, mikrosatellit tekrar bölgesinin sekansın translasyona uğrayan bölgesinde mi yoksa translasyona uğramayan bölgesinde mi yer aldığı belirlenmiştir.

Çalışılan 83 AGi mikrosatellit setinin oluşturduğu ampliconların 20 (%24.1) adedi kodlayan bölgelerde yer alırken geri kalan 63 (%75.9) UTR bölgelerde yer aldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.56). Translasyona uğrayan gen bölgelerinde %60 translasyona uğramayan gen bölgelerinde ise %39.68'lik bir oranla trinükleotitler en yoğun mikrosatellit motifi olarak tespit edilmiştir.

Toplam 83 adet mikrosatellit lokusu içerisinde en yoğun mikrosatellit motifinin %44.58'lik oranla trinükleotitler olduğu saptanmıştır. Ancak trinükleotitlerin genik bölgelerde oldukça yoğun olmasına karşın doku, organ ve gelişme dönemine özgü

özellik gösteren mikrosatellit lokuslarında en yüksek oranda bulunan tekrar motiflerinin dinükleotitler olduğu göze çarpmıştır (Çizelge 4.55, Çizelge 4.56).

Çizelge 4.56. MEP gruplarındaki mikrosatellitlerin kodlayan ve kodlamayan (UTR) bölgelerine ait dağılımları

<i>Mikrosatellit</i>	<i>UTR</i>	<i>%</i>	<i>Kodlayan</i>	<i>%</i>
Dinükleotit	15	23.81	5	25.00
Trinükleotit	25	39.68	12	60.00
Tetranükleotit	12	19.05	1	5.00
Pentanükleotit	2	3.17	0	0.00
Hekzanükleotit	7	11.11	2	10.00
Bileşik	2	3.17	0	0.00
Toplam	63		20	

Zhang vd (2004) tarafından yapılan çalışmada *Arabidopsis* genomunun tamamında protein kodlayan ve kodlamayan sekanslar üzerinde en yoğun mikrosatellit bulunan bölgenin 5'-UTR bölgesi olduğunu belirlemişlerdir. Protein kodlayan sekanslar üzerinde ise en fazla gözlenen mikrosatellit motifinin istatistiksel olarak ($r^2=0.74$, $P<0.001$) önemli düzeyde bulunan trinükleotit mikrosatellit motifi olduğunu bildirmişlerdir. Morgante vd (2002) tarafından yapılan bir başka çalışmada da *Arabidopsis*, çeltik, soya, mısır ve buğdayın da bulunduğu bitki türlerinde kodlayan ve kodlamayan sekanslar üzerinde en fazla bulunan mikrosatellit motiflerinin trinükleotit ve hekzanükleotit mikrosatellit motifleri olduğunu belirlemişlerdir.

Lawson ve Zhang (2006) çeltik ve *Arabidopsis* bitki genomlarında yaptıkları çalışmalarında farklı genik bölgelerdeki mikrosatellit yoğunluğunu incelemişler ve her iki bitki genomu için 5'-UTR bölgelerinde diğer bölgelere göre (ekson, intron, 3'-UTR) daha fazla miktarda mikrosatellit bulunduğunu ve en yoğun mikrosatellit motifinin trinükleotitler olduğunu belirtmişlerdir. Yu vd (2004) buğday ve çeltik bitkisinde yaptıkları araştırmalarında trinükleotit mikrosatellit motiflerinin kodlayan bölgelerde %74 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir. Varsley vd (2005) tarafından tahıllarda yapılan çalışmada en yaygın mikrosatellit motifinin %54-78 oranlarında trinükleotitler olduğunu ardından %17.1 ile %40 arasında dinükleotitlerin bulunduğunu saptamışlardır. Bu tez çalışmasında da trinükleotitler incelenen mikrosatellit lokusları içerisinde protein kodlayan ve UTR bölgelerde en fazla

gözlenen mikrosatellit motifi olarak dikkat çekmiştir. Alınan bu sonuçlar daha önce *in silico* yöntemlerle yapılmış olan çalışmaları teyit eder niteliktedir (Yu vd 2004, Varsley vd 2005, Lawson ve Zhang 2006).

4.15.3. Mikrosatellit motiflerinin housekeeping ve doku spesifik gen bölgelerdeki dağılımları

Çalışmada kullanılan 83 AGi primer setinin elde edildiği EST dizileri kontig analizlerine alınarak bunların içerdikleri mikrosatellitlerin housekeeping veya doku organ spesifik genlerdeki dağılımları araştırılmıştır. Mikrosatellit lokuslarının protein kodlayan ve UTR gen bölgelerine göre dağılımları incelendiği zaman doku, organ ve gelişme dönemine özgü mikrosatellit lokusu sayısı 23 (%27.71) adet housekeeping bölgelerde bulunan mikrosatellit lokusu sayısı 60 (%72.29) adet olarak tespit edilmiştir.

Mikrosatellit motifleri yönünden housekeeping ve doku spesifik genlerdeki mikrosatellitler karşılaştırıldığında %43.48'lik bir oranla dinükleotitlerin doku spesifik genlerde bulundukları belirlenmiştir (Çizelge 4.57). Dinükleotitlerin ardından %26.09'luk oranla trinükleotitler ikinci sırada yer almıştır. Housekeeping gen bölgelerinde ise %51.67'lik bir oran 31 adet sayı ile trinükleotitler ilk sırada iken %16.67'lik bir oranla dinükleotitlerin trinükleotitlere oranla oldukça düşük bir oranda bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.57).

Doku, organ ve gelişme dönemine özgü mikrosatellit lokuslarından 7 adedi (%30.43) protein kodlayan gen bölgelerinde bulunurken 16 adedi (%69.57) translasyona uğramayan gen bölgelerinde bulunmuştur. Housekeeping mikrosatellit lokuslarından (60 adet) 13 adedinin (%21.67) protein kodlayan gen bölgelerinde, 47 adedinin (%78.33) ise translasyona uğramayan gen bölgelerinde bulunduğu saptanmıştır.

Toplam 20 adet dinükleotit tekrar içeren mikrosatellit lokuslarının %50'si doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik göstermiş ve %50'si de housekeeping özelliğe sahip olmuştur. Doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik gösteren

dinükleotit tekrarlarının 5 adedinin protein kodlayan gen bölgelerinde 5 adedinin de translasyona uğramayan gen bölgelerinde bulunduğu gözlenmiştir. Housekeeping özellik gösteren 10 adet dinükleotit tekrarın %33'ünün protein kodlayan %67'sinin ise kodlanmayan gen bölgelerinde olduğu görülmüştür. Mikrosatellit lokuslarından 37 adedi trinükleotit mikrosatellit motifi içermiş ve bunlardan 6 adedi (%26.09) doku, organ ve gelişme dönemine özgü ifade bulurken 31 adedi (%51.67) housekeeping gen özelliğine sahip olmuştur. Housekeeping gen özelliğine sahip en yoğun mikrosatellit lokusları trinükleotitler olarak tespit edilmiştir.

Translasyona uğrayan tetranükleotit içeren mikrosatellit lokuslarının tamamı housekeeping gen ifadesi gösterirken translasyona uğramayan tetranükleotit içeren mikrosatellit lokuslarının %33.33'ü doku, organ ve gelişme dönemine özgü, geri kalan %66.67'si ise housekeeping özellikte gen ifadesi göstermiştir. Pentanükleotit ve birleşik (compound) özellikte tekrar eden mikrosatellitlerin tamamı housekeeping özellik göstermiştir.

Çizelge 4.57. MEP gruplarındaki mikrosatellitlerin fonksiyonlarına (housekeeping ve doku spesifik) göre dağılımları

<i>Mikrosatellit</i>	<i>HK</i>	<i>%</i>	<i>DS</i>	<i>%</i>
Dinükleotit	10	16.67	10	43.48
Trinükleotit	31	51.67	6	26.09
Tetranükleotit	9	15.00	4	17.39
Pentanükleotit	2	3.33	0	0.00
Hekzanükleotit	6	10.00	3	13.04
Bileşik	2	3.33	0	0.00
Toplam	60		23	

Hekzanükleotit tekrarları içeren mikrosatellit lokuslarına ise %33.33'ü doku, organ ve gelişme dönemine özgü ifade bulurken %66.67'si housekeeping özellikte gen ifadesine katılmıştır. Protein kodlayan gen bölgelerinde bulunan hekzanükleotit tekrarların %50'sinin doku, organ ve gelişme dönemine özgü %50'sinin de housekeeping özellikte ifade bulduğu saptanmıştır. UTR gen bölgelerinde bulunan hekzanükleotitlerin ise %28.57'si doku, organ ve gelişme dönemine özgü ifade olurken %71.43'ü housekeeping özellikte ifade bulmuştur.

Bitki türlerinde oldukça sınırlı olduğu bilindiği için tez çalışması kapsamında elde edilen bulgularımız diğer çalışmaların sonuçları ile yeterli miktarda tartışılmamaktadır. Ancak Lawson ve Zhang'ın (2008) fare ve insan genomunda yaptıkları çalışmada *in silico* analiz sonuçlarına göre housekeeping genlerde bulunan mikrosatellit yoğunluğu doku, organ spesifik genlerde bulunan mikrosatellit yoğunluğundan 1.7 kez daha yüksek oranda bulunduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada doku, organ spesifik genler ile housekeeping genlerin içerdikleri mikrosatellit baz içeriklerinin ve motiflerinin birbirlerinden farklı olduğu da ortaya koyulmuştur.

Be tez kapsamında mikrosatellitlerin gen regülasyonunda katılabileceği fikri daha önce yapılmış çalışmalarla desteklenmiştir (Ganapathi vd 2005, Eller vd 2007). Bu çalışmada da mikrosatellitlerin özellikle protein kodlayan bölgelerde değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Metzgar vd 2000). Ayrıca doku spesifik genlerde bulunan mikrosatellitlerin genlerin UTR kısımlarında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Housekeeping genlerin trinükleotit mikrosatellitlerin daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında doku, organ ve gelişme dönemine özgü mikrosatellit motiflerinin çoğunluğunun dinükleotitlerden oluştuğu saptanmıştır. Fakat insanda Sharma vd (2003, 2005) tarafından yapılan farklı çalışmalarda dinükleotit mikrosatellit motiflerinin housekeeping genlerde yoğun olduğu ve özellikle [TG/CA] mikrosatellit motifinin yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir.

4.15.4. Mikrosatellitlerin GenBank homolojilerine göre sınıflandırılması

Çalışmada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) homoloji analizine tabi tutulan toplam 83 primer setinin dizayn edildiği mikrosatellit içeren EST sekansı içerisinde 61 adet primer setinin temsil ettiği housekeeping veya 23 adet primer setinin temsil ettiği doku, organ yada gelişme dönemi spesifik özellik gösteren ifade edilmiş gen veya gen parçacıklarıyla GenBank verilerinde bulunan fonksiyonları bilinen ya da henüz belirlenmemiş gen veya gen parçacıkları arasında yüksek düzeyde homoloji oluşturdıkları saptanmıştır. Analiz sonucuna göre toplam 22 adet EST sekansı için mevcut GenBank verileri düzeyinde herhangi bir homoloji tespit

edilememiştir (Çizelge 4.58). Bu durum özellikle mikrosatellit içeren genlerin GenBank veri tabanında yeterince temsil edilmediği yönünde yorumlanmıştır. Günümüzde birçok araştırmacı mikrosatellitlerin fonksiyonel rolleri konusunda tam bir ortak görüşe sahip olmamaları nedeni ile mikrosatellit içeren genlere yönelik çalışmalar sınırlıdır.

Toplam 60 adet housekeeping gen veya gen parçacıklarında yer alan mikrosatellit içeren sekanslar içerisinde 19 adet mikrosatellit içeren sekansın hücre büyümesi ve bölünmesi, hücre zarı yapısı, DNA bağlanma, hücre duvarı proteinlerinin bileşimi, transkripsiyon regülasyonu, proteinlerin hücreler arası taşınması, genel savunma mekanizması gibi fonksiyonları bilinen genler ile yüksek düzeyde homoloji oluşturduğu yapılan homoloji analizleri ile belirlenmiştir. Geri kalan 41 adet housekeeping gen veya gen parçacıkları içerisinde 16 adedi ile herhangi bir homoloji tespit edilemezken 26 adedinin mevcut GenBank verileri içerisinde henüz karakterize edilmemiş ve fonksiyonları belirlenmemiş olan farklı bitki türlerinden elde edilmiş sekans verileri ile homoloji oluşturduğu belirlenmiştir. Bu gen grupları içerisinde mikrosatellit lokuslarının önemli bir düzeyde bulunduğu tespit edilmiştir.

Doku, organ ve gelişme dönemi spesifik gen veya gen parçacıklarında yer alan 23 adet sekans içerisinde 13 adet mikrosatellit içeren sekansın fruktokinaz, karbonik anhidraz, süperoksidad dismutaz gibi fonksiyonları bilinen genler ile yüksek düzeyde homoloji oluşturduğu saptanmıştır. Geri kalan 10 adet içerisinde 6 adedi ile herhangi bir homoloji tespit edilemezken 4 adedinin mevcut GenBank verileri içerisinde henüz karakterize edilmemiş ve fonksiyonları belirlenmemiş olan farklı bitki türlerinden elde edilmiş sekans verileri ile homoloji oluşturduğu görülmüştür.

4.15.4.1. MEP TiP I

BLAST homoloji sonuçlarına göre tüm dokularda ifade bularak MEP TiP I grubuna giren 60 adet primer setinin temsil ettiği ifade edilen gen parçacığı içeren sekansların hücresel fizyoloji ile ilgili görevleri olan housekeeping genler içerisinde yer aldıkları tespit edilmiştir. Bu genler bazı çalışmalarda da bilinen tüm koşullarda farklı dokularda sabit seviyelerde transkripsiyona ve translasyona uğrayan genler

olarak nitelendirilmiştir (Lawson ve Zhang 2008). Yapılan homoloji analizine göre housekeeping genler olarak belirtilen ve tüm dokularda ifade bulan gen parçacıkları ile yüksek düzeyde homoloji gösteren GenBank veri tabanında bulunan gen veya gen kısımlarına ait bilgiler Çizelge 4.58’de sunulmuştur.

AGi003 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusu DNA dizisi tütün bitkisine ait transkripsiyon regülasyonunda görev alan transkripsiyon faktör geninin mRNA’sı ile $7E^{-68}$ değeri ile homoloji gösterirken AGi009 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait dizi patates bitkisinde genel savunma mekanizmasında görev alan ACRE 132 mRNA’sı ile $3E^{-176}$ değeriyle homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Her iki primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokuslarında mikrosatellit bölgesi translasyona uğramayan bölgelerde bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.58). Bu bilgiler ve çalışmanın bütün kısımlarından elde edilen bilgiler ışığında housekeeping genlerinin büyük bir kısmında mikrosatellitin UTR kısımlarında yer aldığı öngörülmüştür.

Housekeeping genler içerisinde yer alan bir gen veya gen parçası üzerinde kodlayan bölge üzerinde bulunan AGi019 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesini bulunduran sekans verisi domates bitkisinden sekanslanarak belirlenen ve bir nüklear proteini kodlayan Nop56 mRNA sekansı ile $2E^{-97}$ değeriyle homoloji meydana getirmiştir.

Translasyona uğramayan bölgede yer alan AGi028 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit alanına veya domainine ait sekans verisi ile patates bitkisinde yumru oluşumunda görevli stolon ucu proteini mRNA’sı arasında $2E^{-127}$ değeriyle homoloji tespit edilmiştir. AGi031 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesi sekans verisi ile yine biber bitkisi (*C. annuum* L.) türüne ait (DQ247968.1 lokusu) etilene hassas element bağlanma proteini mRNA sekansı arasında $E=0$ değeriyle homoloji bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.58). Bu değer bu tez çalışmasında elde edilen lokusa ait sekans bilgisi ile GenBank veri tabanında bulunan sekans bilgisinin aynı olduğunu göstermiştir.

Capsicum chinense L. türünde hücre genişlemesi ve bölünmesinde etkili bir protein olarak tespit edilmiş olan oksin teşvikleyici proteinin mRNA'sı ile AGi032 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait sekans bilgisi arasında $E=0$ değeriyle homoloji olduğu belirlenmiştir. Bu E değeri ile AGi032 primer setinin oksin teşvikleyici proteinin gen bölgesini hedeflemiş olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.58).

Patates bitkisinde su kaybında ve yağ taşınmasında görev alan siklaz/dehidraz proteinin mRNA sekansı ile yine $E=0$ değeriyle homoloji oluşturan AGi042 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusunda mikrosatellit motifinin protein kodlayan bölgede bulunduğu görülmüştür. Biber bitkisinde dehidrasyonla ilgili genlerin bulunması özellikle kurağa ve soğuğa dayanıklılıkta önem arz etmektedir. Bu nedenle AGi042 primer seti kullanılarak biberde siklaz/dehidraz genlerinin tespiti çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmüştür.

Mikrosatellit motifi protein kodlayan bölge içerisinde bulunan AGi048 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesine ait sekans verisi ise patates bitkisinde tRNA sentezinden sorumlu olan tRNA sentetaz enziminin mRNA sekansı ile $8E^{-165}$ değeriyle homoloji tespit edilmiştir. Bu tez kapsamı içerisinde AGi048 primer seti uygulanmış olan kriterlerle housekeeping gen grubuna dahil edilmiştir. Transfer RNA sentetaz enzimi her hücrede bulunan bir enzim olması nedeni ile housekeeping fonksiyonuna sahiptir. Bu bağlamda çalışmada kullanılan grublamanın gerçeği yansıttığı düşünülmüştür.

AGi040 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit EST sekansı ise *Nicotiana glauca* L. bitkisinde transkripsiyon regülasyonundan sorumlu U2 snRNP yardımcı faktörüne ait sekans ile $2E^{-53}$ değeriyle homoloji tespit edilmiştir (Çizelge 4.56). Bu çalışmada AGi040 primer seti MEP TiP IB'de yer almaktadır ve kullanılan bütün cDNA kütüphaneleri arasında polimorfizm göstermemiştir. Ökaryotik post-transkripsiyon mekanizmasından sorumlu olduğu bilinen U2 snRNP yardımcı faktörüne ait gen ifadesinin bütün dokularda benzer düzeyde ifade etmiş olması housekeeping fonksiyonundan kaynaklanmaktadır.

C. annuum L. bitkisinde DNA bağlanma proteini olarak görev alan proteinin mRNA sekansı $2E^{-97}$ değeriyle AGi052 primer setinin oluşturulduğu amplikon sekans verisi ile homoloji oluşturduğu tespit edilmiştir. DNA transkripsiyonun da genel ve özel fonksiyonları bulunan transkripsiyon faktörleri veya trans elementleri bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında AGi052 housekeeping fonksiyonu bulunan MEP TiP I grubunda yer almıştır. Çalışılan dokular arasında polimorfizm göstermeyen bu lokus büyük bir olasılıkla genel transkripsiyon faktörü (DNA bağlanma proteini) olduğu ve mikrosatellit içeriği ile oluşturduğu ardışık amino asit tekrarları ile DNA protein interaksiyonunda görev yapmakta olduğu düşünülmüştür.

Arabidopsis bitkisinde remorin proteini olarak DNA bağlanmasında görev alan proteinin mRNA sekansı ise AGi060 primer setinin elde edildiği EST DNA dizi bilgisi ile $1E^{-20}$ değeriyle orta düzeyde homoloji meydana getirmiştir (Çizelge 4.58). Vasküler bitkilerde plasmodemata ve hücre zarının mozaik yapısında bulunan remorin proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte Raffaele vd (2009) *Solanaceae* familyasında Potato virus X (PVX) hareketini kısıtladığını savunmuştur. Bu durum AGi060 lokusunun irdelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Tütün bitkisinde hücre membranı proteini olan sistein amino asitince zengin elongasyon (uzama) proteini 2 mRNA sekans bilgisi ile üzerinde AGi071 primer setinin bulunduğu mikrosatellit EST sekansı $7E^{-93}$ değeriyle homoloji göstermiştir. AGi071 bu çalışmada MEP TiP I grubuna dahil edilmiştir ve housekeeping fonksiyonuna sahip olduğu öngörülmüştür. AGi071 [CCACGA]₄ mikrosatellit alanı ile sistein amino asitince zengin polipeptit oluşturarak housekeeping fonksiyonu göstermektedir.

C. annuum L. bitki türüne ait GenBank lokusu AY496092.1 sekansı ile AGi083 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit EST sekansı arasında $5E^{-106}$ değeriyle homoloji olduğu saptanmıştır. Homoloji verilerinden yararlanarak AGi083 lokusunun hücreler arası protein alışverişinden sorumlu olan ADP-ribosilasyon faktörü genine benzer fonksiyonu olabileceği belirlenmiştir.

Domates bitkisinden elde edilen transkripsiyon regülasyonunda görev alan TAF12 (transkripsiyon inisasyon faktörü TFIID 12. alt ünitesi) mRNA'sı ile AGi092 primer setinin temsil ettiği lokusa ait sekans verisi $2E^{-52}$ değeriyle homoloji göstermiştir (Çizelge 4.58). Domates bitkisinin DNA bağlanma proteini mRNA'sı ile AGi108 primer setinin temsil ettiği lokus sekansı arasında $2E^{-103}$ değeriyle homoloji olduğu saptanmıştır. Transkripsiyon faktörlerin bir bölümü doku veya organ spesifik özellik gösterebilirken diğer bir bölümü genel transkripsiyon faktörleri olup housekeeping fonksiyonlarına sahiptir. Bu çalışmada AGi092 primer seti MEP TiP I grubunda yer almış ve AGi092 lokusunun housekeeping fonksiyonu teyit edilmiştir.

Domates bitkisinin farklı genotiplerden elde edilen ribozomun yapısına katılan ribozomal proteinlerin mRNA dizileri ile AGi098 primer setinin lokus sekansları arasında $1E^{-136}$ ve AGi100 primer setinin temsil ettiği lokus sekans verisiyle $1E^{-164}$ değeriyle homoloji gösterdikleri tespit edilmiştir. Domates bitkisinde fotosentezde görevli LPA1 proteini mRNA'sı ile AGi115 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit EST sekansının $5E^{-137}$ değeriyle homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Housekeeping gen grubu içerisinde yer alan AGi120 primer setinin temsil ettiği lokus sekansı ile patates bitkisinde adenilat translokasyonunda görevli olduğu bilinen brittle 1 proteinini mRNA sekansı arasında $4E^{-48}$ değeriyle homolojinin var olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.58).

4.15.4.2. MEP TiP II

Bu grupta yer alan mikrosatellit lokusları içerisinde AGi026 mikrosatellit lokusu haricinde yer alan diğer mikrosatellit lokusları ile GenBank verilerinde bulunan sekans verileri arasında önemli bir homoloji belirlenmemiştir. AGi026 mikrosatellit lokusunda perikarp ve plasenta dokularından farklı gelişme dönemlerinden elde edilmiş olan cDNA kütüphanelerinde ampikon elde edilememiştir. AGi026 mikrosatellit domaininde UTR bölgesinde oldukça uzun [AG] mikrosatellit motifinin varlığı sekans analizi ile teyit edilmiştir.

BLAST analizi sonucu Kaliforniya haşhaşı (*Eschscholzia californica* Cham.) bitkisine ait (EU200154.1) transkripsiyon regülasyonunda çinko parmak ana domain

protein 1 olarak görev yapan genin mRNA sekansı ile AGi026 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokus sekansı arasında $2E^{-28}$ değeriyle homoloji bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.58).

Bu çalışmada AGi026 primer seti MEP TiP II grubunda yer almıştır. Bu bulgu bu mikrosatellit bölgesine [ACC/GGT] sahip genin dokular veya gelişme dönemleri özgü farklı ekspresyon özelliği olan özel bir transkripsiyon faktörünü kodlayabileceğini göstermiştir. Mikrosatellit içeren genlerin gen regülasyonu ile ilişkileri az düzeyde de olsa çalışılmıştır. Örneğin Dresselhaus vd (1999) mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmalarında 5'UTR bölgelerinde [CCG]_n mikrosatellit domaini içeren bazı protein genlerinin fertilizasyonun regülasyonunda etkili olduklarını göstermişlerdir.

MEP TiP II grubunda yer alan 16 cDNA kütüphanesinde farklı gen ekspresyon profilleri oluşturan [AT/TA] mikrosatellit içerikli AGi014, [TTCT/AGAA] içerikli AGi047 ve [AG/CT] içerikli AGi103 primer çiftlerinin temsil ettiği mikrosatellit lokuslarının biyolojik aktivitelerinin belirlenebilmesinde uygulanan GenBank homoloji testlerinden homolojiler belirlenememesi nedeniyle yararlanılamamıştır.

MEP TiP II grubunda bulunan mikrosatellitlerin üzerlerinde bulundukları genlerin transkripsiyon ekspresyonlarını etkilediği ve bu nedenle bazı ampikonların dokular arasında polimorfizm gösterdiği tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda dinükleotit mikrosatellitlerin üzerlerinde bulundukları genlerin ekspresyonlarını artırdığı (Gebhardt vd 1999), bazı mikrosatellitlerin ise transkripsiyonel aktivitesini azalttığı (Okladnova vd 1998, Searle vd 1999) bildirilmiştir. Transkripsiyonların mikrosatellitler aracılığı ile regülasyonunda Z-DNA veya H-DNA gibi alternatif DNA yapılarının oluşturulması neden olabileceği düşünülmüştür (Rich 1993). Ancak MEP TiP II grubunda yer alan mikrosatellitlerin gen ekspresyonuna katkıları başka mekanizasyonlarla olduğu öngörülmüştür. Z-DNA ve H-DNA formları DNA üzerinde ve özellikle transkripsiyona alınmayan bölgelerdeki DNA konformasyonundan kaynaklanabilmektedir (Zamore vd Green 1991, Okladnova vd 1998, Searle vd 1999, Rich 1993).

4.15.4.3. MEP TiP III

Bu grupta yer alan mikrosatellit lokuslarından AGi046 haricinde AGi013 ve AGi016 lokusları GenBank homoloji analizlerinde pozitif sonuçlar vermiştir. AGi046 lokusu [TAA/AAT] mikrosatelliti içermektedir. 16 farklı cDNA kütüphanesi üzerinde AGi046 lokusuna ait iki allel (371 ve 368 bp) sadece 15 ÇGS plasenta dokusunda belirlenirken diğer bütün kütüphanelerde tek allel bulunmaktadır. AGi016 lokusunun her iki allelde de mikrosatellit bulunmakta ve 371 bp allelinde tekrar sayısının arttığı belirlenmiştir. Her iki allelde bulunan mikrosatellit alanının UTR bölgesinde bulunması ve 371 bp allelin sadece 15 ÇGS plasenta dokusunda bulunması bu allelin plasenta döneminde ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlenmiş ancak GenBank veri tabanında homoloji gösteren başka bir genin bulunmaması nedeni ile fonksiyonu bu çalışma kapsamında açıklanamamıştır. AGi046 mikrosatellit lokusunun biyolojik aktivitesinin öğrenilmesi ve mikrosatellit içeriğinin gen regülasyonunda aldığı görevin aydınlatılması yararlı olacaktır (Çizelge 4.58).

Soya bitkisinin GenBank lokusu FJ014783.1 fosforilizasyon da önemli rolü olan protein kinaz mRNA sekansı ile AGi013 primer setini ampikonu $6E^{-79}$ gibi oldukça yüksek homoloji değeriyle benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.58). AGi013 primer setinin 16 cDNA kütüphanesi üzerinde oluşturdukları mikrosatellit ampikon sayılarının farklı olduğu gözlenmiştir. Tüm dokularda 270, 264 ve 158 bp büyüklüğünde üç ampikon elde edilmesine rağmen genç kök dokusunda 270, 264, 170, 164 ve 158 bp büyüklüklerinde toplam beş adet ampikon meydana gelmiştir. Fosforilizasyon gen regülasyonunda oldukça önemli bir yer aldığı uzun yıllardan beri bilinen bir gerçektir. AGi013 lokusunun bazı allellerinin sadece kök dokusunda ifade etmesi ve bu ifadede oluşturulan genin özel bir fosforilizasyon enziminin üretilmesi ve bu fosforilizasyon proteininin mikrosatellit içermesi mikrosatellitlerin gen ifadesinde kodladığı genlerle de etkili olduğunu göstermektedir. Ranum ve Day (2002) genlerin 3'-UTR bölgesinde bulunan mikrosatellit varyasyonlarının transkripsiyonunun regülasyonunda önemli olabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada AGi013 lokusundan elde edilen bilgiler ışığında mikrosatellit varyasyonunun doku organ ve gelişme döneminde etkili olabileceği görülmüştür.

AGi016 primer setini temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait 161 bp uzunluğundaki allel sekans bilgileri tütün bitkisinde (GenBank lokusu U71108.1) hücre zarı yapısında bulunan ve sterol-C metiltransferaz geni mRNA sekansı ile $4E^{-40}$ değeriyle homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.58). Bitkilerde sterol biyosentezinde rol alan sterol C metil transferaz enziminin farklı izoformları mevcut olup bu çalışmada alınan genç kök dokusuna özgü sterol C metil transferaz enziminin bu izoformlardan hangisi olduğu yapılabilecek farklı çalışmalar sonucu belirlenebilecektir.

AGi016 lokusuna ait ikinci allele sadece kök dokusunda bulunması ve diğer dokularda bulunmaması nedeni ile AGi016 MEP TiP III grubuna alınmıştır. Ancak bu allelin GenBank verileriyle karşılaştırıldığında hiçbir homoloji sonucu elde edilememiştir. AGi016 primer çifti genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PZR çalışmaları tek bir ampikon oluşturması kök dokusu hariç diğer bütün cDNA kütüphanelerinde de genomik DNA'da elde edilen ampikonun elde edilmiş olması kök dokusunda cDNA PZR çalışmaları elde edilmiş olan ikinci allelin genomik DNA'nın direk transkripsiyonu ile elde edilen bir gen parçası olmadığında işaret etmektedir.

AGi016 lokusunun kök dokusunda oluşmuş olan ikinci allele alleldeki mikrosatellit artışı büyük bir ihtimalle 3 farklı post-transkripsiyon modifikasyonundan biri veya bu modifikasyonlardan ikisinin bir arada bulunması ile oluşmuş olabilir. RNA edisyonu (RNA Editing) ökaryotik gen regölasyonunda bulunan bir mekanizma olup bu mekanizma ile DNA üzerinde olmayan yeni nükleotitler mRNA üzerinde oluşturulabilmektedir. (Brennicke vd 1999, Hefferon 2004). Diğer bir mekanizma ise alternatif siplisin olayıdır. Alternatif siplisin genomda bulunan bir lokustan farklı iki allelin üretilmesi şeklinde gerçekteşebilmektedir (Brett vd 2002). Üçüncü mekanizma ise RNA sentezi sırasında RNA polimerazın mikrosatellit alanının transkripsiyonunda kayarak düşmesi ve düştüğu alanda bulunan nükleotit sayısındaki artışların oluşmasıdır (Klitschair ve Wiegand 2003, Wills ve Atkins 2006). AGi016 lokusunda bu mekanizmalardan hangisinin kullanıldığının belirlenmesi amacı ile yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.15.4.4. MEP TiP IV

Bu grupta yer alan mikrosatellit lokuslarından GenBank verilerinden aynı gen homoloji gösteren AGi001, AGi002 ve AGi118 mikrosatellit lokuslarına ait homoloji analiz sonuçları bir arada sunulmuştur. AGi101 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusu sekansı ise GenBank verilerinden her hangi biriyle homoloji meydana getirmediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.58).

AGi101 lokusunda [TCA] mikrosatelliti bulunmakta olup farklı biber türlerine ait genomik DNA'lar arasında polimorfik sonuçlar oluştururken ve bu lokus 16 cDNA kütüphanesinde yoğunluk farkı polimorfizm oluşturduğu tespit edilmiştir. Organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü kütüphaneler üzerinde farklı ifade etmiş olması bu lokusun housekeeping fonksiyonu dışında doku spesifik bir ekspresyon gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Toutenhoofd vd (1998) ve Kenneson vd (2001) yaptıkları araştırmalarda genlerin üzerlerinde bulunan mikrosatellit tekrar sayısının artması veya azalması genlerin transkripsiyon miktarını doğrudan etkilediklerini öne sürmüşlerdir. Protein kodlayan bölgelerdeki mikrosatellit tekrar sayılarının büyük oranda arttırılması translasyonda oluşan proteinlerin toksik etkilerine neden olabildiği gibi translasyonun hızı ve bazı durumlarda translasyonun miktarını da etkileyebilmektedir. AGi101 lokuslarının farklı cDNA amplikon sekanslarının incelenmesi ile bu lokusun mikrosatellit içerikleri yönünden bir farklılığın olmadığı gözlenmesi bu lokusun Toutenhoofd vd (1998) ve Kenneson vd (2001) tarafından öne sürülen mikrosatellit regülasyonları ile açıklanamayacağı ancak başka bir mekanizmanın var olduğunu göstermektedir. Doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik gösteren AGi101 mikrosatellit lokusunun fonksiyonel görevinin ve gen regülasyonunda olabilecek etkisinin bilinmesi için detaylı fonksiyonel genomik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tütün bitkisinde karbondioksit fiksasyonunda görevli olduğu belirlenen karbonik anhidraz geni (CA) mRNA sekansı (M94135.1) bilgisi ile AGi001 primer setinin oluşturduğu mikrosatellit EST sekansı $2E^{-95}$ değeriyle oldukça yüksek düzeyde homoloji göstermiştir. Yine tütün bitkisinin başka bir GenBank lokusu olan L19255.1

ile AGi002 lokusu arasında $3E^{-121}$ değeriyle homoloji bulunduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan AGi118 primer setinin bulunduğu mikrosatellit EST sekansı ile yine tütün bitkisinde GenBank lokusu AF454759.2 arasında $2E^{-176}$ değeriyle benzerlik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.58).

AGi001, AGi002 ve AGi118 lokuslarının karbondioksit fiksasyonunda görevli olduğu belirlenen beta-karbonik anhidraz geni (CA) mRNA sekansı arasında belirlenmiş olan yüksek düzeydeki homoloji bu lokusların CA genine benzer fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir. Bu lokuslara ait MEP profillerinin incelenmesi ile amplikon yoğunluklarının her üç mikrosatellit lokusu için en yüksek olarak genç ve olgun yaprak dokularında saptanırken perikarp, plasenta, kök, olgunlaşmamış ve olgun tohum dokularında ya hiç ya da çok az seviyede olduğu saptanmıştır.

Her üç lokusta (AGi001, AGi002 ve AGi118) da mikrosatellit bölgesinin genin UTR bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. Her üç lokusta da mikrosatellit motifi [TCT] meydana geldiği sekans analizleri ile tespit edilmiştir. Karbonik anhidraz geninin bitkilerde bilinen b familyasına ait CA1 ve CA2 olarak isimlendirilen iki izoformu bulunmaktadır. Karbonik anhidraz 1 izoformu sadece kloroplastta bulunurken karbonik anhidraz 2 izoformunun sitozolde bulunduğu belirlenmiştir. Fabre vd (2007) vd Fabre vd (2008) *Arabidopsis* bitkisinde yaprak, sap, çiçek, süluk meyve ve kök dokularını kullanarak yaptıkları çalışmalarında dokular arasında karbonik anhidraz geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında da mikrosatellit içeren genlerin cDNA kütüphanelerinde varlığı ya da yokluğunun veya mevcut ekspresyon seviyesi üzerine mikrosatellit tekrarlarının bulunduğu yerin etkisi ortaya koyulmuştur. Ancak bu fikrin daha detaylı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Biber bitkisinde bulunan CA enzimleri tam anlamı ile karakterize edilmemiştir. Bu durum AGi001, AGi002 ve AGi118 lokuslarının kullanılarak biber CA enzimlerinin karakterizasyonunda kullanılabileceğini göstermektedir (Çizelge 4.58).

4.15.4.5. MEP TiP V

AGi010, AGi030, AGi039, AGi070, AGi078, AGi094, AGi041, AGi064, AGi090, AGi091 ve AGi117 primer çiftlerinin temsil ettiği mikrosatellit lokuslarının yer aldığı bu gruba ait GenBank veri tabanıyla gerçekleştirilen homoloji analiz sonuçları sırasıyla açıklanmıştır (Çizelge 4.58).

AGi010 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait sekans bilgisi domates bitkisinin GenBank lokusu AP010263.1 ile homoloji gösterdiği tespit edilmesine rağmen AP010263.1 lokusunun fonksiyonu belirlenmemiş olması nedeni ile AGi010 lokusunun fonksiyonu GenBank verilerine dayanarak belirlenememiştir. Bu çalışmada belirlenen ve 16 farklı cDNA kütüphanesi üzerinde kullanılan AGi010 lokusu 3 farklı allel oluşturmakta ve bu alleller organ, doku veya gelişme dönemlerine göre farklı ekspresyon göstermektedir. Bu durum AGi010 lokusunun doku fingerprinting çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

MEP TiP V grubunda yer alan AGi030, AGi039 ve AGi078 amplikonlarının sekans dizileri ile GenBank sekans verileri arasında homoloji analizlerinden pozitif sonuçlar alınamamış olup bu primer çiftlerinin temsil ettiği doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik gösteren mikrosatellit lokuslarının bitki üzerinde oluşturduğu fonksiyonel görevinin ve gen regülasyonunda mevcut etkilerinin belirlenebilmesi için detaylı fonksiyonel genomik çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

AGi070 ve AGi094 primer setlerinin temsil ettiği mikrosatellit lokusları için mevcut primerler ile mevcut 16 cDNA kütüphanelerinden çoğaltılan amplikonların yapılan sekans analizleri sonucu belirlenen diziler Expasy programı kullanılarak translasyona gerçekleştirilmiş ve elde edilen amino asit sekansları değerlendirilmiştir. Bu primer çiftleri kullanılarak elde edilmiş amplikonların amino asit dizilimi içlerinde yabancı domatesinde bulunduğu bazı bitki türlerinden elde edilen fruktokinaz genleri ile yüksek seviyede homoloji göstermiştir. Özellikle AGi070 primer setinin yabancı domates (*Solanum hirsutum* Dunal.) bitkisinin GenBank lokusu AY325501.1 ile benzerlik gösterdiği bu lokusun bitkide fruktokinaz aktivitesine sahip olduğu

bilinen sekans ile $9E^{-131}$ değeriyle yüksek düzeyde homoloji oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.58).

Günümüzde domateste 2 farklı fruktokinaz geni olduğu bilinmektedir. Fruktokinaz 1 (*Frk 1*) mRNA'sı sabit bir seviyede domateste meyve gelişimi boyunca ifade edildiği belirlenmiştir. Ancak fruktokinaz 2 (*Frk 2*) mRNA'sı genç domates meyvelerinde yüksek seviyede eksprese olurken meyve gelişiminin sonraki aşamalarında ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Odanaka vd 2002).

MEP gruplandırmaları, sekans analizleri ve homoloji testlerine dayanarak AGi070 ve AGi094 lokuslarının büyük olasılıkla biberde fruktokinaz genlerini temsil ettiği ve en az iki farklı izoformunun bulunduğu öngörülmüştür. Bu iki izoformdan birinin (muhtemelen *Frk 2*) özellikle 15 ÇGS perikarp dokusunda yüksek seviyede eksprese olurken genç yaprak, çiçek tomurcuğu, çiçek parçacıkları, kök ve olgun tohumda alt seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Öte taraftan diğer izoformunun (muhtemelen *Frk 1*) genç meyve dokusu haricindeki tüm dokularda yüksek seviyede ifade olduğu saptanmıştır.

Biberde *Frk 1* ve *Frk 2* genlerinin ekspresyon farklılığının 5'-UTR bölgesinde bulunan dinükleotit mikrosatellit motifinin tekrar farklılığından kaynaklanabileceği tespit edilmiştir. Rothenburg vd (2001) Z-DNA formunda $[AC]_n$ ya da $[AT]_n$ tekrarlarının bulunduğunu ifade etmişlerdir. DNA'nın B ya da Z formu bu tekrarların kodladıkları lokusların gen ekspresyonunu etkilediklerini belirtmişlerdir. Ayrıca Bao vd (2002) çeltik bitkisinde nişastanın fizyokimyasal özellikleriyle waxy ve SSS genlerinin 5'-UTR bölgelerinde bulunan mikrosatellit varyasyonunun arasında korelasyon olduğunu ispatlamışlardır. Tüm bu bulgularla benzer şekilde AGi094 primer setinin domates bitkisinin U62329.1 nolu aksesyonundan sekanslanarak bitkide Fruktokinaz (*Fkr*) mRNA'sı olduğu bilinen sekans ile $3E^{-74}$ değeriyle homoloji meydana getirmiştir (Çizelge 4.58).

AGi041 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait sekans domates bitkisinin fonksiyonu belirlenmemiş olan GenBank lokusu AK224819.2 sekansı ile

$2E^{-78}$ değeriyle homoloji oluşturduğu görülmüştür (Çizelge 4.58). AGi117 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit lokusuna ait sekans ise yine domates bitkisinin diğer bir fonksiyonu belirlenmemiş olan GenBank lokusu BT013611.1 sekansı ile $3E^{-10}$ değeriyle homoloji oluşturmuştur. Doku, organ ve gelişme dönemi spesifik özellik gösteren mikrosatellit lokuslarının bitki üzerinde oluşturduğu fonksiyonunun ve gen regülasyonunda etkilerinin bilinmesi için ayrıntılı fonksiyonel genomik çalışmalar yapılmalıdır.

AGi064, AGi090 ve AGi091 primer çiftlerinin temsil ettiği mikrosatellit lokusları için yapılan sekans analizleri sonucu belirlenen diziler değerlendirilmiştir (Çizelge 4.58). Bu primer çiftleri kullanılarak elde edilmiş amplikonların amino asit dizilimi içlerinde yabani domatesinde bulunduğu bazı bitki türlerinden elde edilen bitkilerde abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile ilişkili olan Cu/Zn süperoksidaz dismutaz (SOD) genleri ile yüksek seviyede homoloji göstermiştir.

AGi064 primer setinin elde edildiği EST sekans dizisi biber bitkisine ait GenBank lokusu AF009734.1 Cu/Zn süperoksidaz dismutaz aktivitesi gösteren sekans bilgisi ile $E=0$ değeriyle tam olarak homoloji meydana getirmiştir. Bu durum AGi064 lokusunun Cu/Zn süperoksidaz aktivitesine sahip gene ait olduğunu göstermektedir. Süper oksidaz dismutaz (SOD) geni bir bitki antioksidanı olarak savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır. AGi064 primer setinin genomik DNA üzerinde tek amplikon meydana getirmesi bu genin biberde 15 [TC] tekrarı içeren tek lokustan olduğunu düşündürmüştür. Ancak 16 cDNA kütüphanesi üzerinde meydana getirdiği 4 farklı büyüklükte amplikon varlığı ile dinükleotit tekrar sayısı farklılığı ortaya koyulmuştur.

AGi064 amplikonuna ait sekanslama ve kontig analizleri farklı büyüklükteki amplikonlardaki mikrosatellit varyasyonun 10 ila 16 arasında değişen dinükleotit tekrar sayısından kaynaklandığını göstermiştir. Bu sonuç ile yapılan bazı çalışmalarda da vurgulanan dinükleotit tekrar sayısındaki artış ve azalışın transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyon) ekson siplisin etkinliği ya da RNA konformasyonunda meydana gelen değişim nedenlerine bağlı olabileceği düşünülmüştür (Tian 2000, Hefferon

2004). Bu durum farklı antioksidan savunma sistemine sahip bitkilerde farklı [TC] dinükleotit tekrar sayısı olan SOD mRNA'larının varlığına dikkat çekmektedir.

Hile vd (2000) ve Brochede vd (2002) yaptıkları çalışmalarda sistik fibrosiz transmembran geçirgenlik regülatör geninin (CFTR) ekson siplisin etkinliği üzerinde [TG] dinükleotit tekrar sayısı değişikliğinin etkili olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde AGi090 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesi domates bitkisinin GenBank lokusu AF354748.1 süperoksidaz dismutaz geni sekansı ile $7E^{-166}$ değeriyle homoloji göstermiştir. AGi091 primer setinin temsil ettiği mikrosatellit bölgesi ise domates bitkisinin GenBank lokusu AF354748.1 süperoksidaz dismutaz geni sekansı ile $1E^{-163}$ değeriyle homoloji oluşturmuştur.

GenBank homoloji analizlerinin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen bilgiler özetle:

- i) Bitki fizyolojisi ile ilgili olan birçok gen mikrosatellit içermektedir.
- ii) Bazı genlerin kodladığı izoform protein veya enzimlerde farklı sayıda mikrosatellit tekrarları bulunmaktadır.
- iii) Genlerde bulunan mikrosatellitler RNA editing, alternatif siplisin veya mRNA slippage gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlar etkisi ile organ, doku veya gelişme dönemlerine özgü ekspresyon gösterebilmektedir.
- iv) Mikrosatellit motif tiplerinden trinükleotit mikrosatellitler housekeeping fonksiyonuna sahip genlerde daha yaygın olarak bulunmaktadır.
- v) Dinükleotit mikrosatellitler organ, doku veya gelişme dönemine özgü genlerde daha yaygın olarak bulunmaktadır.
- vi) Genlerde bulunan mikrosatellitlerdeki varyasyonlar protein turnikasyonlarına yol açabilmektedir.
- vii) Genlerde bulunan bazı mikrosatellit varyasyonları amino asit dizilerinde değişimlere ve dolayısıyla farklı proteinlerin oluşumuna neden olabilmektedir.

Çizelge 4.58. MEP grupları ve GenBank homoloji analizleri

Lokus	Bölge	Tip	Tür Adı	GenBank	E	Homoloji	Bitkilerde Fonksiyonları
AGi001	UTR	DS	<i>Nicotiana tabacum</i>	M94135.1	2E ⁻⁹⁵	Karbonik anhidraz geni	Karbondioksit fiksasyonu
AGi002	UTR	DS	<i>Nicotiana tabacum</i>	L19255.1	3E ⁻¹²¹	Karbonik anhidraz geni	Karbondioksit fiksasyonu
AGi003	UTR	HK	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF031487.1	7E ⁻⁶⁸	Transkripsiyon faktörü	Transkripsiyon regülasyonu
AGi004	UTR	HK	HB				
AGi005	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK247833.1	9E ⁻⁸⁷		
AGi007	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK320496.1	7E ⁻¹¹³		
AGi008	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK224838.2	3E ⁻⁵²		
AGi009	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	EF091877.1	3E ⁻¹⁷⁶	ACRE 132	Genel savunma etkisi
AGi010	Kodlayan	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	AP010263.1	6E ⁻⁷⁹		
AGi012	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK322082.1	4E ⁻¹⁰⁰		
AGi013	UTR	DS	<i>Glycine max</i>	FJ014783.1	6E ⁻⁵⁹	Protein kinaz	Fosforilizasyon
AGi014	UTR	DS	HB				
AGi015	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	BT014573.1	3E ⁻¹⁷¹		
AGi016	UTR	DS	<i>Nicotiana tabacum</i>	U71108.1	4E ⁻⁴⁰	Sterol-C-metiltransferaz	Hücre zarı yapısı
AGi019	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AC238511.1	2E ⁻⁹⁷	Nop56	Nüklear protein
AGi020	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK325467.1	3E ⁻¹³¹		
AGi021	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK328023.1	2E ⁻¹⁴³		
AGi023	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415727.1	0	Mikrosatellit sekansı	
AGi026	Kodlayan	DS	<i>Eschscholzia californica</i>	EU200154.1	2E ⁻²⁸	Çinko parmak-anadomain protein 1	Transkripsiyon regülasyonu
AGi027	UTR	HK	HB				
AGi028	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	Z11679.1	2E ⁻¹²⁷	Stolon ucu proteini	Yumru oluşumu
AGi029	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK321986.1	2E ⁻¹⁴²		

HB: Homoloji bulunamamıştır. E: E değeri (Nükleotit dizileri arasında var olabilecek benzerlik değerleri dikkate alınarak homoloji testlerinde kullanılan beklenen değer olup E⁻²⁰ değeri standart istatistik analizlerinde P=0.01 değerine eşdeğer olup E değeri 0'a yaklaştıkça benzerlik güvenilirliği artmaktadır)

Çizelge 4.58. Devamı

Lokus	Bölge	Tip	Tür Adı	GenBank	E	Homoloji	Bitkilerde Fonksiyonları
AGi030	Kodlayan	DS	HB				
AGi031	UTR	HK	<i>Capsicum annuum</i>	DQ247968.1	0	Etilene hassas element bağlanma proteini	
AGi032	UTR	HK	<i>Capsicum chinense</i>	AM040278.1	0	Oksin teşvikleyici protein	Hücre genişlemesi ve bölünmesi
AGi033	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK323435.1	2E ⁻¹¹¹		
AGi038	UTR	HK	HB				
AGi039	UTR	DS	HB				
AGi040	UTR	HK	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Y18350.1	2E ⁻⁵³	U2 snRNP yardımcı faktör	Transkripsiyon regülasyonu
AGi041	UTR	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK224819.2	2E ⁻⁷⁸		
AGi042	Kodlayan	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415751.1	0	siklaz/dehidraz ailesi	Dehidraz ve yağ taşıması
AGi043	UTR	HK	HB				
AGi044	UTR	HK	HB				
AGi045	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415749.1	4E ⁻¹⁴⁹	Mikrosatellit sekansı	
AGi046	UTR	DS	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415746.1	3E ⁻¹²⁶	Mikrosatellit sekansı	
AGi047	UTR	DS	HB				
AGi048	Kodlayan	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415744.1	8E ⁻¹⁶⁵	tRNA sentetaz	tRNA sentezi
AGi049	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK320854.1	2E ⁻¹⁴²		
AGi051	UTR	HK	HB				
AGi052	UTR	HK	<i>Capsicum annuum</i>	DQ247968.1	2E ⁻⁹⁷	DNA bağlanma proteini	DNA bağlanma
AGi053	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK323015.1	2E ⁻⁵²		
AGi054	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415741.1	0	Mikrosatellit sekansı	
AGi055	UTR	HK	HB				

HB: Homoloji bulunamamıştır. E: E değeri (Nükleotit dizileri arasında var olabilecek benzerlik değerleri dikkate alınarak homoloji testlerinde kullanılan beklenen değer olup E⁻²⁰ değeri standart istatistik analizlerinde P=0.01 değerine eşdeğer olup E değeri 0'a yaklaştıkça benzerlik güvenilirliği artmaktadır)

Çizelge 4.58. Devamı

Lokus	Bölge	Tip	Tür Adı	GenBank	E	Homoloji	Bitkilerde Fonksiyonları
AGi056	Kodlayan	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415739.1	9E ⁻⁹⁶	Mikrosatellit sekansı	
AGi057	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	GQ415735.1	6E ⁻⁵³		
AGi060	Kodlayan	HK	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_129751.1	1E ⁻²⁰	Remorin ailesi proteini	DNA bağlanma
AGi062	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK327180.1	2E ⁻¹⁰⁷		
AGi064	Kodlayan	DS	<i>Capsicum annuum</i>	AF009734.1	0	Cu/Zn superoksit dismutaz	Abiotic and biotic stresses
AGi065	UTR	DS	<i>Capsicum annuum</i>	EU196733.1	0	Yeşil kalış süresi ile ilgili protein (SGR)	Chl a and b'nin indirgenmesi
AGi068	UTR	HK	HB				
AGi070	UTR	DS	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	AY325501.1	9E ⁻¹³¹	Fruktokinaz 2 (Frk2)	Fosforilizasyon
AGi071	UTR	HK	<i>Nicotiana tabacum</i>	L13440.1	7E ⁻⁹³	Sisteince zengin uzama protein 2	Hücre duvarı protein
AGi078	Kodlayan	DS	HB				
AGi080	UTR	HK	HB				
AGi083	UTR	HK	<i>Capsicum annuum</i>	AY496092.1	5E ⁻¹⁰⁶	ADP-ribosilasyon faktörü	Hücrelerarası protein alış verişi
AGi086	UTR	HK	HB				
AGi088	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AC215374.1	3E ⁻¹¹		
AGi090	Kodlayan	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	AF354748.1	7E ⁻¹⁶⁶	Superoxide dismutase (SOD)	Antioksidant detoksifikasyon
AGi091	Kodlayan	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	M37150.1	1E ⁻¹⁶³	Superoxide dismutase (SOD)	Antioksidant detoksifikasyon
AGi092	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK324743.1	2E ⁻⁵²	TAF12	Transkripsiyon regülasyonu
AGi094	UTR	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	U62329.1	3E ⁻⁷⁴	Fructokinase (FK) mRNA	
AGi095	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK247194.1	7E ⁻¹²		
AGi096	UTR	HK	HB				
AGi098	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK324056.1	1E ⁻¹³⁶	Ribosomal protein	Ribozom yapısı

HB: Homoloji bulunamamıştır. E: E değeri (Nükleotit dizileri arasında var olabilecek benzerlik değerleri dikkate alınarak homoloji testlerinde kullanılan beklenen değer olup E⁻²⁰ değeri standart istatistik analizlerinde P=0.01 değerine eşdeğer olup E değeri 0'a yaklaştıkça benzerlik güvenilirliği artmaktadır)

Çizelge 4.58. Devamı

Lokus	Bölge	Tip	Tür Adı	GenBank	E	Homoloji	Bitkilerde Fonksiyonları
AGi100	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK319665.1	1E ⁻¹⁶⁴	Ribosomal protein	Ribozom yapısı
AGi101	UTR	DS	HB				
AGi102	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK329309.1	1E ⁻¹⁴⁹		
AGi103	UTR	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK329914.1	3E ⁻⁵⁶		
AGi104	UTR	HK	HB				
AGi105	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK224819.2	0		
AGi108	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY506544.1	2E ⁻¹⁰³	DNA-bağlanma proteini	DNA bağlanma
AGi110	UTR	HK	HB				
AGi111	UTR	HK	HB				
AGi112	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AC215447.2	6E ⁻⁸³		
AGi113	UTR	HK	HB				
AGi115	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK324634.1	5E ⁻¹³⁷	LPA1	Fotosentez
AGi117	UTR	DS	<i>Solanum lycopersicum</i>	BT013611.1	3E ⁻¹⁰		
AGi118	UTR	DS	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF454759.2	2E ⁻¹⁷⁶	Karbonik anhidraz geni	Karbondioksit fiksasyonu
AGi120	UTR	HK	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ207850.1	4E ⁻⁴⁸	Brittle 1 proteini (bt1)	Adenilat translokasyonu
AGi121	UTR	HK	HB				
AGi124	UTR	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK321442.1	1E ⁻⁷⁴		
AGi126	Kodlayan	HK	<i>Solanum lycopersicum</i>	AK326726.1	8E ⁻³⁶		
AGi127	UTR	HK	<i>Petunia x hybrida</i>	X87225.1	8E ⁻⁷⁶		

HB: Homoloji bulunamamıştır. E: E değeri (Nükleotit dizileri arasında var olabilecek benzerlik değerleri dikkate alınarak homoloji testlerinde kullanılan beklenen değer olup E⁻²⁰ değeri standart istatistik analizlerinde P=0.01 değerine eşdeğer olup E değeri 0'a yaklaştıkça benzerlik güvenilirliği artmaktadır)

5. SONUÇ

Bu tez kapsamında biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi basit genom yapısı ve ekonomik önemi nedeni ile model bitki olarak kullanılmış ve mikrosatellit içeren genlerin *in silico* ve *in vitro* analizleri gerçekleştirilmiştir. *In silico* çalışmalarda GenBank verileri kullanılırken *in vitro* çalışmalarda tez kapsamında oluşturulan cDNA kütüphanelerinden yararlanılmıştır. cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılan dokular biber bitkisinin önemli fizyolojik gelişme dönemlerine göre belirlenerek farklı dokulara özgü genlerin mikrosatellit içeriklerinin karşılaştırılması sağlanmıştır. Dokulara ait gelişme dönemlerinin belirlenmesinde ise özellikle tohum fizyolojik gelişmeleri dikkate alınmıştır.

In silico analizler için 7 farklı dokuya ait 20738 ifade edilen gen parçasığı (EST) sekansı içeren toplam 9.93 Mb nükleotit veri analiz edilerek Mini Veri Bankası (MVB) biyoinformatiksel analizler kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan MVB'ı düzenli ve değişken mikrosatellit dağılımları, frekansları ve mikrosatellit motif içeriklerine göre üç farklı analize (Analiz I, II ve III) tabi tutulmuştur.

MVB düzenli ve değişken mikrosatellit frekansları ve motifleri yönünden karşılaştırıldığında analizler arasında (Analiz I, II ve III) istatistiksel düzeyde farklılıklar belirlenmiştir. Bu durum biber bitkisinin transkripsiyona alınan mikrosatellit içeren genlerinde düzenli ve değişken mikrosatellit frekanslarının ve motiflerinin farklı olduğunu göstermiştir. Bu sonuç mikrosatellit frekansları incelenirken düzenli ve değişken mikrosatellitler şeklinde ayrılarak analiz edilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Analizler kendi aralarında karşılaştırıldığında Analiz I bir dokuya ait transkriptler (kalemler) ile yine aynı dokuda bulunan ancak diğer dokularda da ifade edilmiş olan transkriptler arasında mikrosatellit içeren gen frekanslarını karşılaştırarak aynı dokuda ifade edilen bazı genlerin diğer dokularda da ifade etmesinin mikrosatellit etkisinden kaynaklanabileceğini göstermiştir. Çalışmada anter, tomurcuk ve plasenta dokularında bulunan mikrosatellit içeren genlerin gen regülasyonuna katılarak dokular arası farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Analiz I'in kütüphaneler arasında mikrosatellit motif frekansları veya dağılımlarının karşılaştırılması ile düzenli mononükleotit motif frekanslarının anter ve tomurcuk dokularında önemlilik gösterirken bu motifin değişken mikrosatellitlerden anter, genç meyve ve plasenta dokularında önemli olduğu görülmüştür. Bu durum mononükleotit motif içeriği [A/T] mikrosatellitlerin poli adenilasyon kapsayan genlerin gen regülasyonuna katılma oranının diğer motif tiplerine oranla daha yüksek olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Diğer mikrosatellit motiflerden dinükleotit motifin genç kök dokusunda ifade edilen transkriptlerin frekansı düzenli ve değişken mikrosatellitlerde önemli bulunması dinükleotit mikrosatellitlerin mononükleotit motiflerden sonra gen regülasyonuna etki eden diğer bir mikrosatellit motifi olduğu belirlenmiştir. Dinükleotit mikrosatellitler transkriptlerin özellikle UTR bölgelerinde bulunma sıklıklarının fazla oluşu bu mikrosatellit tipinin gen regülasyonunda etkin olduğunu desteklemektedir. Trinükleotit mikrosatellitlerin dokular arasındaki frekans farklılıklarının yüksek çıkmaması bu tip mikrosatellitlerin housekeeping genlerde daha yaygın olarak bulunmaları ile de desteklenmiştir. Analiz I'de hekzanükleotitlerden düzenli tekrarlı olanların tomurcuk ve yaprakta frekanslarının önemli bulunmaları bu tip mikrosatellitlerin de gen regülasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ancak hekzanükleotitlerin bu aktivitelerinin ileriki çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Analiz II'de bir dokuda bulunan dokuya özgü transkriptler ve bu dokuda bulunan ancak diğer dokulardaki transkriptlere homoloji gösteren transkriptler birleştirilmiş ve başka bir dokuda o dokuya özgü transkriptler ile yine o dokuda bulunan ve diğer dokulardaki transkriptlere homoloji gösteren genler karşılaştırılmıştır. Düzenli ve değişken mikrosatellit frekansları arasında benzer sonuçlar elde edilmiş, genç meyve ve yaprak dışındaki kütüphanelerde bulunan genlerin mikrosatellit frekanslarının farklı olduğu belirlenmiştir. Bu durum mikrosatellitlerin dokular arasında transkript farklılığı oluşumuna katkısını ve önemli olduğunu göstermiştir. Mikrosatellit motiflerden dinükleotitlerin gen ekspresyonuna katkılarının önemli olduğu bu analiz ile de desteklenmiştir.

Analiz III’de Analiz I ve II’den farklı olarak her bir dokuya özgü transkriptler birebir karşılaştırılmıştır. Anter dokusunda bulunan ve salt anterde ifade edilen transkriptlerdeki mikrosatellit frekansı diğer bütün dokulardan istatistiksel olarak az bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer dokuların mikrosatellit frekansları karşılaştırıldığında plasenta ile genç kök, tomurcuk, genç meyve, kılcal kök ve yaprak, genç kök ile genç meyve dokularında farklı olduğu görülmüştür.

Mikrosatellit motifleri Analiz III ile karşılaştırıldığında mononükleotitlerin belirgin olarak çoğu doku arasında farklılık gösterdiği ve dinükleotitlerin ise tomurcuk dokusu ile genç meyve, kılcal kök, plasenta ve yaprak arasında önemli frekanslar gösterdiği tespit edilmiştir.

Düzenli ve değişken mikrosatellit frekansları Analiz III ile karşılaştırıldığında genç kök ile diğer dokuların karşılaştırması dışındaki bütün analizlerde benzer sonuçlar alınmıştır. Düzenli ve değişken motif frekansları karşılaştırmasında kılcal kök ve diğer dokuların karşılaştırması dışındaki bütün analizlerde farklılıklar tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında *in silico* yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa;

- i) Farklı dokulardaki transkriptlerin mikrosatellit bulundurma sıklığı önemli düzeyde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir,
- ii) Dokuların bulundurduğu mikrosatellit motifleri arasında ve motif frekansları arasında önemli farklılıklar bulunduğu ve özellikle mononükleotit ve dinükleotit mikrosatellitlerin frekanslarının belirgin olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir,
- iii) Dokularda bulunan düzenli ve değişken mikrosatellit ve mikrosatellit motifleri arasında farklılıklar bulunmuştur,
- iv) Değişik amaçlar için kullanılabilecek bir Mini Veri Bankası oluşturulmuştur.

In silico analizlerden elde edilen veriler ışığında mikrosatellit içeren DNA’ların organ, doku ve gelişme dönemlerine göre farklılık içermesi mikrosatellitlerin işe

yaramayan kalıntı DNA olmadığı fonksiyonel olduğu ve bu fonksiyonelliğin DNA markırlar dışında da kullanılabileceği öngörülmüştür.

Ardışık tekrarlı DNA'ların özellikle mikrosatellit varlıklarının ve dağılımlarının organ, doku ve gelişme dönemlerinde farklılıklar gösterdiği, bu özel DNA dizilerinin fonksiyonları ve kullanım alanlarının belirlenmesinde genetik haritalamalarda, markır yardımıyla seleksiyonda herhangi bir DNA parçacığının varlığı ya da yokluğu yerine geni doğrudan göstereceğinden, geleneksel markır sistemlerinden daha etkin bir şekilde kullanım olanağı sağlanabileceği için elde edilen 83 adet mikrosatellit lokusuna ait primer çiftlerinin *Solanaceae* familyasında taranarak markır yardımıyla seleksiyon çalışmalarında etkin şekilde kullanılabilecekleri kanıtlanmıştır. Biberde geliştirilmiş DNA markır sayısı diğer kültür bitkilerine oranla daha az düzeyde ve çoğunlukla fonksiyonları belirlenmemiş olan markırlardır. Bu nedenle bu tezde belirlenmiş olan DNA markırları biberde ıslah çalışmalarına katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışmada biber bitkisinin genetik çalışmalarında kullanılabilecek toplam 83 adet AGi mikrosatellit primer seti geliştirilmiştir. Bu primer setlerinin bazı özellikleri aşağıda özetlenmiştir;

- i) Biber bitkisinde intragenik ve intergenik amplifikasyon özellikleri nedeni ile biberde türler arası (interspesifik) ve türler içi (intraspesifik) haritalama çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir,
- ii) Transkripsiyona dahil edilen genik bölgelerde bulunmalarına rağmen yüksek düzeyde polimorfizm bilgi içeriğine sahiptirler,
- iii) Farklı PZR ürünlerinin karıştırılarak analizine (Multimix) ve aynı PZR'da birden fazla markırın amplifikasyonuna (multipleks) uygunluğu özellikleri nedeni ile markır maliyetleri düşük primer setleri geliştirilmiştir,
- iv) EST tabanlı olmaları nedeni ile genik bölgelerde bulunmaları ile biber ıslahına fonksiyonel markırlar olarak katkılar sağlayabilecek niteliktedir,
- v) AGi primer setlerinin ülkemiz için önemli bir çeşit olan Demre Sivrisi biber çeşidinden geliştirilmiş olması nedeni ile özgündürler,

- vi) Bu primer setleri kullanılarak primer çiftlerinin bağlandığı genomik DNA bölgelerinin intron yada ekson genom bölgelerinin tespitinde kullanılabilecek niteliktedir.

Günümüze değin tekrar içeriklerine veya düzenli yada değişken tekrar sayısına sahip olmaları gibi özelliklerine göre sınıflandırılmış olan mikrosatellitler ilk kez bu tez kapsamında oluşturdukları ekspresyon profillerine göre sınıflandırılmış ve 5 mikrosatellit ekspresyon profili TiP I, II, III, IV ve V olarak ayrılmıştır.

Bu tez çalışmasının önemli hedeflerinden bir olan mikrosatellitlerin genomdaki rolü ve önemlerine ilişkin aşağıda elde edilen sonuçlar özetlenmiştir;

- i) Yakın bir geçmişte öngörülenin tersine mikrosatellitler genomda rastlantısal dağılmış durumda değildir,
- ii) Mikrosatellitlerin polimorfizm içerikleri motif boyu ve içeriğine göre değişebilmektedir,
- iii) Mikrosatellitler genlerin UTR bölgelerinde protein kodlayan bölgelere oranla daha fazla sıklıkta bulunmaktadır,
- iv) Mikrosatellitler üzerlerinde bulunduğu genlerin ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak değişik mekanizmalarla etkileyebilmektedir,
- v) Housekeeping fonksiyonlarına sahip genlerde genellikle trinükleotit mikrosatellitlerin yaygın olduğu tespit edilmiştir,
- vi) Organ, doku ve gelişme dönemlerine özgü genlerde genellikle dinükleotit motiflerin yaygın olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında her ne kadar mikrosatellitlerin polimorfizm, sekans ve ekspresyon profillerine göre ayrıntılı olarak incelenmiş olmasına karşın ileri düzeyde yeni çalışmaların yapılarak mikrosatellit DNA'nın fizyolojik, fenotipik ve evrimsel etkilerin belirlenmesinde yararlar vardır. Bu çalışmalarda değişik tekrar içeren allellerin kontrollü bir ortamda oluşturdukları fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal olayların karşılaştırılması ve son olarakta bu allellerin gen knock-in ve gen knock-out yöntemleriyle etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ADETULA, O. A. 2006. Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. *African Journal of Biotechnology*, 5: 120-122.
- AKAI, J., KIMURA, A. and HATA, R. I. 1999. Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (*COL1A2*) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene*, 18: 65-73.
- ALMARZA, J., MORALES, S., RINCON, L. and BRITO, F. 2006. Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. *Analytical Biochemistry*, 358: 143-145.
- ANDERSEN, J. R. and LUBBERSTEDT, T. 2003. Functional markers in plants. *TRENDS in Plant Science*, 8: 11.
- ANONYMOUS. 2006. Consensus Document on the Biology on Biology of the *Capsicum annuum* complex (Chili peppers, hot Peppers and sweet peppers). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). <http://www.oecd.org>.
- ANONYMOUS. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. faostat@fao.org.
- ANONYMOUS. 2010. National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- ARUMUGANATHAN, K. and EARLE, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218.
- AYERS, N. M., MCCLUNG, A. M., LARKIN, P. D., BLIGH, H. F. J., JONES, C. A. and PARK, W. D. 1997. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 773-781.
- BAGGE, M. and LUBBERSTEDT, T. 2008. Functional markers in wheat: technical and economic aspects. *Molecular Breeding*, 22: 319-328.

- BAO, S., CORKE, H. and SUN, M. 2002. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 898-905.
- BARAL, J. B. and BOSLAND, P. W. 2004. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): A multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129: 826-832.
- BARCHI, L., BONNET, J., BOUDET, C., SIGNORET, P., NAGY, I., LANTERI, S., PALLOIX, A. and LEFEBVRE, V. 2007. A high-resolution intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced RIL subsets for fast mapping. *Genome*, 50: 51-60.
- BASU, K. S. and KRISHNA, D. A. 2003. *Capsicum*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles. London: Taylor & Francis.
- BEN-CHAIM, A., BOROVSKY, Y., RAO, G. U., TANYOLAC, B. and PARAN, I. 2003. A major fruit shape QTL conserved in *Capsicum*. *Genome*, 46: 1-9.
- BEN-CHAIM, A., BOROVSKY, Y., FALISE, M., MAZOUREK, M., KANG, B., PARAN, I. and JAHN, M. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 1481-1490.
- BENSON, G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27: 573-580.
- BILGEN, M., KARACA, M., ONUS, A. N. and INCE, A. G. 2004. A software program combining sequence motif searches with keywords for finding repeats containing DNA sequences. *Bioinformatics*, 20: 3379-3386.
- BLUM, E., MAZOUREK, M., OCONNELL, M., CURRY, J., THORUP, T., LIU, K., JAHN, M. and PARAN, I. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 79-86.
- BRENNICKE, A., MARCHFELDER, A. and BINDER, S. 1999. RNA editing. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 297-316.

- BRETT, D., POSPISIL, H., VALCARCEL, J., REICH, J. and BORK, P. 2002. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics*, 30: 29-30.
- BROHEDE, J., PRIMMER, C. R., MOLLER, A. and ELLEGREN, H. 2002. Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Research*, 30: 1997-2003.
- BUDAK, H., SHEARMAN, R. C., PARMAKSIZ, I., GAUSSOIN, R. E., RIORDAN, T. P. and DWEIKAT, I. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 328-334.
- CAMACHO-VILLASANA, Y. M., OCHOA-ALEJO, N., WALLING, L. and BRAY, E. A. 2002. An improved method for isolating RNA from dehydrated and nondehydrated chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 407-414.
- CARANTA, C., PFLIEGER, S., LEFEBVRE, V., DAUBEZE, A. M., THABUIS, A. and PALLOIX, A. 2002. QTLs involved in the restriction of cucumber mosaic virus (CMV) longdistance movement in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 586-591.
- CARDLE, L., RAMSAY, L. and MILBOURNE, D. 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847-854.
- CARRA, A., GAMBINO, G. and SCHUBERT, A. 2007. A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 360: 318-320.
- CASACUBERTA, E., PUIGDOMENECH, P. and MONFORT, A. 2000. Distribution of microsatellites in relation to coding sequences within the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Science*, 157: 97-104.
- CHEN, Y., WEINING, S. and DAGGARD, G. 2003. Preparation of total RNA from a very small wheat embryo suitable for differential display. *Annals of Applied Biology*, 143: 261-264.

- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1: 581-585.
- CLOSE, T. J., WANAMAKER, S. I., CALDO, R. A., TURNER, S. M., ASHLOCK, D. A., DICKERSON, J. A., WING, R. A., MUEHLBAUER, G. J., KLEINHOF, A. and WISE, R. P. 2004. A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiology*, 134: 960-968.
- COHEN, H., DANIN-POLEG, Y., COHEN, C. J., SPRECHER, E., DARVASI, A. and KASHI, Y. 2004. Mono-nucleotide repeats (MNRs): a neglected polymorphism for generating high density genetic maps *in silico*. *Human Genetics*, 115: 213-220.
- CRANE, C. F. 2007. Patterned sequence in the transcriptome of vascular plants. *BMC Genomics*, 8: 173.
- CRISTANCHO, M. and ESCOBAR, C. 2008. Transferability of SSR markers from related *Uredinales* species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. *Genetics and Molecular Research*, 7: 1186-1192.
- DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- DRESSELHAUS, T., CORDTS, S., HEUER, S., SAUTER, M., LORZ, H. and KRANZ, E. 1999. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Molecular and General Genetics*, 261: 416-427.
- DUVAL, A., ROLLAND, S., TUBACHER, E., BUI, H., THOMAS, G. and HAMELIN, R. 2000. The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Research*, 60: 3872-3879.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.

- ELLER, C. D., REGELSON, M., MERRIMAN, B., NELSON, S., HORVATH, S. and MARAHRENS, Y. 2007. Repetitive sequence environment distinguishes housekeeping genes. *Gene*, 390: 153-165.
- EPPLEN, J. T., KYAS, A. and MAUELER, W. 1996. Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Letters*, 389: 92-95.
- ESTRADA, B., BERNAL, M. A., DIIAZ, J., POMAR, F. and MERINO, F. 2000. Fruit Development in *Capsicum annuum*: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6234-6239.
- ESTANY, J., TOR, M., VILLALBA, D., BOSCH, L., GALLARDO, D., JIMENEZ, N., ALTET, L., NOGUERA, J. L., REIXACH, J., AMILLS, M. and SANCHEZ, A. 2007. Association of CA repeat polymorphism at intron 1 of insulin-like growth factor (IGF-I) gene with circulating IGF-I concentration, growth, and fatness in swine. *Physiological Genomics*, 31: 236-243.
- EWING, R. M., KAHLA, A. B., POIROT, O., LOPEZ, F., AUDIC, S. and CLAVERIE, J. M. 1999. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Research*, 9: 950-959.
- FABRE, E., DUJON, B. and RICHARD, G. F. 2002. Transcription and nuclear transport of [CAG/CTG] trinucleotide repeats in yeast. *Nucleic Acids Research*, 30: 3540-3547.
- FABRE, N., REITER, I. M., BECUWE-LINKA, N., GENTY, B. and RUMEAU, D. 2007. Characterization and expression analysis of genes encoding a and b carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 30: 617-629.
- FABRE, N., GENTY, B., RUMEAU, D. and REITER, I. 2008. Functional characterization of AtbCA5, a new chloroplastic carbonic anhydrase isoform in *Arabidopsis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150: 186-198.
- FAHIMA, T., RODER, M. S., WENDEHAKE, K. and KIRZHNER, N. E. 2002. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 17-29.

- FONDON, J. W. and GARNER, H. R. 2004. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 18058-18063.
- FONDON, J. W., HAMMOCK, E. A., HANNAN, A. J. and KING, D. G. 2008. Simple sequence repeats: genetic modulators of brain function and behavior. *TRENDS in Neurosciences*, 7: 328-334.
- FULTON, T. M., VAN DER HOEVEN, R, EANNETTA, N. T. and TANKSLEY, S. D. 2002. Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell*, 14: 1457-1467.
- GACY, A. M., GOELLNER, G., JURANIC, N., MACURA, S. and MCMURRAY, C. T. 1995. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures *in vitro*. *Cell*, 81: 533-540.
- GANAPATHI, M., SRIVASTAVA, P., DAS SUTAR, S. K., KUMAR, K., DASGUPTA, D., PAL, SINGH, G., BRAHMACHARI, V. and BRAHMACHARI, S. K. 2005. Comparative analysis of chromatin landscape in regulatory regions of human housekeeping and tissue specific genes. *BMC Bioinformatics*, 6: 126.
- GAO, P. S., HELLER, N. M., WALKER, W., CHEN, C. H., MOLLER, M., PLUNKETT, B., ROBERTS, M. H., SCHLEIMER, R. P., HOPKIN, J. M. and HUANG, S. K. 2004. Variation in dinucleotide [GT] repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity *in vitro*. *Journal of Medical Genetics*, 41: 535-539.
- GEBHARDT, F., ZANKER, K. S. and BRANDT, B. 1999. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 13176-13180.

- GALVAO, R., MENDES-SOARES, L., CAMARAA, J., JACOA, I. and CARMO-FONSECA, M. 2001. Triplet repeats, RNA secondary structure and toxic gain-of-function models for pathogenesis. *Brain Research Bulletin*, 56: 191-201.
- GUZMAN, F. A., AYALA, H., AZURDIA, C., DUQUE, M. C. and DE VICEN, M. C. 2005. AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala: Home gardens as an option for conservation. *Crop Science*, 45: 363-370.
- HAMADA, H., PETRINO, M. G. and KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 6465–6469.
- HAMMOCK, E. A. D. and YOUNG, L. J. 2005. Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science*, 308: 1630-1634.
- HEFFERON, T. W. 2004. A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 3504-3509.
- HILE, S. E., YAN, G. and ECKERT, K. A. 2000. Somatic mutation rates and specificities at [TC/AG] and [GT/CA] microsatellite sequences in nontumorigenic human lymphoblastoid cells. *Cancer Research*, 60: 1698-1703.
- HUH, J. H., KANG, B. C., NAHM, S. H., KIM, S., HA, K. S., LEE, M. H. and KIM, B. D. 2001. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 524-530.

- HULZINK, R. J., DE GROOT, P. F., CROES, A. F., QUAEDVLIEG, W., TWELL, D., WULLEMS, G. J. and VAN HERPEN, M. M. 2002. The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiology*, 129: 342-353.
- HUNZIKER, A. T. 2001. *Genera Solanacearum: The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System*. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, 516 pp.
- IGLESIASA, A. R., KINDLUNDB, E., TAMMIB, M. and WADELIUSA, C. 2004. Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding B. *Gene*, 341: 149-165.
- INCE, A. G., ONUS, A. N., ELMASULU, S. Y., BILGEN, M. and KARACA, M. 2007. *In silico* data mining for development of *Capsicum* microsatellites. *ACTA Horticulturae*, 729:123-127.
- INCE, A. G., KARACA, M., BILGEN, M. and ONUS, A. N. 2008. Digital differential display tools for mining microsatellite containing organism, organ and tissue. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94: 281-290.
- INCE, A. G. and KARACA, M. 2009. The MAGi RNA extraction method: highly efficient and simple procedure for fresh and dry plant tissues. *Journal of Science Food and Agriculture*, 89: 168-176.
- INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2009. Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 211-221.
- INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2010a. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. *Biochemical Genetics*, 48: 83-95. doi: 10.1007/s10528-009-9297-4.

- INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2010b. CAPS-microsatellites: use of CAPS method to convert non-polymorphic microsatellites into useful markers. *Molecular Breeding*, 25: 491-499. doi:10.1007/s11032-009-9347-y.
- INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2010c. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28: 285-291. doi: 10.1007/s11105-009-0151-y.
- INCE, A.G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2010d. Differential expression patterns of genes containing microsatellites in *Capsicum annuum* L. *Molecular Breeding*, 25: 645-658. doi: 10.1007/s11032-009-9362-z.
- JEFFREYS, A. J., WILSON, V. and THEIN, S. L. 1985. Individual specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 332: 278-281.
- JOBES, D. V., HURLEY, D. L. and THIEN, L. B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*, 44: 379-386.
- JONES, N., OUGHAM, H. H., THOMAS, H. and PASAKINSKIENE, I. 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02933.x.
- KANG, B. C., NAHM, S. H., HUH, J. H., YOO, H. S., YU, J. W., LEE, M. H. and KIM, B. D. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 531-539.
- KANTETY, R. V., ROTA, M. L., MATTHEWS, D. E. and SORRELLS, M. E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48: 501-510.

- KARACA, M., SAHA, S., JENKINS, J. N., ZIPF, A., KOHEL, R. and STELLY, D. M. 2002. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to the Ligon Lintless (Li1) mutant in cotton. *Journal of Heredity*, 93: 221-224.
- KARACA, M., SAHA, S., CALLAHAN, F. E., JENKINS, J. N., READ, J. J. and PERCY, R. G. 2004. Molecular and cytological characterization of a cytoplasmic-specific mutant in pima cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Euphytica*, 139: 187-197.
- KARACA, M., BILGEN, M., ONUS, A. N., INCE, A. G. and ELMASULU, S. Y. 2005a. Exact tandem repeats analyzer (E-TRA) for DNA sequence mining. *Journal of Genetics*, 84: 49-54.
- KARACA, M., INCE, A. G., ELMASULU, S. Y., ONUS, A. N. and TURGUT, K. 2005b. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 343: 353-355.
- KARACA, M. and INCE, A. G. 2008. Minisatellites as DNA markers to classify bermudagrasses (*Cynodon* spp.): confirmation of minisatellite in amplified products. *Journal of Genetics*, 87: 83-86.
- KARACA, M., INCE, A. G., TUGRUL, S., TURGUT, K. and ONUS, A. N. 2008. PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species. *Journal of Science Food and Agriculture*, 88: 2508-2516.
- KARLIN, S. and BURGE, C. 1996. Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 1560-1565.
- KASHI, Y., KING, D.G. 2006. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genetics*, 22: 253-259.

- KENNESON, A., ZHANG, F. P., HAGEDORN, C. H. and WARREN, S. T. 2001. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Human Molecular Genetics*, 10: 1449-1454.
- KLINTSCHAR, M. and WIEGAND, P. 2003 Polymerase slippage in relation to the uniformity of tetrameric repeat stretches. *Forensic Science International*, 135: 163-166.
- KNAPP, S. 2002. Tobacco to tomatoes: A phylogenetic perspective on fruit diversity in the *Solanaceae*. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2001-2022.
- KOOB, M. D., MOSELEY, M. L., SCHUT, L. J., BENZOW, K. A., BIRD, T. D., DAY, J. W. and RANUM, L. P. 1999. An untranslated [CTG] expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nature Genetics*, 21: 379-384.
- KROL, J., FISZER, A., MYKOWSKA, A., SOBCZAK, K., DE MEZER, M. and KRZYZOSIAK, W. J. 2007. Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Molecular Cell*, 25: 575-586.
- KURTZ, S., JOMUNA, V.C., OHLEBUSCH, E., SCHLEIERMACHER, C., STOYE, J. and GIEGERICH, R. 2001. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale. *Nucleic Acids Research*, 29: 4633-4642.
- LALIOTI, M. D., SCOTT, H. S., BURESI, C., BOTTANI, A., NORRIS, M. A., MALAFOSSE, A. and ANTONARAKIS, S. E. 1997. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature*, 386: 847-852.
- LANTERI, S. and PICKERSGILL, B. 1993. Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq. *Euphytica*, 67: 155-160.

- LAWSON, M. J. and ZHANG, L. 2006. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes. *Genome Biology*, 7: R14. doi:10.1186/gb-2006-7-2-r14.
- LAWSON, M. J. and ZHANG, L. 2008. Housekeeping and tissue-specific genes differ in simple sequence repeats in the 5'-UTR region. *Gene*, 407: 54-62.
- LEE, J. M., NAHM, S. H., KIM, Y. M. and KIM, B. D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 619-627.
- LEE, H. R., BAE, I. H., PARK, S. W., KIM, H. J., MIN, W. K., HAN, J. H., KIM, K. T. and KIM, B. D. 2009. Construction of an Integrated Pepper Map Using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC End Sequences. *Molecules and Cells*, 27: 21-37.
- LEFEBVRE, V., GOFFINET, B., CHAUVET, J. C., CAROMEL, B., SIGNORET, P., BRAND, R. and PALLOIX, A. 2001. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theoretical and Applied Genetics*, 102:741-750.
- LEFEBVRE, V., PFLIEGER, S., THABUIS, A., CARANTA, C., BLATTES, A., CHAUVET, J. C., DAUBEZE, A. M. and PALLOIX, A. 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome*, 45: 839-854.
- LEVANSKY, E., ROMANO, J., SHADKCHAN, Y., SHARON, H., VERSTREPEN, K. J., FINK, G. R. and OSHEROV, N. 2007. Coding Tandem Repeats Generate Diversity in *Aspergillus fumigatus* Genes. *Eukaryotic Cell*, 6: 1380-1391. doi:10.1128/EC.00229-06.

- LEVINSON, G. and GUTMAN, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203-221.
- LEWIN, B. 1994. Genes. V. Oxford University Press.
- LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A. and NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T. and NEVO, E. 2004. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991-1007.
- LIVINGSTONE, K. D., LACKNEY, V. K., BLAETH, J. R., WIJK, R. V. and JAHN, M. K. 1999. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics*, 152: 1183-1202.
- LUE, N. F., BUCHMAN, A. R. and KORNBERG, R. D. 1989. Activation of yeast RNA polymerase II transcription by a thymidine-rich upstream element *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 486-490.
- MANICKAVELU, K. K., MISHINA, K. and KOBAYASHI, T. 2007. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54: 254-258.
- MARTIENSSEN, R. A. and COLOT, V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 293: 1070-1074.

- MATSUURA, T., YAMAGATA, T., BURGESS, D. L., RASMUSSEN, A., GREWAL, R. P., WATASE, K., KHAJAVI, M., MCCALL, A. E., DAVIS, C. F., ZU, L., ACHARI, M., PULST, S. M., ALONSO, E., NOEBELS, J. L., NELSON, D. L., ZOGHBI, H. Y. and ASHIZAWA, T. 2000. Large expansion of the [ATTCT] pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature Genetics*, 26: 191-194.
- MCNEIL, J., SMITH, K. P., HALL, L. L. and LAWRENCE, J. B. 2008. Word frequency analysis reveals enrichment of dinucleotide repeats on the human X-chromosome and [GATA]_n in the X escape region. *Genome Research*, 16: 477-484.
- MELONI, R., ALBANESE, V., RAVASSARD, P., TREILHOU, F. and MALLET, J. 1998. A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element *in vitro*. *Human Molecular Genetics*, 7: 423-428.
- METZGAR, D., BYTOF, J. and WILLS, C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*, 10: 72-80.
- MICHALEK, W., WESCHKE, W., PLEISSNER, K. P. and GRANER, A. 2002. EST analysis in barley defines a unigene set comprising 4,000 genes. *Journal of Genetics*, 104: 97-103.
- MIN, W. K., HAN, J. H., KANG, W. H., LEE, H. R. and KIM, B. D. 2008. Reverse random amplified microsatellite polymorphism reveals enhanced polymorphisms in the 3' end of simple sequence repeats in the pepper genome. *Molecular Cells*, 26: 250-257.
- MINAMIYAMA, Y., TSURO, M. and HIRAI, M. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18:157-169

- MORGANTE, M., HANAFEY, M. and POWELL, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194-200.
- NAGY, I., SASVARI, S., STAGEL, A., ACS, S. and BARDOS, G. 2004. Occurrence and polymorphism of microsatellite repeats in the sequence databases in pepper. Proc. XIIth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, 17-19 May, Noordwijkerhout (The Netherland).
- NAVARRO, J. M., FLORES, P., GARRIDO, C. and MARTINEZ, V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96: 66-73.
- NAYLOR, L. H. and CLARK, E. M. 1990. d[TG]_n d[CA]_n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Research*, 18: 1595-1601.
- NICOLIS, E., PASETTO, M., CIGANA, C., PRADAL, U., ASSAEL, M. B. and MELOTTI, P. 2006. The [GCC] repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis. *BMC Medical Genetics*, 7: 7 doi:10.1186/1471-2350-7-7.
- NICOT, N., CHIQUET, V., GANDON, B., AMILHAT, L., LEGEAI, F., LEROY, P., BERNARD, M. and SOURDILLE, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Journal of Genetics*, 109: 800-805.
- ODANAKA, S., BENNETT, A. B. and KANAYAMA, Y. 2002. Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of *Frk1* and *Frk2* expression in tomato. *Plant Physiology*, 129: 1119-1126.

- OGISO, Y., HOSODA-YABE, R., KAWAMOTO, Y., KAWAMOTO, T., KATO, K. and YABE, T. 2008. An Antioxidant of Dried Chili Pepper Maintained Its Activity through Postharvest Ripening for 18 Months. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72: 3297-3300.
- OKLADNOVA, O., SYAGAILO, Y. V., TRANITZ, M., STOBBER, G., RIEDERER, P., MOSSNER, R. and LESCH, K. P. 1998 A promoter associated polymorphic repeat modulates PAX-6 expression in human brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248: 402-405.
- OLIVERO, M., RUGGIERO, T., COLTELLA, N., MAFFE, A., CALOGERO, R., MEDICO, E. and DI RENZO, M. F. 2003. Amplification of repeat-containing transcribed sequences (ARTS): a transcriptome fingerprinting strategy to detect functionally relevant microsatellite mutations in cancer. *Nucleic Acids Research*, 31:e33.
- ONUS, A. N. and PICKERSGILL, B. 2004. Unilateral incompatibility in Capsicum (Solanaceae): Occurrence and taxonomic distribution. *Annals of Botany*, 94: 289-295.
- PARAN, I., VAN DER VOORT, J.R., LEFEBVRE, V., JAHN, M., LANDRY, L., VAN SCHRIEK, M., TANYOLAC, B., CARANTA, C., CHAIM, A. B., LIVINGSTONE, K., PALLOIX, A. and PELEMAN, J. 2004. An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). *Molecular Breeding*, 13: 251-261.
- PARISI, V., FONZO, V. D. and ALUF-PENTINI, F. 2003. STRING: finding tandem repeats in DNA sequences. *Bioinformatics*, 19: 1733-1738.
- PARK, Y. H., ALABADY, M. S., ULLOA, M., SICKLER, B., WILKINS, T. A., YU, J., STELLY, D. M., KOHEL, R. J., EL-SHIHY, O. M. and CANTRELL, R. G. 2005. Genetic mapping of new cotton fiber loci using EST-derived microsatellites in an interspecific recombinant inbred line cotton population. *Molecular and General Genetics*, 274: 428-441.

- PICKERSGILL, B. 1969. The domestication of chilli pepper, In P. J. Ucko and G. W. Dimbleby (Eds.). The domestication and exploitation of plants and animals, Duckworth, London, 443 pages.
- PICKERSGILL, B., HEISER, C. B. and MCNEILL, J. 1979. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD, eds. The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Linnean Society Symposium 7. London: Academic Press, 678-700.
- PICKERSGILL, B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya T, Gupta PK, eds. Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B. Amsterdam: Elsevier, 139-160.
- PIZZI, C., DI MAIO, M., DANIELE, S., MASTRANZO, P., SPAGNOLETTI, I., LIMITE, G., PETTINATO, G., MONTICELLI, A., COCOZZA, S. and CONTEGIACOMO, A. 2007. Triplet repeat instability correlates with dinucleotide instability in primary breast cancer. *Oncology Reports*, 17: 193-199.
- POLAT, E., INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2009. Mining and utilization of mushroom ESTs for microsatellites. *Conservation Genetics*, 11: 1123-1126. doi:10.1007/s10592-009-9896-y.
- PORTILLO, M., FENOL, C. and ESCOBAR, C. 2006. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiologia Plantarum*, 128: 1-7.
- PORTIS, E., MARZACHI, C., QUAGLIOTTI, L. and LANTERI, S. 1999. Molecular and physiological markers during seed development of peppers (*Capsicum annuum* L.): DNA replication and b-tubulin synthesis. *Seed Science Research*, 9: 85-90.

- PORTIS, E., NAGY, I., SASVARI, Z., STAGEL, A. BARCHI, L. and LANTERI, S. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of *in silico* DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science*, 172: 640-648.
- PRINCE, J. P., LOAIZA-FIGUEROA, F. and TANKSLEY, S. D. 1992. Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. *Genome*, 35: 726-732.
- PRINCE, J. P., POCHARD, E. and TANKSLEY, S. D. 1993. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*, 36: 404-417.
- RAFFAELE, S., BAYER, E., LAFARGE, D., CLUZET, S., RETANA, S. G., BOUBEKEUR, T., LEBORGNE-CASTEL, N., CARDE, J. P. et. al. 2009. Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *Plant Cell*, 21: 1541-1555.
- RAMAN, H., RAMAN, R., WOOD, R. and MARTIN, P. 2006. Repetitive indel markers within the *ALMT1* gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 18: 171-183.
- RANUM, L. P. W. and DAY, J. W. 2002. Dominantly inherited, non-coding microsatellite expansion disorders. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12: 266-271.
- RAO, G. U., BEN CHAIM, A., BOROVSKY, E. and PARAN, I. 2003. Mapping of yield related QTLs in pepper in an inter-specific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1457-1466.
- RICH, A. 1993. DNA comes in many forms. *Gene*, 135: 99-109.

- RODRIGUEZ, J. M., BERKE, T., ENGLE, L. and NIENHUIS, J. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 147-156.
- RONNING, C. M., STEGALKINA, S. S., ASCENZI, R. A., BOUGRI, O., HART, A. L., UTTERBACH, T. R., VANAKEN, S. E., RIEDMULLER, S. B., WHITE, J. A., CHO, J. et al. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiology*, 131: 419-429.
- ROTHENBURG, S., KOCH-NOLTE, F. and HAAG, F. 2001. DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunological Reviews*, 184: 286-298.
- ROZEN, S., and SKALETISKY, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- SAHA, S., KARACA, M., JENKINS, J. N., ZIPF, A. E., REDDY, O. U. K. and KANTETY, R.V. 2003. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica*, 130: 355-364.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANGWAN, I. and O'BRIAN, M. R. 2002. Identification of a soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA. *Plant Physiology*, 129: 1788-1794.
- SANTIAGO-VAZQUEZ, L. Z., RANZER, L. K. and KERR, R. G. 2006. Comparison of two total RNA extraction protocols using the marine gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* and its symbiont *Symbiodinium* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 598-603.

- SCHLOTTERER, C. and WIEHE, T. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: Goldstein DB, Schlötterer C (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, pp 238–247.
- SCHLUETER, J. A., DIXON, P., GRANGER, C., GRANT, D., CLARK, L., DOYLE, J. and SHOEMAKER, R. 2004. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome*, 47: 868-876.
- SCHMID, K. J., SORENSEN, T. R., STRACKE, R., TORJEK, O., ALTMANN, T., MITCHELL-OLDS, T. and WEISSHAAR, B. 2003. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 13: 1250-1257.
- SCHREIBER, M. E. 2004. Cloning and Characterization of Repetitive DNA in Pepper (*Capsicum annuum*). M.S. Thesis, California State University, Fresno. 49 pp.
- SEARLE, S. and BLACKWELL, J. M. 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *Journal of Medical Genetics*, 36: 295-299.
- SHARMA, V. K., RAO, C. B., SHARMA, A., BRAHMACHARI, S. K. and RAMACHANDRAN, S. 2003. [TG/CA]_n repeats in human housekeeping genes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 21: 303-310.
- SHARMA, V. K., BRAHMACHARI, S. K. and RAMACHANDRAN, S. 2005. [TG/CA]_n repeats in human gene families: abundance and selective patterns of distribution according to function and gene length. *BMC Genomics*, 6: 83.
- SHARMA, V. K., KUMAR, N., BRAHMACHARI, S. K. and RAMACHANDRAN, S. 2007. Abundance of dinucleotide repeats and gene expression are inversely correlated: a role for gene function in addition to intron length. *Physiological Genomics*, 31: 96-103.
- SORRELLS, M. E. and WILSON, W. A. 1997. Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. *Crop Science*, 37: 691–697.

- SREENU, V. B., VISHWANATH, A., NAGARAJU, J. and NAGARAJARAM, H. A. 2003. MICdb: database of prokaryotic microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31: 106-108.
- SUMAN, P. S. K., AJIT, K. S., DAROKAR, M. P. and KUMAR, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 1-7.
- TANKSLEY, S. D. 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma*, 89: 352-360.
- TANKSLEY, S. D., BERNATZKY, R., LAPITAN, N. L. and PRINCE, J. P. 1988. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 6419-6423.
- TAUTZ, D. and RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12: 4127-4138.
- TEMNYKH, S., PARK, W. D., AYRES, N., CARTINHO, S., HAUCK, N., LIPOVICH, L., CHO, Y. G., ISHII, T. and MCCOUCH, S. R. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics*, 100: 697-712.
- THIEL, T., MICHALEK, W., VARSHNEY, R. K. and GRANER, A. 2003. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Genetics*, 106: 411-422.
- TIAN, B. R., WHITE, J., XIA, T., WELLE, S., TURNER, D. H., MATHEWS, M. B. and THORNTON, C. A. 2000. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *PKR RNA*, 6: 79-87.
- TIMCHENKO, L. T. and CASKEY, C. T. 1999. Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 1432-1447.

- TONG, N. and BOSLAND, P. W. 2003. Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 193-199.
- TOTH, G., GASPARI, Z. and JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- TOUTENHOOFD, S. L., GARCIA, F., ZACHARIAS, D. A., WILSON, R. A. and STREHLER, E. E. 1998. Minimum CAG repeat in the human calmodulin-1 gene 5'-untranslated region is required for full expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1398: 315-320.
- VARSHNEY, R. K., GRANER, A. and SORRELLS, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23: 1. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005.
- VARSHNEY, R. K., THIEL, T., STEIN, N., LANGRIDGE, P. and GRANER, A. 2002. *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 537-546.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., PELEMAN, P., KUIPER, M. and ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- WANG, X., TIAN, W. and LI, Y. 2008. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnology*, 38: 57-64.
- WEISHING, K., NYBOM, H., WOLFF, K. and MEYER, W. 1995. DNA isolation and purification In: DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 44-59.
- WILLS, N. M. and ATKINS, J. F. 2006. The potential role of ribosomal frameshifting in generating aberrant proteins implicated in neurodegenerative diseases. *RNA*, 12: 1149-1153.

- WILLIAMS, C. E. and CLAIR DA, S. T. 1993. Phylogenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36: 619-630.
- WISMAN, E. and OHLROGGE, J. 2000. Arabidopsis microarray service facilities. *Plant Physiology*, 124: 1468–1471.
- WREN, J. D., FORGACS, E., FONDON, J. W., PERTSEMLIDIS, A., CHENG, S. Y., GALLARDO, T., WILLIAMS, R. S., SHOHET, V. R., MINNA, D. J. and GARNER, H. R. 2000. Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. *The American Journal of Human Genetics*, 67: 345–356.
- WRIGHT, J. M. 1994. Mutation at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome*, 37: 345-347.
- WU, F., MUELLER, L. A., CROUZILLAT, D., PETIARD, V. and TANKSLEY, S. D. 2006. Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the Euasterid plant clade. *Genetics*, 174: 1407-1420.
- YAMADA, T., KOYAMA, T., OHWADA, S., TAGO, K., SAKAMOTO, I., YOSHIMURA, S., HAMADA, K., TAKEYOSHI, I. and MORISHITA, Y. 2002. Frameshift mutations in the MBD4/MED1 gene in primary gastric cancer with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Letters*, 181: 115-120.
- YI, G., LEE, J. M., LEE, S., CHOI, D. and KIM, B. D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:113-130.
- YU, J. K., LA ROTA, M., KANTETY, R. V. and SORRELLS, M. 2004. EST-derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 271: 742-751.
- ZAMORE, P. D. and GREEN, M. R. 1991. Biochemical characterization of U2 snRNP auxiliary factor: an essential pre-mRNA splicing factor with a novel intranuclear distribution. *EMBO Journal*, 10: 207-214.

- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. and LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.
- ZHANG, L. H., AKINS, P. O., KOCHERT, G., KRESOVICH, S., DEAN, R. and HANNA, W. 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. *Journal of Genetics*, 98: 895-902.
- ZHANG, L. D., YUAN, D. J., YU, S. W., LI, Z. G., CAO, Y. F., MIAO, Z. Q., QIAN, H. M. and TANG, K. X. 2004. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 20: 1081-1086.

ÖZGEÇMİŞ

11 Mayıs 1976 Korkuteli/Antalya’da doğdu. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nden 1999 yılında mezun oldu. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini 2003 yılında tamamladı.

2000 yılından günümüze değin Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak bilimsel çalışmalarını devam ettirmektedir. Toplam 7 adet bilimsel araştırma projesinde Araştırmacı/Bursiyer görev almış, toplam 45 adet bilimsel eseri ve bu eserler ile birlikte yaklaşık 40 adet SCI kayıtlarına göre atıfı bulunmaktadır. Ayrıca 3 adet bilimsel araştırma ödülü almıştır.

Toplam 45 adet bilimsel eserden 14 adedi tam makale olarak SCI indeksinde (6 adet A grubu, 3 Adet B grubu ve 5 adet C grubu), 5 adedi tam makale olarak uluslar arası diğer indekslerce taranan dergilerde (3 adedi Acta Horticulturae ve 2 adet Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi) ve 8 adet araştırma SCI kapsamındaki dergilerde (4 adet B Grubu ve 4 adet C grubu) ABSTRACT olarak yayınlanmıştır. Toplam 18 adet araştırma ise ulusal ve uluslararası konferans kitaplarında basılmıştır.

Toplam 3 adet ödül almış olup bunlar uluslar arası “European Research Area Plant Genomics” konferansında Bilimsel Araştırmaları Teşvik ödülü, Türkiye genelinde yapılmış olan Prizma Moleküler Biyoloji Proje Yarışması 2006 ödülü ve Ulusal Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi ödülleri. Ayrıca TÜBİTAK tarafından verilen Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı ödülleri bulunmaktadır.

Çalışma ve uzmanlık alanları olarak “Bitkisel Genetik Transformasyon, DNA ve RNA İzolasyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi, DNA Markır Yöntemleri ve Geliştirilmesi, Fonksiyonel Genomik Çalışmalarda Gen ve Fonksiyonlarının Belirlenmesi ve Biyoinformatik Yöntemler ve Geliştirilmesi” konuları yer almaktadır.