

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE SAD GENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE POLİMORFİZM ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZNUR SUAKAR

Balıkesir, Haziran- 2006

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE SAD GENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE POLİMORFİZM ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZNUR SUAKAR

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi
Jüri üyeleri

: 10.07.2006

: Doç. Dr. Raif Kurtaran (Kimya A.B.D.)

Yard. Doç. Dr. Ekrem DüNDAR (Biyoloji A.B.D. Danışman)

Yard. Doç. Dr. Fatih Coşkun (Biyoloji A.B.D.)

Balıkesir, Haziran- 2006

ÖZET

BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE SAD GENİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE POLİMORFİZM ANALİZİ

Öznur SUAKAR

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı:Yard. Doç. Dr.Ekrem DÜNDAR)

Balıkesir, 2006

Bu çalışmada, zeytin yağının ana bileşenlerinin yaklaşık % 85' ini oluşturan oleik asitin biyosentezini katalizleyen (enzimi kodlayan) $\Delta 9$ -Stearoyl ACP desaturazın çeşitler arası ve meyve gelişim aşamalarındaki mRNA seviyeleri tespit edilerek, bu aşamalardaki yağ verimleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu genin çeşitler arası restriksiyon polimorfizmi tespit edilmiş ve bu polimorfizmin yağ verimiyle ilişkisi incelenmiştir. Meyve örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu' nun bahçesinde bulunan, Ayvalık, Memeli, Kiraz, Uslu ve Memecik zeytin çeşitlerinden Temmuz ve Kasım aylarında toplanmıştır.

Zeytin meyvelerinden izole edilen RNA örneklerinden RT-PCR ile her çeşit için ayrı ayrı $\Delta 9$ -Stearoyl ACP desaturaz genine ait cDNA çoğaltılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile ekspresyon seviye farklılığı tespit edilmiştir. Sonuçların analizi, yağlık çeşitlerde ekspresyon seviyesinin (sofralık olanlara kıyasla daha fazla) gelişime paralel olarak arttığını, meyvedeki yağ oranının genin mRNA ekspresyon seviyelerine paralel sonuçlar verdiğini ortaya çıkarmıştır. Her çeşitten RT-PCR yoluyla elde edilen cDNA' ların 4 farklı restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu, zeytin genomunda bulunduğu bilinen bu genin ($\Delta 9$ -Stearoyl ACP desaturaz) iki kopyasının, bütün çeşitlerde Msp I kesim bölgesi açısından fark gösterdiği tespit edilmiştir. Hinf I kesim bölgesi içinse çeşitler

arası polimorfizm olduğu görülmüştür. Genomik DNA' dan elde edilen PCR ürünlerinin aynı enzimlerle kesilmesi bu polimorfizmleri doğrulamıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Zeytin, zeytin yağı, *Olea europaea* L., Δ^9 -Stearoyl ACP desaturaz, mRNA ekspresyon seviyeleri

ABSTRACT

DETERMINATION OF STEAROYL ACP DESATURASE EXPRESSION LEVELS AND POLYMORPHISM ANALYSIS IN SOME OLIVE CULTIVARS

Öznur SUAKAR

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(M.S. Thesis / Advisor:Assistant Prof. Dr. Ekrem DÜNDAR)

Balıkesir- Turkey - 2006

In this study, Stearoyl ACP desaturase which is responsible for oleate (that comprises about 85 % of the major compounds of olive oil) biosynthesis was investigated in olive (*Olea europaea* L.) cultivars with respect to expression levels between cultivars in two developmental stages, and correlation of oil yield. Polymorphism of this gene among cultivars, and relationship between polymorphism of this gene and oil yield was also investigated. Olive fruit samples was obtained from Edremit Olive Seedling Propagation Station from Ayvalık, Memeli, Kiraz, Uslu, and Memecik cultivars in July and November.

Using total RNA extracted from each olive fruit sample, RT-PCR was performed and difference of Δ^9 -Stearoyl ACP desaturase mRNA levels was determined. Cultivars majorly used for oil were found to contain more mRNA expression than that of cultivars majorly consumed as table olive. Developmental expression was in parallel with oil yield especially for oil olives. Restriction analysis of Δ^9 -Stearoyl ACP desaturase cDNA with four different enzymes revealed a polymorphism (MspI) between two copies of this gene in olive genome, and a polymorphism between oil cultivars and table cultivars (HinfI). Restriction analysis of PCR amplifications from genomic DNA also confirmed these polymorphisms.

KEYWORDS: Olive, olive oil, *Olea europaea* L., Δ^9 -Stearoyl ACP desaturase, mRNA expression levels.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ANAHTAR KELİMELER	ii
ABSTRACT	iii
KEYWORDS	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin.....	1
1.2 Zeytinin Dağılışı.....	2
1.3 Zeytin Meyvesinin Özellikleri.....	3
1.4 Zeytin Meyvesinin Gelişimi.....	5
1.5 Meyvenin Olgunlaşması ve Yağ Oluşumu.....	7
1.6 Dünyada ve Türkiye’ de Zeytin Yetiştiriciliği.....	9
1.7 Üretimin Coğrafik Bölgelere Göre Dağılımı.....	12
1.8 Zeytinin Değerlendirilmesi.....	14
1.9 Zeytin Yağı.....	15
1.10 Zeytin Yağının Bileşenleri.....	15
1.11 Zeytin Yağının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	17
1.12 Zeytin Yağı Çeşitleri.....	19
1.13 Bitkilerde Yağ Asit Metabolizması.....	21
1.14 Yağ Asit Desaturazların Özellikleri ve Mekanizması.....	24
1.15. Stearoyl-Açıl Taşıyıcı Protein Desaturazın (SAD) Özellikleri.....	25
1.16 Stearoyl ACP Desaturaz (SAD) Geni Çalışılan Bitkiler.....	28
1.17 Zeytin Çeşitleri.....	28

2. ÇALIŞMANIN KAPSAM VE PERSPEKTİFİ.....	33
3. MATERYALLER VE METOTLAR.....	33
3.1 DEPC' li Suyun Hazırlanması.....	33
3.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	33
3.3 RNA İzolasyonu.....	34
3.4 Genomik DNA İzolasyonu.....	35
3.5 Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve PCR.....	36
3.6 Primerlerin Sulandırılması.....	37
3.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.8 Bitki Materyali.....	39
3.9 RNA Eşit Yükleme.....	40
3.10 Restriksiyon Enzimleri İle Kesim.....	41
3.11 Yağ Çıkarma Deneyleri.....	43
4. BULGULAR.....	43
4.1 RT-PCR Sonuçları.....	43
4.2 Restriksiyon Sonuçları.....	44
4.3 DNA Örnekleri İle Yapılmış Restriksiyon Sonuçları.....	47
4.4 Verilerin Değerlendirilmesi.....	47
4.5 Restriksiyon Enzimi İle Kesim Sonuçları.....	49
4.6 Yağ Çıkarma Deneylerinin Verileri.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
5.1 Gen Ekspresyonu ve Yağ Verimi Sonuçları.....	56
5.2 Restriksiyon Analizi Sonuçları.....	58
6. KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR

ABA	Absisik Asit
ACP	Acyl Carrier Protein (Açıl taşıyıcı protein)
AT	Asetil Ko A ACP transasetilaz
bp	Base pair (Baz çifti)
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
DEPC	Dietilpirokarbonat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Enoyl ACP redüktaz
EtBr	Etidyum bromür
gDNA	Genomik DNA
HD	β hidroksibütiril ACP dehidrataz
Co A	Koenzim A
Kb	Kilo baz
KS	β ketoaçil ACP sentaz
KR	β ketoaçil ACP redüktaz
MT	Malonil KoA ACP transferaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotiamid adenin dinükleotid fosfat
OD	Optik Densite
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PDH	Piruvat Dehidrogenaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları)

SAD	Stearoyl Acyl Carrier Protein Desaturase (Stearoly açil taşıyıcı protein desaturaz)
SDS	Sodyum Dodosil Sülfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borat etilendiamintetraasetikasit
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.	Zeytinin anavatanı ve yayılış yolları.....	3
Şekil 2.	Zeytin meyvesinin kısımlarını gösteren dikey kesit.....	4
Şekil 3.	Zeytinin olgunlaşma aşamaları.....	8
Şekil 4.	Dünyada zeytin yetiştiriciliği.....	11
Şekil 5.	Çalışmada kullanılan zeytin çeşitleri.....	32
Şekil 6.	RNA eşit yüklemesi.....	40
Şekil 7.	SAD cDNA' sının restriksiyon haritası.....	42
Şekil 8.	1,5 kb' lik primerler ile yapılmış RT-PCR sonuçları.....	44
Şekil 9.	Msp I ve BsuR I enzimleri ile kesilmiş RNA örnekleri.....	44
Şekil 10.	Msp I ve BsuR I enzimleri ile kesilmiş RNA örneklerinin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü.....	45
Şekil 11.	Alu I enzimi ile kesilmiş RNA örnekleri.....	45
Şekil 12.	Alu I enzimi ile kesilmiş RNA örneklerinin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü.....	46
Şekil 13.	Hinf I enzimi ile kesilmiş RNA örnekleri.....	46
Şekil 14.	Hinf I enzimi ile kesilmiş RNA örneklerinin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü.....	46
Şekil 15.	Msp I ve Hinf I enzimi ile kesilmiş DNA örnekleri.....	47
Şekil 16.	Temmuz ayı gen ekspresyon analizi.....	48
Şekil 17.	Kasım ayı gen ekspresyon analizi.....	48
Şekil 18.	Zeytin çeşitlerinde yağ verimi grafiği.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Dünya tane zeytin üretimi ve alanı.....	10
Tablo 2. Türkiye zeytin ağaç sayısı ve üretiminin bölgelere dağılımı.....	12
Tablo 3. Zeytin yağının bileşenleri.....	16
Tablo 4 . Zeytin yağındaki yağ asit bileşenleri.....	18
Tablo 5. Farklı yağlık meyvelerdeki yağ asit kompozisyonu.....	18
Tablo 6. Zeytin tanesinin fiziksel özellikleri ve bileşimi.....	19
Tablo 7. RNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.....	34
Tablo 8. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.....	36
Tablo 9. PCR döngü koşulları.....	37
Tablo 10. PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları.....	37
Tablo 11. Primer konsantrasyonlarının hesaplamaları.....	38
Tablo 12. RT-PCR ve PCR’ da kullanılan primerler ve Tm değerleri.....	38
Tablo 13. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve özellikleri.....	39
Tablo 14. Kullanılan zeytin çeşitleri ve takip edilen örnek toplama takvimi.....	39
Tablo 15. RNA eşit yükleme hesaplaması için her çeşit ve örneklemeden 1000 ng’ a karşılık gelen miktar.....	41
Tablo 16. Restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri ve tanıdığı diziler.....	43
Tablo 17. Msp I enzimi kesim sonuçları.....	49
Tablo 18. BsuR I enzimi kesim sonuçları.....	50
Tablo 19. Alu I enzimi kesim sonuçları.....	51
Tablo 20. Hinf I enzimi kesim sonuçları.....	52
Tablo 21. Msp I enzimi kesim sonuçları.....	53
Tablo 22. Hinf I enzimi kesim sonuçları.....	54
Tablo 23. Yağ veriminin aylara göre oranı.....	55

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, deneyimleriyle beni yönlendiren, değerli zamanını ayıran, her türlü konuda sabırla dinleyerek, destekleyen danışman hocam Yard. Doç Dr. Ekrem DÜNDAR 'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli, laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürüğü'ne, bu birimde çalışmam boyunca her konuda destek veren BÜTAM müdürü sayın Doç. Dr. Hakan KÖÇKAR'a ve bu merkezde görev alan Ferit KARANFİL'e ve diğer çalışanlara teşekkür ederim.

2005/7 no'lu projeye tezime maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu' na ve 105 O 010 kodlu projeye, Hızlı Destek Programı çerçevesinde destekleyen TÜBİTAK Tarım Orman ve Veterinerlik Araştırma Grubu 'na teşekkür ederim.

Yağ çıkarma deneyleri için, değerli vaktini, laboratuvarını, malzemelerini ve deneyimlerini paylaşan Dekan Yardımcısı Sayın hocam, Yard. Doç. Dr. Turgut KILIÇ ve öğrencisi Ahmet KARAHAN 'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan zeytinlerin temin edilmesini sağlayan, Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu Müdürü Sayın Mehmet BALCI ve Hülya YENER başta olmak üzere, toplama işleminde yardım eden, Mustafa YÜZGEÇ, Mümin ÇİMEN ve Engin PEKEL' e teşekkür ederim.

Toplanan zeytin örneklerinin -80 C° dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde nukleazlardan korumak için kullanılan kuru buzun temin edilmesindeki yardımlarından dolayı, Lang-Yüzer firmasında görev alan Tolga ÇETİN ve İsmet YÜZER'e, alınan zeytin örneklerinin toz haline getirilmesi için kullanılan sıvı azotun

temin edilmesinde yardımcı olan Balıkesir Tarım İl Müdürlüğü ve orda görev alan Hüseyin KARAGÖZ'e teşekkür ederim.

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. Feray KÖÇKAR, Yard. Doç. Dr. Yusuf TURAN ve Yard. Doç. Dr. Fatih ÇOŞKUN 'a teşekkürlerimi sunarım.

Arazi çalışmalarında, yardımlarından dolayı, çalışma arkadaşlarım Nurten ÇANAKÇI ve Görkem DENİZ başta olmak üzere, Evrim ÇELEBİ ve Hakan Çam 'a teşekkür ederim.

2004-2006 yılları arasında laboratuvar çalışmalarımı yürütürken deneyimlerinden yararlandığım hocalarıma, bir çok anıyı paylaştığımız sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca beni maddi ve manevi açıdan destekleyen, benim günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme ve amcama teşekkür ederim.

Balıkesir, 2006.

Öznur SUAKAR

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin

Ekonomik değerinden, besinsel özelliklerinden ve ağaç olarak dayanıklı olup uzun yıllar meyve vermesinden dolayı zeytin (*Olea europaea* L.) önemli bir ağaçtır. Yağ üretimi için önemli olan zeytinin var oluşu antik uygarlıklara dayanmaktadır. Yunanca “elaia” dan gelen zeytinin Latincesi olan “olea” nın etimolojik kökeni yağdır ve birçok Avrupa dillerinde de aynı anlama gelmektedir [1].

Zeytin ağacının yaprakları bir çok dönemde, zafer, akıl ve barış simgesi olarak kullanılmıştır. Nuh' un gemisine ağzında bir zeytin dalı ile geri dönen güvercin büyük sel felaketinin sona erdiğine dair bir işaret sayılmıştır. Tarihte kralların asası, din adamlarının kutsal yağı, barışın ve onurun simgesi olmuştur. İlk Grek ve Roma yazıtlarından zeytinin barışın ve birlikteliğin ebedi simgesi olduğuna değinilmiştir [2]. Yunan ve Roma uygarlıklarında zeytin ağacı, bolluk ve bereketin yanı sıra zafer ve barışın da simgesi olmuştur.

Zeytine ait kalıntılar geçmiş zamanlarda da bulunmuştur : Zeytin fosilleri, İtalya’ da Mongardino’ da Pliyosen devrine ait kalıntılarda, Kuzey Afrika’ da Relilay’da salyangozların beslendiği yerlerde üst Paleolitik döneme ait katmanlarda, ve İspanya ’daki kazı çalışmalarında Eneolitik ve Bronz devrine ait kalıntılarda tespit edilmiştir. Dolayısıyla ağacın geçmişinin 12 bin yıl öncesine dayandığı kesin bir şekilde söylenebilmektedir. Yetiştiriciliği ise, yaklaşık 6000 yıl önce Anadolu’ da başlamıştır. Bu bölgede eski dönemlerde yaşamış halklar arasında Sadece Asur’ lular ve Babil’ liler bu konuda bilgi sahibi olmamıştır [2].

Zeytin meyvesi çeşitli şekillerde işlenmek suretiyle tüketilir. Bu işlem, basit bir salamuraya yatırmaktan, acılığın fermantasyon yoluyla giderilmesine veya kimyasal bileşiklerle tatlandırmaya kadar uzanır [2].

İnsanlar bu bitkinin odunu ve meyvelerinin yanısıra, yağından kozmetik sanayisinde ve tıp alanında da yüzyıllardır faydalanmışlardır. Zeytinin insan

sağlığına ve beslenmesine olan öneminin yanında doğal hayata olan faydaları da dikkate alınarak zeytin yetiştiriciliğine büyük bir ivme kazandırılarak günümüze kadar gelmesi sağlanmıştır [2].

Akdeniz havzasındaki alanlardan elde edilen zeytin yağı, dünya zeytin yağı üretiminin % 90'ından fazlasını karşılamaktadır. Bu nedenle zeytin yetiştiriciliği, hala modern yaşamın sağlık ve ekonomisi için önemlidir [3].

Sınıflandırma sistemine göre zeytin, 20-29 cinse sahip olan Oleaceae familyasına dahildir [4, 5]. *Olea* cinsi, hepsi nispeten güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir [6]. Bunların çoğu çalılar veya ağaçlardır. Yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytinin de dahil olduğu *Olea europaea* L.' dir ve sınıflandırması aşağıdaki şekilde yapılmıştır [6].

Alem	:	Yeşil bitkiler
Alt alem	:	Tracheobionata
Superdivision	:	Spermatophyta
Division	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Altsınıf	:	Asteridae
Ordo	:	Lamiales
Aile	:	Oleacea
Cins	:	<i>Olea</i>
Tür	:	<i>Olea europaea</i>

1.2 Zeytinin Dağılışı

Güney Asya' nın bir kısmını, Türkiye' nin Anadolu bölgesini ve Suriye' yi [7] içine alan Mezapotamya' nın yukarı bölgelerinden orijinlenmiştir. Yayılışı iki yoldan olmuştur: Şekil 1' de görüldüğü gibi birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas' a, diğeri ise Anadolu boyunca Ege adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya' ya doğrudur. İlk kültüre alınışı ve ıslahı Samiler tarafından olmuştur [8-11].

Zeytin, 500-1000 yıl yaşayabilme özelliğine sahip olduğu halde, 3 veya 4 yaşında verime başlar ve 12-20 yaşlarında tam verime ulaşır. Ekonomik olarak 80-100 yaşına kadar yaşayabilir [6]. Bartolini ve arkadaşları (1993) tarafından yapılan araştırmada, zeytinin dünya genelinde 1200 isimli çeşidi ve 3000 üzerinde de sinoniminin olduğunu göstermiştir [12]. Ancak zeytinin kendine uyumsuz olması, vejetatif olarak çoğalması, periyodisite göstermesi, yetiştiricilikte çeşitli sorunlara neden olmaktadır [3, 13].

Zeytincilik için ideal bir yer olan Akdeniz bölgesinin dışındaki diğer yerlerde yetiştiricilik çok iyi yapılamadığından dolayı, zeytin Akdeniz ikliminin güvenilir indikatörü olarak [13] belirlenmiştir [2].



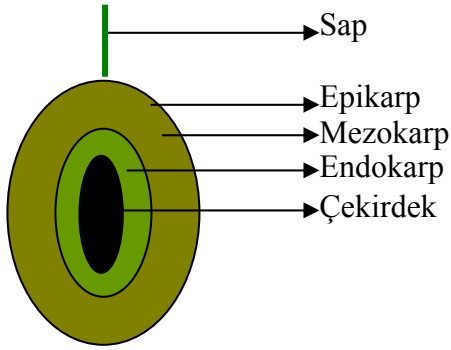
Şekil 1. Zeytinin anavatanı ve yayılış yolları [6].

1.3 Zeytin Meyvesinin Özellikleri

Zeytin meyvesi drupa tipi meyve olup [1] Şekil 2' de görüldüğü gibi 3 kısımdan oluşur:

Epikarp veya kabuk, mezokarp veya et, endokarp veya çekirdek (bir bazen iki tohumu saran odunsu kesim).

Zeytin meyvesi diğer çekirdekli meyvelerden kimyasal içeriği ve organoleptik özellikleri açısından farklılık göstermektedir. Epikarp ve mezokarpın homojenizasyonu sonucu elde edilen hamurundaki şeker miktarı % 2,5-6 gibi nispeten daha azdır.



Şekil 2. Zeytin meyvesinin kısımlarını gösteren dikey kesit [2].

Hücre ve dokuların yapı maddeleri olan lipoprotein, fosfolipid, glukolipid gibi kompleks yağ bileşimlerine ilave olarak yağ hamurda % 17-30' a varan farklı damlacıklar şeklinde yüksek miktarda yağlı maddeler bulunur. Ancak, zeytin gibi meyvelerde, sabit yağ birikimi, yağ birikme keseleri olmadığı için tohumda değil, etli perikarpta olur [14].

Tanesine has oleuropein olarak bilinen acılık bulunması nedeniyle sadece diğer çekirdekli meyvelerden değil, bütün bitkiler aleminin diğer meyvelerinden ayrılır. Bu özellikleri nedeniyle tanesi tatlı olmayıp hatta olgunluk ve aşırı olgunlukta dahi acıdır [2].

Bitkisel orijinli diğer bütün meyvelerde olduğu gibi, kabuk-et kısmı zeytinde parankimatik hücrelerden oluşmuştur. Meyve etinin (mezokarp) parankimatik hücrelerinin insan için besleyici ve biyolojik bir değeri vardır [2].

Yenilebilir lipitlerin kaynağı çoğunlukla sebze yağları olup, dünyadaki tüketimi % 75'ten fazladır. Bunlardan, % 75' i endosperm ve yağ tohumlarından (soyafasulyesi, turp yağı tohumu), geri kalanı ise meyvenin perikarpından (palmiye, zeytin) elde edilir [14].

Zeytin ağacı, uzun ömürlü olması ile diğer bir çok meyve ağaçlarından ayrılmaktadır. Ağacının gövdesi bir nedenle ölürse veya herhangi bir şekilde ortadan kalkarsa, ufak bir kök parçası veya küçük bir sürgünü, onun tekrar meydana gelmesi için yeterli olabilmektedir [80].

Zeytinlerin çiçeklenmesi havalar kurak ve aynı zamanda sıcaklık yüksek ise Nisan 20' den başlar ve Mayıs 20' ye kadar devam eder. Fakat yağışlı ve serin geçen yıllarda Haziran ortalarına kadar sürdüğü görülmektedir [80]. Çiçeklenmeden 25 gün sonra ağaçtaki küçük meyvelerin sayısı sabitleşir. Haziran sonunda döllenmesini tamamlayan çiçeklerin taç yaprakları düşerek meyvecik kendini göstermeye başlar. Temmuz ayı içerisinde küçük saçma büyüklüğündeki tanelerinde yağ oluşmaya başlamıştır. Meyvelerde gelişme, Şekil 3' de görüldüğü gibi rengi ile de kendini gösterir. Başlangıçta koyu yeşil olan zeytinler giderek açık yeşil, açık sarı, koyu kırmızı ve sonunda siyah renk alır [1, 2]. Zeytinin olgunlaşması zaman aldığından, tane ağaçta uzun bir süre kalır ve bu iki üç aylık kalış zeytinin hasadı için elverişli bir süredir [2].

1.4 Zeytin Meyvesinin Gelişimi

Normal döllenmiş meyvelerinin gelişmesi diğer bir çok çekirdekli meyvenin gelişmesine benzemektedir. Meyve gelişmesi ve olgunlaşmasının aşamaları son zamanlarda Tombesi [15] tarafından yeniden incelenmiştir. Normal döllenmiş meyveler tam çiçeklenmeden yaklaşık 10 gün sonra daha koyu renkleri ile ayırt edilebilmektedirler. İki karpelden birindeki bir embriyonun gelişimi tam çiçeklenmeden 20 gün sonra açık bir şekilde görülebilmektedir [16]. İkinci karpel bir kenara itilir ve yok olur. Bu sebeple tam çiçeklenmeden yaklaşık 40 gün sonra çekirdeğin ortasında sadece gelişen bir tane embriyo görülmektedir. Döllenmeden itibaren tam siyah olgunluğa kadar meyvenin beş gelişme devresi görülmektedir [17,

18]. Bu devreler, bir başlangıç ve bitiş aşaması olan temel bir çift sigmoid gelişme eğrisinin parçasıdır. Döllenen sonraki ilk hücre bölünmesi hızlıdır ancak yaklaşık 10-15 gün sonra hızlı hücre büyümesi belirgin olmaktadır. Birinci hızlı gelişme periyodu (devre II) esas itibarıyla endokarpın gelişmesini, bir dereceye kadar da mezokarp ve ekzokarp gelişmesini kapsamaktadır. II. devre esnasında meyve ekseriyetle gelişmekte olan çekirdekte ibaret olup, bu devre Temmuz başlangıcındaki çekirdek katılaşması ve sertleşmesine kadar sürmektedir. Daha sonra meyve gelişmesi önemli derecede yavaşlamakta ve meyve gelişiminin III. devresi başlamaktadır. Yavaş gelişmeyi kapsayan bu III. safhada embriyo ve çekirdek kesin boyutlarına ulaşır ve çekirdek sertleşmesi tamamlanır. Bu periyodun sonunda (Temmuz sonu) meyve eti hücrelerinin esas büyümesi başlar ve böylece hızlı meyve gelişmesi meydana gelir (devre IV).

IV. devredeki hızlı meyve gelişimi esnasında yağ biyosentezi ve miktar artışı başlar (lipogenesis). Bu hızlı meyve gelişme devresi meyvenin renk değiştirmeye başladığı sonbaharda sona erer. Bundan sonra meyvenin gelişimi belirgin şekilde yavaş olmakta ve değişik olgunlaşma süreçleri meydana gelmektedir. Meyve büyüme ve gelişiminin bu beş evresi *O. europaea*'nin bütün çeşitleri için tipiktir. Her bir devre esnasında gelişmenin hızı ve süresi, her çeşit ve gelişme koşulu için belirlidir. Değişik gelişme devreleri ve özellikle gelişmenin yavaş olduğu III. Devre için her meyvenin gelişme eğrisinin ayrı olması sebebiyle, bu meyve popülasyonu için ortalama olarak tespit edildiğinde, bu hız ve süre her zaman belirgin olmamaktadır [18].

Meyvenin ilk aktif gelişme periyodu esnasında (devre II) esas gelişen doku çekirdektir. Bu periyodun ikinci yarısında meyve hacminin % 80'ine kadar kısmını çekirdek oluşturmaktadır. Böylece, ikinci devrenin sonlarında su stresi içeren periyot, olgunluk döneminde muhtemelen uygun bir et-çekirdek oranını sağlayan nispeten ufak bir çekirdek sonucunu doğurmaktadır. Gerçek meyve büyüklüğü ekseriyetle meyve eti ve meyve kabuğunun hızlı bir şekilde geliştiği IV. devre esnasında Ağustos ayında, az bir miktarda bile olsa su uygulamasının, meyvenin en son büyüklüğü ve yağ birikimi üzerinde önemli bir etki oluşturduğunu göstermiştir [19]. Bir çok durumda da erken su uygulaması, sulanmayan zeytinlere

oranla meyve büyüklüğü ve yağ muhtevası üzerinde çok az bir etki yaratmıştır [20, 21].

Meyve çekirdeğinin şekli her çeşit için tipiktir ve meyve şekli ile yakından ilişkilidir. Ayrıca çekirdeğin morfolojisi, karakterize etmek ve tanımlamak için faydalı ve güvenilir bir araçtır [22].

1.5 Meyvenin Olgunlaşması Ve Yağ Oluşumu

Zeytin meyvesinin olgunlaşmasını belirlemek güçtür. Bu nedenle olgunluk için kesin, objektif standartlar yoktur. Meyve dokusunun klorofil muhtevasının azalmaya başladığı dönem olgunluğun başlangıcı olarak tanımlanabilir. Yeşil olgunluk deyimi; meyvelerde Antosiyanin miktarının artması veya meyvelerin kararmaya başlamasının birkaç gün öncesi, bütün meyvenin açık yeşil bir renge ulaştığı dönemi belirtmektedir. Yeşil olgunlukta meyve sertliğinden biraz kaybeder ve eti çekirdeğinden kolay ayrılan çeşitlerde çekirdek meyve baskısı ile dışarıya itilebilir. Bu devrede hala aktif yağ artışı olduğundan, yağ içeriği seviyesi olgunluk için güvenilir bir belirleyici değildir. Kimyasal olarak zeytin meyvesinin olgunlaşması; meyvelerin şeker içeriğinde bir azalmayla ve özellikle yüksek alkol ve terpen gruplarından çeşitli aroma bileşiklerinin miktarlarındaki artmayla ilişkilidir. Şeker alkollerini ve özellikle mannitol zeytindeki bünyesel maddelerin geçişlerinde önemli bir rol oynamaktadır [15, 23]. Düşük yağ içerikli çeşitlerde meyve olgunlaşma periyodunun başında, şeker ve yağ seviyeleri paraleldir, yüksek yağ içeriğine sahip olan çeşitlerde ise şeker seviyesi azalmaktadır [24].

Zeytinde meyve olgunlaşmasının bütün süreci tek bir modele sahiptir. Meyvelerde etilen oluşumu olgunlaşma ile artmasına rağmen, etefon uygulaması olgunlaşma üzerinde az bir etkiye sahiptir [25]. Zeytinin olgunlaşmasıyla etilen üretiminin arttığı ve artan etilen miktarının da zeytinin daldan ayrılmasında etkili olduğu yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır [26, 27].

Olgunlukta veya hasatta meyvede oluşan yağın potansiyel miktarı geniş anlamda çeşit tarafından belirlenmekte fakat, bu miktar büyük ölçüde gelişme

şartları, yaş ve iklime ve daha az derecede meyve yüküne bağlı olarak değişmektedir. Yağ teşekkülü bütün çeşitlerde IV. gelişme döneminin başlangıcından kısa bir zaman sonra başlamakta, böylece perikarp hücrelerinin aktif gelişimine paralel olarak oluşmaktadır. Oluşan küçük yağ damlacıkları endoplazmik retikulum uçlarında birikmektedir [28].

Döllenmeden sonra tohumun farklı gelişme dönemleri süresince yağ asitleri bakımından sürekli bir değişim ortaya çıkmaktadır. Özellikle C18 yağ asitleri kompozisyonunun sıcaklık başta olmak üzere çevresel etkilere karşı oldukça duyarlı olduğu ve ayrıca genetik olarak kontrolüne embriyonun çekirdek etkisi dışında sitoplazmik ve maternal etkilerin de söz konusu olduğu belirtilmiştir [29].

Gelişme periyodunun ilk yarısında zeytin meyvesinin ağırlığı oldukça linear oranlarda artar, bu yüzden çiçeklenmeden sonraki ilk 10 hafta içinde yağ depolanması gözlenebilir. Endokarpın lignifikasyonu, çiçeklenmeden sonraki 10-12 haftalar arasında gerçekleşir. Bu olay triaçilgliserit (TAG) sentezinin ve dolayısıyla etli kısımda ve tohumda yağ birikiminin başladığının belirtisidir [1]. Zeytinde mezokarp ve tohum olmak üzere 2 farklı dokuda TAG seviyesi oldukça yüksektir. Mezokarp dokusundaki yağ içeriği ; kuru ağırlığın % 75' ini, toplam yağ ağırlığının ise % 95' ini oluştururken; tohum dokusundaki yağ içeriği % 3' ü geçmemektedir [30]. Buradan anlaşıldığı gibi, zeytin meyvesinde yağın depolandığı ana yer etli kısımdır.



Şekil 3. Zeytinin olgunlaşma aşamaları [81]. O. Temmuz-Ağustos, A. Eylül-Ekim, B. Kasım, C. Aralık.

1.6 Dünyada ve Türkiye' de Zeytin Yetiştiriciliği

Dünyada, 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. Bu ülkelerin 29 tanesi Kuzey yarım kürede, 8 tanesi ise Güney yarım kürede yer almaktadır. Kuzey yarım kürede bulunan üretim alanlarının Akdeniz bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir. Yaklaşık 13 milyon ton olan dünya tane zeytin üretiminin % 80' i beş Akdeniz ülkesinde yoğunlaşmıştır. Dünyadaki zeytin üretiminin % 92 'si yağlık, %8' i ise sofralık olarak değerlendirilmektedir. Dünya zeytin tane üretiminin sırasıyla Tablo 1' de görüldüğü gibi, 1989-97 yılları üretiminin % 26,6' sı İspanya, % 23,1' i İtalya, % 14,8' i Yunanistan, % 8,2' si Türkiye, % 7,4' ü Tunus ve %4,5' i Fas tarafından sağlanmaktadır [31].

Dünya zeytinyağı üretimi, 1991-97 döneminde ortalama 1.890.400 tondur. Bunu izleyen sezonlarda üretimin 2 milyon tonun üzerine çıktığı görülmektedir. Dünya üretiminin % 75,3' ünün Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde gerçekleştiği dikkat çekmektedir. Dolayısıyla zeytinyağı arzına AB ülkelerinin hakim olduğu söylenebilir. Dünya üretiminin % 30,7' sini başta İspanya, % 24,3' ünü İtalya, % 16,5' ini, Yunanistan karşılamaktadır. Türkiye'nin dünya zeytinyağı üretimindeki payı % 4,8 olup 4. sırada yer almaktadır (Şekil 4).

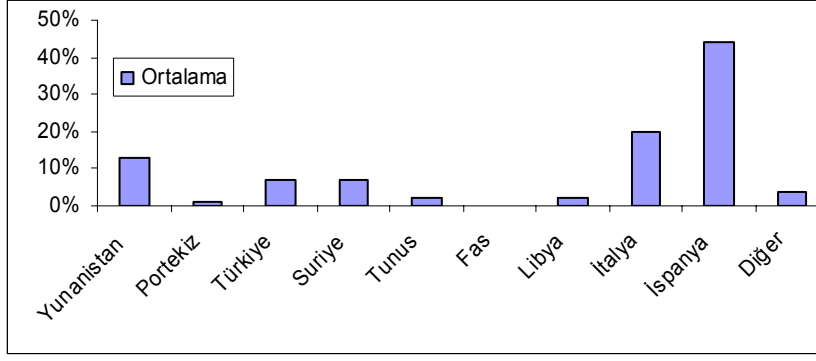
Kişi başına zeytinyağı tüketimi Yunanistan'da 21 kg, İtalya'da 12 kg iken Türkiye'de 0,8 kg' dır. Yurtiçi zeytinyağı tüketimi oldukça düşüktür.

Dünya sofralık zeytin üretimi Tablo 1' de görüldüğü gibi 1990/91-97 döneminde ortalama 981.700 tondur. Bunu izleyen sezonlarda ise üretimin 1 milyon tonun üzerine çıktığı görülmektedir [31].

Tablo 1. Dünya Tane Zeytin Üretimi Ve Alanı (1989-97)

Ülkeler	Üretim (1.000 Ton)							Alan*	Verim
	1989-91	1994	1995	1996	1997	1989-97 ort.	%	1000 ha 1998	Kg/ha 1998
1.İspanya	3.099	2.727	1.773	4.467	3.840	3.181	26,6	2.227	1428, 5
2.İtalya	2.638	2.640	3.289	2.195	3.081	2.769	23,1	1.141	2426, 5
3.Yunanistan	1.560	1.933	1.731	1.950	1.700	1.775	14,8	719	2468, 4
4.Türkiye	747	1.400	515	1.800	450	982	8,2	881	1115, 1
5.Tunus	933	350	350	1.250	1.550	887	7,4	1.624	545,9
6.Fas	532	500	436	800	450	544	4,5	480	1132, 5
Diğer	1.329	1.754	1.786	2.319	1.992	1.836	15,3	1.668	1100, 7
DÜNYA	10.838	11.304	9.880	14.78 1	13.06 3	11.973	100,0	8.740	1369, 9

Kaynak: FAO, Production Yearbook, 1997 (*) UZK



Şekil 4. Dünyada zeytin yetiştiriciliği (FAO, Production Yearbook, 1997)

Ülkemizde zeytin üretim alanlarının başta Ege ve Marmara bölgesi olmak üzere Akdeniz, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Yaklaşık 27 milyon hektar olan Türkiye tarım alanlarının % 2,2' sinde diğer bir deyişle 600.000 hektar alanda zeytin tarımı yapılmaktadır. Türkiye meyve üretim miktarının % 7' sini ve bağ-bahçe alanlarının % 20' sini zeytin oluşturmaktadır [31].

Zeytin ağaçlarının ortalama % 92,3' ü verim döneminde olup meyve veren ağaçlardan, % 7,7' si ise henüz meyve vermeyen ağaçlardan oluşmaktadır. Ağaç başına verim miktarı da üretim ve ağaç sayısındaki değişime bağlı olarak 5,3-20,0 kg/ağaç arasında gerçekleşmiş olup ortalama 11,9 kg/ağaç' tır [31].

Zeytin bahçelerinden elde edilen tane zeytini içindeki doğal acılık maddesi nedeniyle doğrudan gıda olarak tüketmek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle tane zeytin çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlarla sofralık zeytin veya zeytinyağına işlenmektedir. Türkiye'de üretilen tane zeytinin Tablo 1' de görüldüğü gibi 1993-98 yılları ortalaması olarak % 28,3' ünün sofralık olarak işlendiği ve tüketildiği görülmektedir. Sofralık zeytin yetiştiriciliği genelde Marmara bölgesinde yoğunlaşmıştır. Sofralık çeşitlerle üretim yanında yağlık veya kombine amaçlı çeşitlerden sofralık kalitesinde olan ürünler toplam sofralık (yemeklik) zeytin üretimini oluşturmaktadır. Tane üretimin % 71,7' si ise yağlık olarak işlenmektedir. Yağlık zeytin üretimi Ege bölgesinde yoğunluk göstermektedir. Doğrudan yağlık çeşitlerle yapılan üretimin yanında, sofralık nitelikte olmadığı için yağlık olarak

değerlendirilebilen ürünler de genelde (toplam) potansiyel yağlık tane zeytin olarak kabul edilmektedir [31].

1.7 Üretimin Coğrafik Bölgelere Göre Dağılımı

Türkiye 93,405,000 zeytin ağacına sahiptir. Bunlardan, üretimin kıyı bölgeler ile Güneydoğu Anadolu bölgesi dahil 600,000' i 5 bölgeye ayrılır [31, 32]. Bu bölgeler; Ege bölgesi, , Marmara bölgesi, Akdeniz bölgesi, Güneydoğu Anadolu bölgesi, ve Karadeniz bölgeleridir.

Orta Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde ekonomik anlamda zeytin üretimi bulunmadığı söylenebilir. Zeytinin anavatanı olarak kabul edilen ülkemizde, 1998 yılı istatistik verilerine göre mevcut 80 ilin 36 sında yani % 45' inde zeytin üretimi söz konusudur [31].

Tablo 2. Türkiye Zeytin Ağaç Sayısı ve Üretiminin Bölgelere Dağılımı (1998) (DİE).

Zeytin Bölgeler	Ağaç Sayısı (adet)				Üretim (Ton)		Verim (Kg/ ağaç)
	Toplam	%	Meyve veren	Meyve vermeyen	Üretim	%	
Ege	63.233.815	67,7	58.984.548	4.249.267	1.243.627	75,4	19,7
Marmara	14.573.555	15,6	13.581.335	992.220	183.849	11,1	12,6
Akdeniz	10.530.675	11,3	9.196.561	1.334.114	187.126	11,3	17,8
Güneydoğu	4.722.403	5,1	3.781.141	941.262	32.898	2,0	7,0
Karadeniz	389.552	0,4	306.415	83.137	2.500	0,2	6,4
Türkiye	93.450.000	100,0	85.850.000	7.600.000	1.650.000	100,0	17,7

Ege Bölgesi : Balıkesir, Manisa, İzmir, Aydın, Denizli, Muğla illerini kapsayan ve ülkemizin batısında bulunan Ege Bölgesi, zeytin ağacının en iyi yetişme şartlarına sahiptir. Elde edilen tane daha ziyade yağa işlenmekte olup, son yıllarda yapılan çalışmalarla sofralık olarak değerlendirme imkanları arttırılmıştır. Tablo 2' de

görüldüğü gibi bölge Türkiye zeytinciliğinin en önemli bölümünü teşkil etmekte ve ağaç varlığının % 67,7' sine sahip bulunmakta, tane üretiminin de % 75,4' ünü vermektedir [31].

Körfez Bölgesi olarak ifade edilen Ayvalık, Burhaniye, Edremit ve Havran' ı içine alan havza oldukça önemli kapama zeytinliklere sahip olup, en kaliteli zeytinyağı üretimi bu havzada yapılmaktadır [31]. Bölgede ağaçlar Marmara Bölgesine göre daha büyüktür. Memecik ve Ayvalık en önemli iki çeşidi oluşturmaktadır. Körfez yöresinde Ayvalık, Güneyde İzmir ve Aydın ili ve çevresinde ise Memecik çeşidi çoğunluktadır. Manisa'nın Akhisar yöresinde yeşil sofralık Domat ve siyah sofralık Uslu çeşitleriyle son yıllarda yayılan Gemlik çeşidi önemli çeşitlerdir [31].

Marmara Bölgesi : Çanakkale, Bursa, Bilecik, Sakarya, Kocaeli, İstanbul, Yalova, Tekirdağ, Eskişehir illerinde zeytin üretimi yapılmaktadır. Türkiye zeytin ağaç varlığının ortalama % 15,6' sı ve toplam tane üretiminin % 11,1' i bu bölgeye ait olduğu Tablo 2' de görülmektedir. Bölge yoğunlukla salamuralık bir bölgedir. Mevcut çeşitler salamuracılığa elverişli olup, sağlam her tane sofralık olarak değerlendirilmektedir. Bölgenin en iyi sofralık çeşidi "Gemlik" olup, mevcut zeytin varlığının % 80' i bu çeşitten oluşmuştur [31].

Akdeniz Bölgesi : Antalya, Isparta, İçel, Adana, Osmaniye, Hatay, Kahramanmaraş, Karaman illerini kapsayan ve Türkiye'nin güneyinde yer alan bu bölge, Toros Dağları ile Akdeniz arasında dar bir şerit halindedir. Bölgede zeytinciliğin geçmişi çok eskidir. Ülke zeytin ağaç varlığı ve üretiminin % 11,3' ü bu bölgeye ait olduğu Tablo 2' de görülmektedir. Mahalli bazı zeytin çeşitleri yanında Tavşan Yüreği, Ege ve Marmara Bölgesi çeşitleri (Gemlik, Memecik, Ayvalık vb. gibi) yayılma göstermektedir. Bu bölgede zeytin diğer kültür bitkilerinin rekabeti ve baskısı altındadır [31].

Güneydoğu Anadolu Bölgesi : Bölgenin zeytincilik yönünden önemli illeri; Gaziantep, Kilis, Adıyaman, Şanlıurfa, Mardin' dir [31].

Karadeniz Bölgesi : Ülkemizin kuzeyinde yer alan ve Zonguldak, Kastamonu, Sinop, Samsun, Ordu, Trabzon, Artvin illeri, zeytincilik yönünden ekstrem şartlara sahiptir. Bölgenin ağaç varlığındaki payı % 0,4'ü tane üretimindeki payı ise % 0,2' dir. Bölgede mahalli çeşitlerin yanında diğer bölgelerden gelmiş çeşitler mevcuttur [31].

1.8 Zeytinin Değerlendirilmesi

Zeytin meyvesi genel olarak sofralık zeytin ve yağ amaçlı yetiştirilir. Sofralık ve yağlık zeytinlerin özellikleri tamamen çeşide bağlıdır. Zeytin ürünün kalitesini etkileyen faktörler arasında fenol içeriği, yağ asit profili ve nem bulunmaktadır [33]. Yağlık zeytinlerde, zeytin yağının yağ asit kompozisyonu, çeşit, zirai ve çevre gibi farklı parametrelere de bağlıdır [34]. Yağ bitkilerinin yağ asit kompozisyonu sürekli sabit olmayıp ; ekolojik, morfolojik, fizyolojik, kültürel ve kalıtsal pek çok faktörün tek veya birlikte etkileşimleri sonucu değişebilmektedir [29]. Bu da çeşitler arasında yağ içerik farkının olabileceğine dair bir kanıttır.

Aynı bitki üzerinde çeşitli pozisyonlarda meydana gelen meyvelerin hepsinin aynı kompozisyonlarda yağ asitleri içerdiği düşünülebilir. Çünkü bitkinin bütün meyvelerinde aynı gen veya genlerin kontrolü altında sentez gerçekleştirilmektedir. Oysa, bitki içindeki fizyolojik büyüme ve gelişme farklılıkları nedeniyle gerçekleşen beklenenden çok farklı olarak ortaya çıkmaktadır [29]. Tek bir bitkinin her bir meyvesinde hatta her bir meyvenin farklı kompozisyonlarında dahi farklı bir yağ asidi kompozisyonu ile karşılaşılabilmektedir [29].

Ülkemizde yaklaşık zeytin üretiminin % 71,7' si yağ için kullanılırken, % 28,3' ü turşuluk için kullanılır. Toplam turşuluk zeytin üretimi 1 yıldan diğerine değişirken, 10 yılda ortalama 252,000 tona ulaşır [35]. Siyah sofralık zeytinde, Türkiye' de büyük ölçüde üretilirken, yeşil zeytin üretimi sadece 20,000 tondur. [32].

1.9 Zeytin Yağı

Sadece zeytin ağacı meyvelerinden (*Olea europaea* L.) elde edilen, hiçbir kimyasal işlem görmeden doğal hali ile tüketilebilen, oda sıcaklığında sıvı olan bir yağdır. Yağ, zeytinin bir ürünüdür, fakat meyvenin tüm özelliklerini değil, yağlı kısımların özelliklerini taşır [2].

Zeytin yağı, sadece yemeklik olarak değerlendirilmemiştir. İlk önce, kandillerde yakılarak aydınlatma amacıyla, daha sonra da Tablo 6' da görüldüğü gibi eşsiz bileşiminden gelen sağaltıcı özellikleri keşfedildiği için, ilaç ve güzellik malzemesi olarak kullanılmıştır.

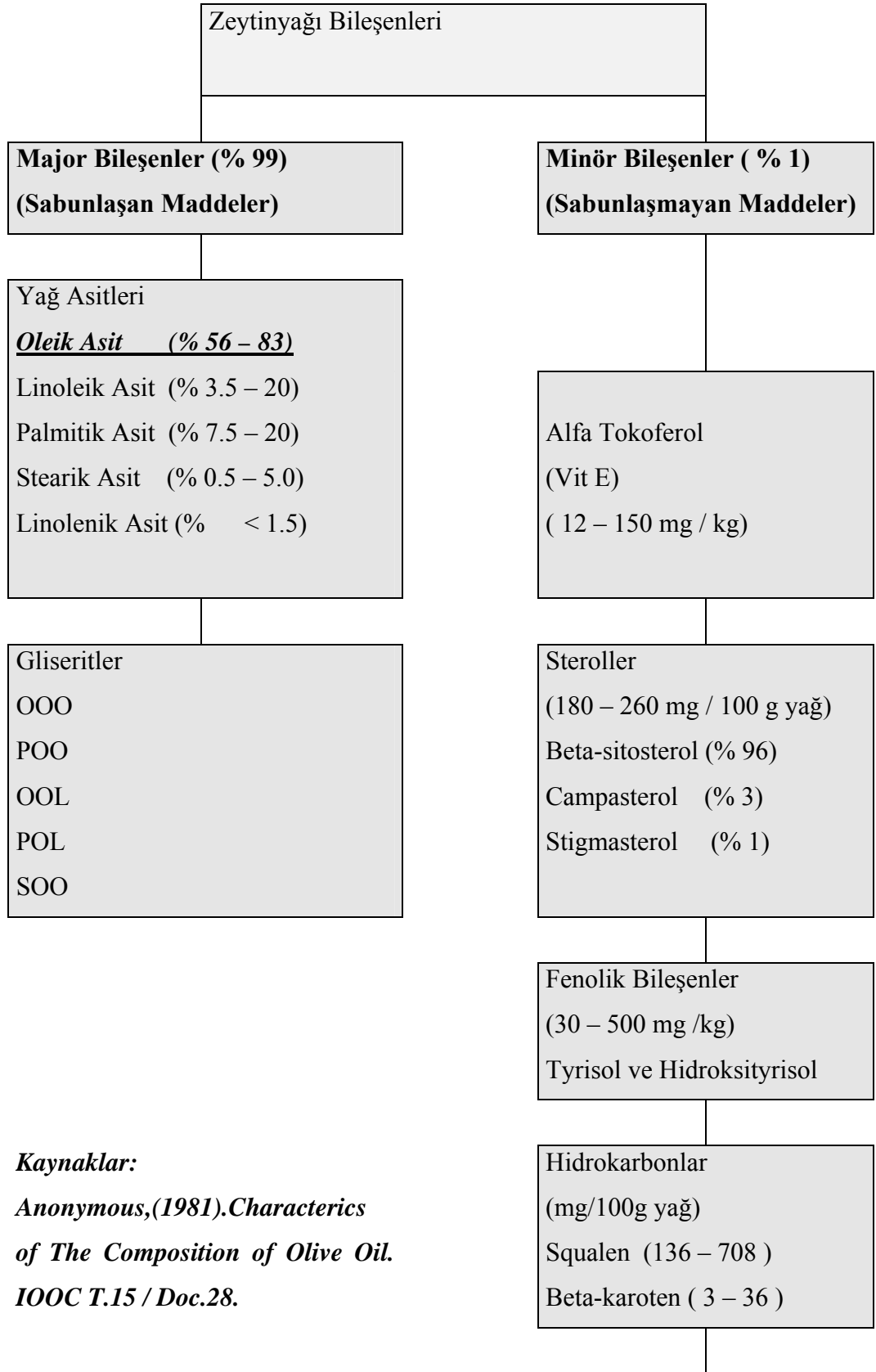
Zeytin en eski yenilebilir yağdır ve hala Akdeniz besinlerinin en önemlilerinden biridir. Bugün Akdeniz dışındaki birçok bölgede de üretilmekte ve tüketilmektedir. Üretimde ; Avrupa % 79,6 ile ilk sırada yer alırken, bunu % 11 ile Afrika, % 8,6 ile Asya ve % 0,8 ile Güney Amerika izlemektedir [2].

Bitkisel yağlar arasında rafineri zeytin yağının tek olmasının ana nedeni; oleat başta olmak üzere, vitaminler, antioksidantlar gibi minör bileşenlerden kaynaklanmaktadır [1] .

1.10 Zeytin Yağının Bileşenleri

Zeytin yağındaki belirli bileşenler yağ-trigliserid bileşimi, sabunlaşmayan kısım ve küçük polar moleküllerin bir dizi bileşimleri olarak ayırt edilebilir [2]. Bütün bu bileşenler ve kompozisyonu Tablo 3' de görülmektedir.

Tablo 3. Zeytin yağının bileşenleri [83]



Kiritsakis ve Min, (1989). Flavor Chemistry of Olive Oil.
İçinde: Flavor Chemistry of Lipids Foods. Bölüm 11:196-221 sayfalar.
AOCS, Champaign IL, USA.

Triterpenik Alkoller (255 mg /100 g yağ) Siklo – artenol
Alifatik Alkoller (290 mg/ 100 g yağ)
Fosfolipitler (40 – 135 mg / kg)
Renk Vericiler Klorofiller (1 – 10 mg / kg) Feofitinler (0.2 – 24 mg / kg))
Aroma Bileşenleri (250 – 500 mg / kg)

1.11 Zeytin Yağının Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri

Zeytin yağındaki trigliseridleri oluşturan temel yağ asitleri; oleik asit, palmitik asit, linoleik asit, stearik asit ve palmitoleik asitlerdir. Bununla birlikte çok az miktarda linolenik asit, araşidonik asit, behenik asit, lignoserik asit ve eikosenik asitte Tablo 4’ te görüldüğü gibi zeytinyağının bünyesinde bulunmaktadır. Heptadekanoik ve heptadekenoik asitlerden de az miktarda vardır (C.17:0 ; C.17:1) [2].

Tablo 4. Zeytin yağındaki yağ asiti bileşenleri [2].

ASİT	KS	İZOMERLER	MA	AD	SD	ID
Palmitik asit	16:0		256,4	218,8	208,5	0,00
Palmitoleik	16:1	cis	524,4	220,5	210,1	99,78
Stearik	18:0		284,5	197,2	188,8	0,00
Oleik	18:1	cis	282,4	198,6	190,1	89,87
Linoleik	18:2	cis-cis	280,4	200,0	191,4	181,04
Linolenik	18:3	cis-cis-cis	278,4	201,5	192,7	273,52
Araşık	20:0		312,5	179,5	172,5	0,00
Eikosenoik	20:1		310,4	180,7	173,6	81,75
Behenik	22:0	cis	340,6	164,7	158,8	0,00
Lignoserik	24:0		368,6	152,2	147,1	0,00

KS: Karbon sayısı; AD: Asit değeri; MA: Moleküler Ağırlığı; ID: Iyot değeri; SD: Sabunlaşma değeri

Tablo 5. Farklı yağlık meyvelerdeki yağ asit kompozisyonu [14].

Yağ asidi	KOMPOZİSYON (%)		
	Zeytin	Avokado	Palmiye
12:0	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	< 0,1
14:0	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	0,9-1,1
16:0	10-18	9-13	43,1-45,3
16:1	0,7-2,4	2,8-4,0	0,3-0,7
18:0	2,3-2,5	0,4-1,0	4,0-4,8
18:1	57-58	69-74	38,4-40,8
18.2	7-19	10-14	9,4-11,1
18:3	0,6-0,8	1-2	0,1-0,4
20:0	0,4-0,5	< 0,1	0,1-0,4
20:1	< 0,3	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş

Zeytin yağının yağ kalitesinin belirlenmesinde kullanılan iki parametre vardır. Asidite ve yanlış üretim teknikleri. Asidite, oleik asit cinsinden belirlenirken, başlı başına önemli bir parametre olmamakla birlikte uygun üretim ve yağ teknolojisinin göstergesidir.

Tablo 6. Zeytin tanesinin fiziksel özellikleri ve bileşimi [79].

Fiziksel özellikler		Tipik zeytin bileşimi	
Tane ağırlığı	2-12 g	Su	% 50
Çekirdek oranı	% 13-30	Yağ	% 22
Et (pulp) oranı	% 66-85	Protein	% 1.6
Meyve kabuğu	% 1.5-3.5	Selüloz	% 5.8
		Şeker	% 19.1
		Kül	% 1.5

Yemeklik bitkisel yağların kimyasal bileşimi (Tablo 5) zeytinyağının kimyasal bileşimi (Tablo 4) ile karşılaştırıldığında tekli doymamış yağ asitlerinden oleik asit oranının zeytinyağında yüksek olduğu görülebilir [36].

Yağın temel asiditesi (oleik asit cinsinden) % 0,2 dir ve bu değerdeki herhangi bir artış, yağ oluşumundan önce hafif de olsa, beklenmedik bir olayın meydana geldiğini işaret eder. Naturel yağın üç sınıf kategorisi, bir puan (% 1) lık asidite ile ayrılır [2].

1.12 Zeytin Yağı Çeşitleri:

1. NATUREL ZEYTİNYAĞLARI: Zeytin ağacı meyvesinden, doğal özelliklerini değiştirmeyecek bir sıcaklıkta sadece mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen, berrak yeşilden sarıya değişebilen renkte, kendine özgü tat ve kokuda olan doğal halinde tüketilebilen yağlardır [81]. Üstün kalite için gerekli tüm komponentleri içermesinden dolayı en yüksek biyolojik değere sahiptir [79].

Kendi içinde naturel zeytin yağı 3 e ayrılmaktadır.

- a) **Naturel sızma zeytin yağı** : Kokusu ve tadında kusur olmayan, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 1 olan naturel zeytin yağıdır.
- b) **Naturel birinci zeytin yağı** : Kokusu ve tadında çok hafif kusurlar bulunabilen, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 2 olan naturel zeytin yağıdır.
- c) **Naturel ikinci zeytin yağı**: Kokusu ve tadında tolere edilebilen kusurları bulunan, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 3,3 olan naturel zeytin yağıdır [79].

2. RAFİNE ZEYTİN YAĞI: Zeytin, ham yağının yapısında değişikliğe yol açmayan metodlarla rafine edilmesi sonucu elde edilen, sarının değişik tonlarında rengi olan, kendine özgü renk ve kokuda bir yağdır. Serbest asitlik derecesi oleik asit cinsinden en çok % 0,3 tür [82]. Bu yağı elde etmek için, asiditenin giderilmesi (nötralizasyon), renginin açılması (ağartma) ve kokunun giderilmesi (deodorizasyon) olarak bilinen üç değişik aşama ve türde işleme tabi tutulur.

3. RİVİERA ZEYTİN YAĞI: Rafine zeytin yağı ile doğal halinde gıda olarak tüketilebilecek naturel zeytinyağlarının karışımından oluşan (% 10-20 naturel zeytin yağı, % 80-90 rafine zeytin yağı) [79], yeşilden sarıya değişen renkte, kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır. Serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinde) en çok % 1,5 tir [82].

Naturel zeytin yağı üretim aşamasında arta kalan zeytin posası (prina, zeytin kalıntısı) çözenlerle işlenmesi sonucu elde edilen prina yağı da tüketime sunulur [79].

Ülkemizde, naturel zeytin yağı üretimi yaklaşık % 25-30 olup, bunun çok küçük bir kısmı natürel sızmadır. Rafine zeytin yağı üretimi yaklaşık % 70-75 dir. Oysa diğer önemli zeytin yağı üreticisi ülkelerde, natürel zeytin yağı üretimi yaklaşık % 80-90 oranındadır [79].

Yağ asitleri, insan vücudunda bazı işlemler görerek değişik özellikte yağ asitleri haline dönüştürülür. Ancak, oleik, linoleik ve gama linoleik asitlerin dışardan olduğu gibi alınması gerekir. İnsan ve hayvan vücudu, bunları diğer yağ asitleri gibi sentezleyerek üretemezler. Oysa bunların organizma için çok önemli işlevleri vardır. Yağ asitleri insan beslenmesi yönünden önemli olduğu çift bağın sayısı ve bu bağın yağ asidi molekülü üzerinde ilk bulunduğu yer, asıl önemli noktayı oluşturmaktadır. İnsan vücudu, ilk çift bağı sondan 3. ve 6. karbon olan yağ asitlerini sentezleyemediği için elzem yağ asitleri olarak kabul edilmektedir [79].

1.13 Bitkilerde Yağ Asit Metabolizması

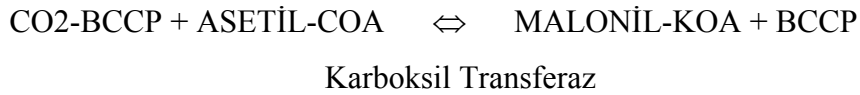
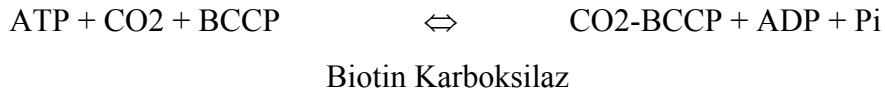
Bitkilerde yağ asiti biyosentezi, fotosentetik olmayan dokuların plastidlerinde ve yeşil dokuların kloroplastlarında olur [37, 38]. Bir çok bitkide yağ asit sentezinin öncül ürünleri, palmitoyl ACP (16:0 ACP) ve stearoyl ACP (18:0 ACP) dir [37].

Bitkilerde, yağ asit biyosentezinde en önemli enzim olan yağ asit sentetazın çekirdeği 7 farklı polipeptitten oluşur ve işlemlerin bazı bölümlerinde en az 3 en fazla 7 protein görev alır. Proteinler birlikte çalışarak Asetil CoA ve Malonil CoA dan yağ asitlerinin oluşumunu katalizlerler [39]. İşlem boyunca ara ürünler kompleksin iki tiyol grubundan birine kovalent olarak bağlı kalır. Bağlanmanın birinci noktası; 7 proteinden birindeki (β ketoaçil-ACP sentaz) sisteinin –SH grubudur. İkinci noktası yağ asidi sentezi açıl ara ürünüyle bir tiyoester oluşturan açıl taşıyıcı proteinin –SH grubudur [39].

Bitkilerde 7 aktif bölge, 7 polipeptid bulunur (6 enzim + 1 ACP). Bu komplekslerde her bir enzim bir önceki ve bir sonraki enzimin yakınındaki aktif bölgede yerleşmiştir.

Bitki yağ asit sentaz kompleksi, farklı enzimleri içeren tip II enzim sistemi olarak sınıflandırılabilir [1, 14, 40]. Bu enzimler ; β ketoaçil ACP sentaz I, II, III (KAS I, II, III). β ketoaçil ACP redüktaz, β hidroksi ACP dehidrataz, Enoyl ACP reduktazdır. Stearik asitin oluştuğu uzama basamağı, KAS III tarafından katalizlenir [41]. Bu adım çok önemlidir, çünkü yağ asitleri havuzunda, C16/C18 oranının

belirlenmesinde kullanılır [29, 42]. Yağ asit biyosentezi için en önemli aracı Asetil CoA dır. Yapılan çalışmalar, bu bileşiğin sentezinde iki olasılığın olduğunu göstermiştir. İlk olarak, plastidlerdeki glikoliz yoluyla Piruvat Dehidrogenaz enzimi ile üretilen Asetil CoA ve diğeri mitokondriyal piruvat dehidrogenaz yoluyla üretilen Asetil CoA dır. Zeytinde asil lipidlerinde piruvat kadar asetat da bulunduğu için meyvenin etli kısmında her iki yol ile Asetil CoA oluşturulabilmektedir [14]. *de nova* yağ asit sentezinin işleyişi, plastidlerde oluşur ve yağ asit sentaz ve Asetil CoA Karboksilaz isminde iki enzimin koordine aktivitesini gerektirir [1]. Yağ asit sentaz kullanılmadan önce, Asetil CoA karboksilaz tarafından üretilen, Malonil CoA, karboksil transferaz ile malonil ACP ye transfer edilir [14].



Yağ asitleri sentezinin uzama safhası Asetil ve Malonil gruplarının ACP ye bağlanmasıyla başlar. Yağ asiti sentaz iki önemli –SH grubuna sahiptir. Bunlardan birisi ACP deki 4 fosfopantetein prostetik grubuna ait olup, diğeri spesifik domain 1 deki 3 ketoaçil sentaz enziminin sistein rezidüsüdür. Her ikisi de yağ asiti sentezine katılır. Birinci – SH grubu malonil grubunun, ikinci -SH grubu da asetil grubunun girişidir. Asetil ve Malonil gruplarının ACP ye bağlanması iki enzimatik reaksiyonla gerçekleşir. Birinci reaksiyonda Asetil transferaz aracılığıyla Asetil CoA nın Asetil grubu yağ asidi sentazın sistein –SH grubuna transfer edilir. İkinci reaksiyonda, malonil transferaz aracılığıyla Malonil CoA nın Malonil grubu ACP nin fosfopantetein sülfidril grubuna transfer edilir. Malonil grubu sadece pantetein –SH grubuna bağlanabilir. Böylece iki açil grubu yağ asiti sentaz üzerinde birbirine çok yaklaşır ve zincir uzama prosesine hazırdır. Yağ asidi sentazın – SH gruplarına kovalent bağlanan Asetil ve Malonil grupları, fosfopantetein –SH grubuna Asetoasetil grubu oluşturacak şekilde kondanse olur. Bunu 3 ketoaçil sentaz katalizler. Bu kondensasyon reaksiyonunun sonucunda 2 ve 3 er karbonlu birimlerden 4 karbonlu bir birim oluşur. Asetoasetil ACP, β ketoaçil redüktaz

katalizörlüğünde D-3 hidroksi bütiril ACP' ye indirgenir. NADPH ise NADP' ye indirgenerek D-3 hidroksibütiril ACP den H₂O çıkartılarak trans Δ^2 bütienoil ACP oluşmaktadır. Bu dehidrasyon olayı sonucu oluşan ana bileşik bir trans Δ^2 enoil ACP' dir. Devir sonunda trans Δ^2 bütienoil ACP enoil ACP redüktaz katalizörlüğünde ve bir NADH harcanması ile bütiril ACP ye indirgendi. Oluşan bütiril grubu Cys-SH grubuna transfer edilir.

Yağ asiti sentezinin 2. devrinde bütiril grubu malonil grubuna kondanse olur ve bir 6 karbonlu β ketoaçil ACP oluşturarak yeni bir devir başlar. Bu uzama safhası 16 karbonlu açil ACP oluşuncaya kadar devam eder. Oluşan Palmitat tiyoesteraz tarafından palmitat ACP ye vermek üzere hidrolizlenir [43]. Oluşan bu bileşim, β ketoaçil ACP sentaz ın, katılımıyla sonraki döngüdeki Stearoyl ACP ye uzatılır. Bitkilerde yağ asit sentazın major ürünü Stearoyl ACP dir [14].

Yağ asit sentaz ürünleri, çoğunlukla C 16, C 18 doymuş açil zincirleridir. Ancak, birçok sebze yağları doymamış yağ asidi çeşidi açısından zengindir (oleat, linoleat gibi) [14]. Tüm yağ asit sentaz bileşenleri, nuklear DNA tarafından kodlanır, fakat bu enzimler, plastid stromasında aktifleşirler [14].

Lipit sentezi için gerekli olan karbonun kaynağı, fotosentez ile sağlanmaktadır. Tohumlarda ve meyvelerdeki yağ birikimi glikolizin terminal evresi olan Asetil CoA yı üreten Piruvat dehidrogenaz / dekarboksilaz (PDH) ile olmaktadır. PDH *de nova* yağ asit sentezinde plastidlerde bulunur. Yağ birikiminde, karbon fotosentez aracılığıyla yaprak dokusundan taşınır [1]. Yağ asit biyosentezindeki Asetil kaynağının karbonhidratlar olduğu buradan anlaşılmaktadır [24].

Yağ Asitlerinin görevleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Membran lipitlerinin yapısal bileşenleridirler.
- Serbest enerjinin korunmasında görev alırlar,
- Çeşitli çevre koşullarında bitki büyümesi ve gelişimini etkileyen sinyal iletim mekanizmalarında görev alırlar,
- Biyosentez mesajcısı olarak görev alırlar [44].

1.14 Yağ Asit Desaturazların Özellikleri Ve Mekanizması

Yağ asit desaturazları yağ açıl zincirindeki 2 karbon atomu arasındaki tekli bağın çift bağına dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir [45, 46]. Oluşan çift bağ, doymamış bağı gösterir, bu reaksiyonlar desaturaz enzimleri tarafından katalizlendi ve bu işlem de desaturasyon işlemi olarak bilindi. Bu reaksiyonlar için, moleküler oksijen ve 2 elektron gereklidir ve aerobik koşullar altında oluşur [46, 47]. Yağ asit desaturazların dağılımı evrensel olmakla birlikte [47] bitki, hayvan, mantarlar arasında çeşitli farklılıklar bulunmaktadır [37, 38]. Enzim çoğu canlılarda bulunmasına rağmen, *Escherichia coli* bakterisinde bulunmamaktadır [48].

cis konfigürasyonundaki desaturasyon işlemi, membran lipitlerinin biyokimyasal karakteristikleri ve fizyolojilerinin değişimi de, *trans* konfigürasyonuna göre daha etkilidir. Biyolojik membranların gliserolipitleri içinde doymamış bağlar daha çok *cis* konfigürasyonundadır [48].

Membran lipitlerinin fiziksel karakteristiklerinin ölçüsü, yağ asit desaturazların aktivitesi ile belirlenir ki, bu desaturazlarda yağ asitleri içindeki çift bağı oluştururlar [49, 50].

Üç tip yağ asit desaturaz vardır: Asetil CoA, Açıl ACP ve Açıl lipit desaturaz [48, 51]. Bitkilerde ve Cyanobakterlerde, lipit bağımlı formda bulunan ve yağ asitlerinin içinde doymamış bağları oluşturan açıl lipit desaturazlar daha çok desaturasyon reaksiyonlarını katalizlerler [50, 52]. Açıl ACP desaturazlar bitki hücrelerinin plastidlerinde bulunurlar ve yağ asitleri içindeki ilk çift bağı oluşturarak ACP ye bağlanırlar [50, 52, 53]. Tüm desaturazlar, her bir proteinin amino asit sekansında güçlü şekilde korunmuş üçlü histidin kümeleri ile karakterize edilir [50]. Bu kümelerin, 2 demirli enzimlerde olduğu gibi, desaturazın aktif alandaki oluşumunda rol aldığı tahmin edilmektedir [54-56].

Desaturaz genlerinin ekspresyonu, çevresel sıcaklık değişimine karşın organizmalarda uyum şartlarının moleküler temelini anlamak açısından bitkilerin bir kısmında Cyanobakterlerde, mayalarda ve poikilothermik hayvanlarda önemlidir [57,

58]. Çeşitli organizmalardan, desaturaz genlerinin klonlansısı, 10 yıldan fazla bir süredir yapılmış olup, bu genlerin ekspresyonu ve uyum koşullarında protein sentezindeki rollerini anlamaya yönelik çalışmalara olanak sağlamıştır [48].

Desaturazlar, bitkilerdeki total doymuş yağ asitlerinin, doymamış yağ asitlerine oranını belirlemede rol alırlar [30, 42, 44, 59]. Kara lahana (*Brassica napus*) ve tütünde (*Nicotiana tobaccum*) yapılan bir çalışmada, Stearoyl ACP desaturazın inaktive edilmesi sonucu, transgenik bitkilerde doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranında azalma görülmüştür [59].

1.15 Stearoyl-Açıl Taşıyıcı Protein Desaturazın (SAD) Özellikleri

Yağ asit metabolizmasında, Asetil CoA dan başlayarak Stearik asit oluşumuna kadar gerçekleşen reaksiyonlardan sorumlu enzimler genel olarak yağ asit sentaz kompleksi içinde yer alırlar. Stearik asit oluşuktan sonra oleik asit oluşumunu katalizleyen desaturaz enzimlerinden ilki SAD dır. Bu çalışmanın konusunu oluşturan Δ^9 Stearoyl ACP desaturaz genin kodladığı, Stearoyl ACP desaturaz enzimi doymuş Stearik asitin desaturasyonu ile oleik asit oluşumunu katalizler.

Stearoyl-ACP desaturaz enzimi, doymuş stearik asitten (18:0 ACP), 9. ve 10. karbon atomları arasında tekli doymamış *cis* bağı oluşturarak oleik asit (18:1 Δ^9 ACP) üretimini katalizleyen, desaturazlar içerisinde tek çözülebilir özelliği olan, plastidsel enzimdir [3, 30, 37, 38, 42, 44, 48, 51, 60-62].

Desaturasyon, döngüsel olmayan fotofosforilasyonunun 2 ürünü ferrodoksin ve moleküler oksijen ile [38] oksidasyon koşulları altında ve kısa elektron taşıyıcı zincirlerini gerektiren bir olaydır. Bir çift bağı oluşması için NADPH ve elektron verici olarak görev yapan Ferrodoksin-NADP⁺ oksiredüktaz gereklidir [38]. Ferrodoksin-NADP oksiredüktaz, flavoprotein olarak görev yapar. Ferrodoksin-NADP oksiredüktaz ile Ferrodoksinin demir sülfür merkezi elektron taşıyıcısıdır. Elektronların kaynağı ışıklı ortamdaki, fotosistem 1' den fotosentetik dokulardan sağlanır [51]. Stearoyl ACP desaturazın çift bağı oluştururken H atomlarına karşılık

gelecek moleküler oksijen dokulardaki, vasküler sistemden difüzyon aracılığıyla sağlanmaktadır [38].

Zeytin desaturaz geni, çiçeklenme seviyesi düşük olsa bile sentezlenmektedir. Meyve büyüklüğü arttıkça, embriyo, endosperm ve mezokarptaki, toplam RNA daki spesifik mRNA desaturaz oranından kaynaklanmaktadır. Zeytinlerin çiçeklenmeden sonraki 11. haftada, embriyolarda mRNA birikimi maksimumdur. Bu birikme zigotik embriyolarda, olgunlaşmaya doğru çiçeklenmeden 22. hafta sonra azalır, hatta desaturaz mRNA sı zorlukla belirlenir. Endospermdeki transkriptlerin birikimi ve desaturaz profili, embriyolardakine benzerlik gösterirken mezokarptaki desaturaz gen ekspresyon profili, embriyo ve endospermdekine göre oldukça farklıdır. Çiçeklenmeden sonraki 13. haftada transkripsiyon başlar ve çiçeklenmeden sonraki 16. haftaya kadar aynı seviyede kalır. Büyüme ilerledikçe, desaturaz transkriptleri, mezokarpta yüksek oranlara ulaşır ve çiçeklenmeden sonraki 28. haftaya kadar aynı kalır. Buradan desaturaz gen ekspresyonunun ve mRNA birikiminin meyvenin 3 farklı dokusunda farklı olduğu anlaşılmaktadır [30].

Yağ asit desaturazları, demir içeren enzimler sınıfında olmasına rağmen, hem kofaktör içine katılmazlar [63]. Çözülebilir SAD proteininin spektroskopik analizi, bu proteinin histidin ve karboksilik asit rezidüleri ile kesilmiş, oksijen ile köprü yapmış, 2 demirli oxoproteinler sınıfına üye olduğunu göstermiştir [64, 65]. Çözülebilir 2 demirli oxoprotein X-ray kristallografisi, 2 demir kümelerinin 2 histidin ve 4 asidik amino asit tarafından kesildiğini göstermiştir [65, 66]. Ayrıca 2 demirli oxoprotein 2 EXXH motifini içerdiği de görülmüştür. Zeytin desaturaz dizisi içinde de bu kopya motiflerde bulunmaktadır. Her iki motiftteki karboksilik amino asitten önce 169. ya da 255. pozisyonlarında ya E (Glutamat) ya da D (Aspartat) rezidüleri bulunur.

DNA Southern Blotting analizi çalışmaları, zeytin genomunda Stearoyl ACP desaturaz geninin 2 kopya halinde bulunduğunu göstermiştir [67]. Bu durum palmye (*Elaies guineensis*) mezokarpındaki Stearoyl ACP desaturaz geninde [68] ve *Brassica napus* ta da görülmüştür [69]. Her ikisinde de gelişimsel ve zamansal olarak düzenlenmekte ve benzer ekspresyon şekli gözlenmektedir [68].

Northern Blot analizi, Kantitatif RT-PCR ve in situ hibridizasyon çalışmaları ile, gelişimsel olarak düzenlenen bir çok gen bulunmuştur. Bunlar repressör / indikatör seviyelerine göre gruplara ayrılmıştır. Bu gruplandırmaya göre $\Delta 9$ Stearoyl ACP desaturaz geni, gelişimsel olarak düzenlenen ve ekspresyonları çok iyi fark edilebilen genler arasında yer almaktadır. Ayrıca $\Delta 9$ Stearoyl ACP desaturaz mRNA birikimi ve zeytin meyvelerinde oleik asit birikimi arasında önemli bir korelasyon olduğu da tespit edilmiştir [3].

Birkaç bitki türünden cDNA' lar yardımıyla $\Delta 9$ Stearoyl ACP desaturaz geni izole edilmiştir. Dejenere primerler kullanarak, zeytin desaturaz geni çoğaltılmış ve cDNA kütüphanesini taramak için merkezi domaini kodlayan 300 bç lik fragment prob olarak kullanılmıştır. Bu cDNA da genç meyve mRNA larından elde edilmiştir. İzole edilen klon tam cDNA nın 1635 bç içerdiğini göstermiştir. Transle olmayan 5' bölgesi 130 nükleotitten, 3' bölgesi ise 640 nükleotitten oluşur. Tekli ORF si 390 amino asitlik öncül polipeptidi kodlar. Bunlardan 363 amino asitlik kısmı olgun polipeptidden oluşmuşken, 27 amino asitlik kısmı ise işlenme alanında transit polipeptiddir. Öncül polipeptidin tahmini moleküler ağırlığı 45 k Da dur ve izoelektrik noktası 6,11 dir [30].

Zeytin amino asiti dizisi ile diğer bitki türlerindeki Stearoyl ACP desaturaz geni benzerliğini tespit etmek amacıyla, Silika analizi yapılmıştır. Buna göre zeytin SAD geni ve diğer bitkilerdeki SAD benzerlikleri aşağıda verilmiştir [30]:

Hintyağı bitkisi	:	% 78,2
Ayçiçeği	:	% 78
Kabak	:	% 77,5
Ispanak	:	% 77,2
Soya	:	% 76,2
Turp	:	% 75,4
Keten	:	%73,7
Pirinç	:	% 73,1

1.16 Stearoyl ACP Desaturaz (SAD) Geni Çalışılan Bitkiler

SAD geni, öneminden dolayı şimdiye kadar bir çok bitkide çalışılmıştır. Stearoyl ACP desaturaz geninin cDNA kütüphanesi [70], kabak, soyafasulyesi [62], ıspanak [71] patates [72], karaturp [42,69], jojoba [73], keten [74] ve pirinç [59, 61] bitkilerinden elde edilmiştir.

Bu genin, bitkiler arasında korunmuşluğuyla ilgili detaylı bilgiler, avokado ve kabak bitkisinde karşılaştırılarak bulunmuştur. Buna göre, SAD amino asit dizisinin diğer tüm nükleotid dizisine göre, % 88 daha fazla korunduğu ortaya çıkmıştır [75]. Aynı şekilde palmye bitkisinde de nükleotit ve amino asit dizileri karşılaştırılmış ve yüksek oranda korunduğu görülmüştür. Buradan, bitki yağ asit sentezinde bu enzimin önemli ve kritik rolü ortaya çıkmaktadır [68].

1.17 Zeytin Çeşitleri

Bu çalışmada, Balıkesir ilinde bulunan, Tarım Köy İşleri Bakanlığı Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu' nun bahçesinde bulunan 6 adet zeytin çeşidi alınmıştır (Şekil 5). Bu zeytinlerin seçilmesinde dikkat edilen nokta; yağlık, sofralık ve yağlık-sofralık olarak değerlendirilebilen zeytinler olmasıdır.

AYVALIK:

DİĞER İSİMLERİ : Ada zeytini, Edremit, Yağlık, Midilli, Şakran.

ANA VATANI : Türkiye

ORİJİNİ : Edremit

COĞRAFİ DAĞILIMI : Çanakkale, Ege bölgesi, Körfez yöresi, İzmir, İçel, Antalya, Adana, Kahramanmaraş, Mardin.

ÖNEMİ : Toplam ağaç sayısının % 19 unu Ege bölgesinin % 25,3 ünü oluşturur. Yağı kimyasal ve duyuşal özellikleri yönünden birinci sırada yer alır. Bölgesinde yağlık olarak değerlendirilir.

AĞAÇ KUVVETİ : Kuvvetli.

MEYVE BÜYÜKLÜĞÜ : Orta.

MEYVE ŞEKLİ : Yuvarlağa yakın, silindirik.

MEYVE ETİ % : % 85,26

ÇEKİRDEK % : % 14,74

PERİYODİSİTE DURUMU : Orta.

DÖLLENME DURUMU : Kendine verimli, fakat Gemlik, Memeli, Erkence zeytinleri baba olarak kullanılabilir.

ÜRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ : Sofralık (çizme) zeytin, zeytin yağı.

ÖZELLİKLERİ : İyi bakılırsa kuvvetli gelişir.

Mekanik hasada uygun yapıya sahiptir.

Soğuğa kısmen dayanıklıdır.

MEMELİ:

DİĞER İSİMLERİ : Emiralem, Ak zeytin, Çekişte.

ANA VATANI : Türkiye

ORİJİNİ : İzmir-Menemen ilçesi.

COĞRAFİ DAĞILIMI : İzmir in Menemen ilçesi, Kemalpaşa, Manisa nın Turgutlu ilçesi.

ÖNEMİ : 80,000 civarında ağaç sayısı bulunmaktadır. Sofralık ve yağlık olarak değerlendirilir. Kalite yönünden, Memecik çeşidinden sonra gelir. Kırma zeytin ve İspanyol usulü işlemeye uygundur.

AĞAÇ KUVVETİ : İyi.

MEYVE BÜYÜKLÜĞÜ : İri.

MEYVE ŞEKLİ : Oval.

MEYVE ETİ % : % 88,57.

ÇEKİRDEK % : % 11,43

PERİYODİSİTE DURUMU : Gösterir.

DÖLLENME DURUMU : Kısmen kendine verimli, Memecik, Ayvalık, Gemlik, İzmir Sofralık, Erkence ile döllenebilir.

ÜRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ : Sofralık (çizme) zeytin, zeytin yağı.

ÖZELLİKLERİ : İyi gelişir,

Verimi iyidir,

Sulanan koşullarda soğuğa karşı duyarlıdır,

Aşı ve çelikle çoğaltılır.

KİRAZ:

DİĞER İSİMLERİ : YOK

ANA VATANI : Türkiye

ORİJİNİ : Manisa'nın Akhisar ilçesi, Yayaköy bucağı.

COĞRAFİ DAĞILIMI : Bilinmiyor.

ÖNEMİ : Daldan ayrılma mekanizması oldukça kuvvetlidir. Meyve pediselleri oldukça uzundur.

AĞAÇ KUVVETİ : Kuvvetli.

MEYVE BÜYÜKLÜĞÜ : İri.

MEYVE ŞEKLİ : Yuvarlak.

MEYVE ETİ % : % 85,76

ÇEKİRDEK % : % 14,24

PERİYODİSİTE DURUMU : Kuvvetli.

DÖLLENME DURUMU : Bilinmemektedir.

ÜRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ : Siyah sofralık.

ÖZELLİKLERİ : Periyodisitesi yüksektir.

USLU:

DİĞER İSİMLERİ : YOK

ANA VATANI : Türkiye

ORİJİNİ : Manisa'nın Akhisar ilçesi

COĞRAFİ DAĞILIMI : Manisa'nın Akhisar ilçesi, Turgutlu, İzmir'in Kemalpaşa ve Selçuk ilçeleri, Muğla Merkez ve Yatağan ilçeleri.

ÖNEMİ : 900,000 civarında ağaç sayısı bulunmaktadır. Toplam ağaç varlığımızın % 1 ini oluşturur. Meyvelerin tam olgunluktaki parlak koyu siyah rengi ve tadı nedeniyle siyah sofralık olarak tercih edilmektedir.

AĞAÇ KUVVETİ : Çok kuvvetli.

MEYVE BÜYÜKLÜĞÜ : Orta.

MEYVE ŞEKLİ : Oval.

MEYVE ETİ % : % 88,17

ÇEKİRDEK % : % 14,83

PERİYODİSİTE DURUMU : Yok.

DÖLLENME DURUMU : Bilinmemekte.

ÜRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ : Siyah sofralık.

ÖZELLİKLERİ : Sulanan koşullarda çok kuvvetli gelişir,
İyi bakım şartlarında düzenli ürün verir,
Soğuğa hassastır,
Hasatta meyve kolay belirlenebilir,
Aşısı ve çelikle çoğaltılır.

MEMECİK:

DİĞER İSİMLERİ : Aşiyel, Gülümbe, Şehir, Taş arası, Yağlık.

ANA VATANI : Türkiye

ORİJİNİ : Muğla.

COĞRAFİ DAĞILIMI : İzmir, Aydın, Manisa, Denizli, Muğla, Sinop, Antalya, Kahramanmaraş, Kastamonu.

ÖNEMİ : Ege bölgesi ağaç varlığının % 50 sinden fazlasını, toplam ağaç varlığının % 45,5 ini oluşturur. Yağlık ve yeşil sofralık olarak değerlendirilir. Kalite yönünden Ayvalık çeşidinden sonra gelir. Çekirdeklerin çimlenme oranı yüksektir.

AĞAÇ KUVVETİ : Kuvvetli.

MEYVE BÜYÜKLÜĞÜ : İri.

MEYVE ŞEKLİ : Oval.

MEYVE ETİ % : % 85,28

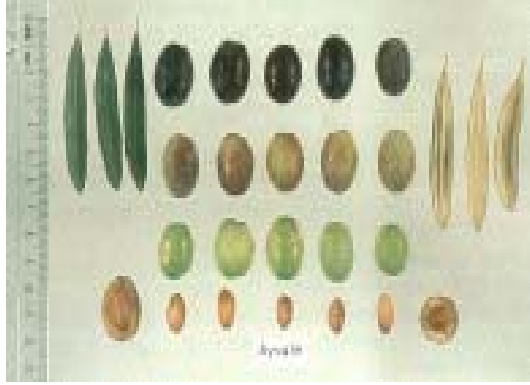
ÇEKİRDEK % : % 11,72

PERİYODİSİTE DURUMU : Kuvvetli.

DÖLLENME DURUMU : Kısmen kendine verimli, Ayvalık, Çakır, Gemlik, Erkence ve Memeli ile döllenebilir.

ÜRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ : Sofralık zeytin, zeytin yağı.

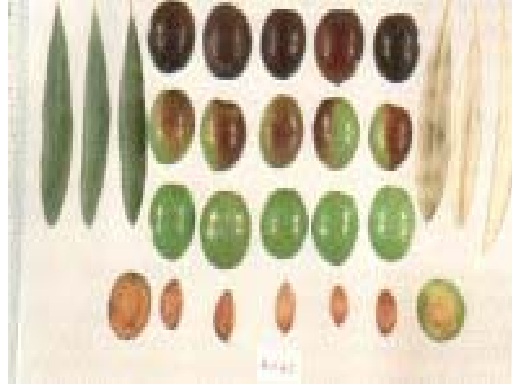
ÖZELLİKLERİ : Soğuğa ve kurağa karşı aşırı duyarlı değildir,
Aşısı ve çelikle çoğaltılır [82, 84].



Ayvalık



Memeli



Kiraz



Uslu



Memecik

Şekil 5. Çalışmada kullanılan zeytin çeşitlerinin tanınmasından kullanılan morfolojik özellikler [82] (Zeytincilik Araştırma Enstitüsünün izniyle kullanılmıştır)

2. ÇALIŞMANIN KAPSAM VE PERSPEKTİFİ

Bu çalışma sofralık ve yağlık zeytinlerde Delta 9 Stearoyl ACP Desaturaz (SAD) geninin moleküler ve fizyolojik analizini kapsamaktadır. Bu amaçla, bu gene ait mRNA seviyelerinin sofralık ve yağlık çeşitler arasındaki karşılaştırılması gelişim aşamalarına bağlı olarak yapılmıştır. Böylece aynı zamanda her çeşidin meyve gelişim aşamalarındaki SAD mRNA seviyelerinin karşılaştırılması da yapılmış olmaktadır. Bunun sonucu olarak gelişim aşamalarından biri olan hasat zamanında hangi çeşidin daha çok mRNA sentezlediği tespit edilmiştir. Çalışmada her gelişim aşamasına ait yağ verimi de tespit edilmiş böylece her gelişim aşaması ve çeşit için mRNA seviyesi ile yağ verimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Son olarak her çeşitten ayrı ayrı elde edilen SAD cDNA' larının (RT-PCR ürünlerinin) ve genomik PCR ürünlerinin restriksiyonu sonucu polimorfizm analizi yapılmış ve polimorfizm ile yağ verimi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

3. MATERYALLER VE METODLAR

3.1 DEPC'li Suyun Hazırlanması

RNA örneklerini nükleazlardan korumak için izolasyonda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında DEPC'li su kullanıldı. DEPC'li suyun hazırlanmasında 0,1 mL DEPC 100 mL suya eklendi. Alt üst edildi. 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra 15 dakika otoklav yapılarak kullanıma hazır getirildi.

3.2 Kullanılan cam malzeme ve plastik malzemelerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler (SDS hariç), cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 C ° de 20 dakika. süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.3 RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için Haralampidis ve arkadaşlarının *Olea europaea* L. cv. Koroneiki zeytininde uyguladıkları [30] metod öncelikle denendi. Bu metoda göre Tablo 7'deki çözeltiler kullanılarak RNA izolasyonu kısaca şu şekilde yapıldı: Sıvı azot içinde toz haline getirilmiş örnekler ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine örnek miktarının 2 katı kadar ekstraksiyon tamponu (0,5 M EDTA, pH: 7,89, % 10'luk SDS, 1 M Tris-HCl, pH: 9) eklenerek alt üst edildi. Örnek hacmi kadar fenol eklendi ve 5 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant temiz ependorf tüpüne alındı. Supernatant miktarı kadar fenol eklendi, 5 dakika 4000 rpm de santrifüj edildi. Supernatant temiz tüpe alındı ve supernatant miktarı kadar fenol/kloroform/izoamil alkol (24:24:1) eklendi. 5 dak. 4000 rpm de santrifüj edildi. Supernatant temiz tüpe alındı. Supernatant miktarı kadar kloroform/ izoamil alkol (24:1) eklendi. 5 dakika 4000 rpm de santrifüj edildi. Supernatant tekrar temiz bir tüpe alındı. Supernatant miktarının 0,1 hacmi kadar NaAc (pH:5,2) eklenip alt üst edildi, supernatant miktarının 2.5 katı kadar saf veya % 95'lik etanol eklendi ve 1-24 saat – 20 C° de presipite edildi. Çökelti (pellet) % 70 lik etanol ile yıkandı. 10 dakika 12.000 rpm de santrifüj edildi. Çökelti 50 µl TE içinde çözüldü.

Tablo 7. RNA izolasyonunda [30] kullanılan çözeltiler ve özellikleri

Solusyonlar	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu	0,5 M EDTA (pH: 7,89) % 10 luk SDS 1 M Tris-HCl (pH: 9)
Sodyum asetat	3M, pH 5.2
DEPC li su	0.1mL DEPC / 100mL su

Ancak bu RNA izolasyon metodu bizim örneklerimizle çalışmadı. Bu nedenle Qiagen firmasına ait RNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 74904) kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı.

3.4 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Dellaporta ve arkadaşları [76] tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Tablo 8’ de listelenen çözeltiler kullanılarak yapılan izolasyon için -80 °C dolabından çıkarılan yaprak örnekleri havanda sıvı azotla toz haline getirildikten sonra ependorf tüpünün yaklaşık 200 µL’lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azot uçar uçmaz 600 µL ekstraksiyon tamponu eklendi. Üzerine 500 µL fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklendikten sonra 5 dakika alt üst edilerek çalkalandı. 12000 rpm’de 5dk santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak % 10 süpernatant hacmi kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra kendi hacmi kadar (1 süpernatant hacmi) oda sıcaklığındaki izopropanol eklendi ve tekrar alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 1 dk 12000 rpm’de çöktürüldü. Oluşan çökelti 500 µL TE (10mM, pH 8) ile çözüldükten sonra üzerine 5 µL RNase A (10mg/mL) eklenerek 30 dakika 37 °C’de inkübe edilerek RNA’ nın uzaklaştırılması sağlandı. Sonra tekrar 55 µL 3M sodyum asetat (pH 5.2), ve 1 mL etanol (%95’lik) eklenerek -20 °C’de yarım saat veya – 80 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek DNA’nın çökmesi sağlandı. Etanol boşaltıldıktan sonra kalan çökelti %70’lik etanolla yıkanarak 12000 rpm’de tekrar santrifüj edildi (2 dakika). Oluşan çökeltiden etanol dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra ependorf tüpü ters çevrilerek etanol kalıntılarının tamamen uçması sağlandıktan sonra genomik DNA çökeltisi 50 µL’lik TE içerisinde çözümlenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Tablo 8. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri

Solusyonlar	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu (1L)	33,6 gr. Üre 0,5 M. EDTA (pH: 8) 1 M. Tris-HCl (pH:8) 5 M. NaCl %10 SDS
Fenol/Kloroform/İzoamil alkol	25 : 24 : 1
NaAc	3 M. pH : 5,2
İzopropil alkol	%100
TE	10mM
Rnaz A	10 mg/ mL
EtOH	% 70 ve % 100 lük

3.5 Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Ve PCR

RT-PCR' ın reverse transkriptaz kısmı RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas katalog no: K1622) kullanılarak yapıldı ve deneyler için kullanma klavuzu takip edildi. Bütün PCR reaksiyonları için standard moleküler biyoloji yöntemleri [77] takip edildi. Bunun için PCR cihazına programlanan çevrim koşulları Tablo 9' da gösterilmiştir. RT-PCR ve PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler yerli aracı şirketler yoluyla Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. PCR reaksiyonları 50 µL' lik toplam hacim içerisinde Tablo 10' daki komponentler belirtilen miktarlarda eklenerek yapıldı. Özellikle genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarının standard koşullarda 1,5 kb lık primerler için çalışmadığı 1 kb'lık primerlerle ise düşük verimle çalıştığı tespit edildi. DMSO (dimetil sülfoksit) eklenmesi ve genomik DNA örneklerinin 95 C ° de 10 dakika inkübe edildikten sonra kullanılmasının verimi artırdığı gözlemlendi.

Tablo 9. PCR Döngü Koşulları

Ön ısıtma	94 C °	5 dak.	1 devir
1. basamak	94 C °	45 sn.	35 devir
2. basamak	50 C °	45 sn.	
3. basamak	72 C °	2 dak.	
4. basamak	72 C °	10 dak.	1 devir
5. basamak	4 C °	25 saat	

Tablo 10. PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları

Tampon	5 µL	10 X
MgCl ₂	3 µL	25 mM
dNTP	5 µL	2,5 mM (her biri)
Primer L	5 µL	41,4 pmol/µL
Primer R	5 µL	39,4 pmol/µL
DMSO	2 µL	-
gDNA	1 µL	-
Tag polimeraz	0,5 µL	5 unit
Distile su	23,5 µL	-

3.6 Primerlerin Sulandırılması

Primerler laboratuvara gelir gelmez veya – 20 dolabından çıkartıldıktan sonra yaklaşık 15 sn. 12000 rpm de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı. 1 mL TE eklenerek 2 dak. alt-üst edildikten sonra 15 sn. vorteks yapılarak sulandırıldı ve kullanılmaya hazır hale getirildi. 1 mL TE içinde sulandırılmış primerlerinden 200 µL'lik 5µM'lık çalışma solusyonları Tablo 11' de gösterilen konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı, Tablo 12' de RT-PCR ve PCR'da kullanılan primerler ve T_m değerleri görülmektedir. PCR reaksiyonunda kullanmak için, 50 µL'de 0,5 µM olacak şekilde hazırlandı ve son hacmi 50 µL olan PCR reaksiyonu için 2,5 µL primer eklendi.

Tablo 11. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları

Primer	Molaritesi	Çalışma solusyonu
1500 bç lik L primeri	40,9 μ M	25 μ L primer + 175 μ L TE
1500 bç lik R primeri	28 μ M	36 μ L primer + 164 μ L TE
1000 bç lik L primeri	41,4 μ M	24 μ L primer + 176 μ L TE
1000 bç lik R primeri	39,4 μ M	25 μ L primer + 175 μ L TE

Tablo 12. RT-PCR ve PCR’da kullanılan primerler ve Tm değerleri

Primerler	Nükleotit dizileri (5’- 3’)	Tm
SACPd 1500-L	CAA ATT TGA TTA TTG TTT TCA TTC	54,3 C°
SACPd 1500-R	ACT TTT ATA CTC GTA AGC GAG TTG	58,9 C°
SAD1kb-L	CCC ATT CCT TAG CAC CAG AA	57,3 C°
SAD1kb-R	TTT CTC GAC CGA AAA TCC AG	55,3 C°

3.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen Atto marka (Tokyo, Japonya) elektforez sistemi kullanıldı. Agaroz Appllichem firmasından, TBE için gerekli olan Tris-bazı Sigma firmasından, Borik Asit Carlo Erba firmasından, temin edildi. Bu çözeltiler ve kompozisyonları Tablo 13’ de verilmiştir. Zeytinden izole edilen gDNA ve RNA ları gözlemek için % 0,8 lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0,4 gr. agaroz tartıldı ve 50 mL. 0,5 x TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım soğutularak, içerisine 2 μ L EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek, önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çekilerek çıkartıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektforez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar 0,5 X TBE tamponu ile dolduruldu. gDNA örnekleri için 5 μ L dH₂O, 5 μ L gDNA ve 3 μ L yükleme boyası bir tüpte karıştırıldı ve yükleme kuyucuklarına pipet yardımıyla yükleme yapıldı. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli olan bir DNA standardı yüklendi (markır). Örnekler 120 V voltaj verilerek yaklaşık 45 dakika yürütüldü. DNA bantları, UV

transillüminatörde gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi. RNA örnekleri için 5 µL RNA kalıbı veya PCR ürünü, 2 µL yükleme boyası eklenerek jele yüklendi.

Tablo 13. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve özellikleri

Çözelti	Kompozisyonu (1L için)
TBE (5 X)	54 gr. Tris-base 27,5 gr. Borik Asit 20 ml. 0,5 M EDTA (pH:8)
Yükleme boyası	GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0313)

3.8 Bitki Materyali

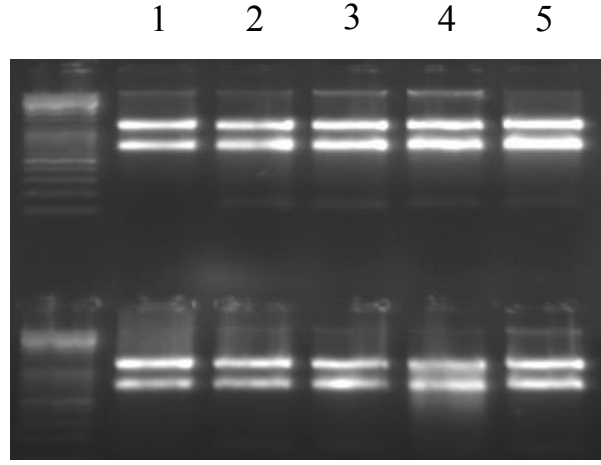
Bu çalışmanın materyalini oluşturan, zeytin (*Olea europaea* L.), meyve ve yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edilmiştir. Bu çalışmada, 5 farklı zeytin meyve çeşidi ve yaprağı RNA ve DNA izole etmek üzere kuru buz içinde bölgeden getirilip, ekstraksiyon yapılabildiği kadar – 80 C° dolabında muhafaza edilmiştir. Kullanılan zeytin çeşitleri ve örnek toplama takvimi Tablo 14' de verilmiştir.

Tablo 14. Kullanılan zeytin çeşitleri ve takip edilen örnek toplama takvimi

Zeytin çeşitleri	İlk toplama tarihi	Son toplama tarihi
Ayvalık	13.07.2005	17.11.2005
Memeli	13.07.2005	17.11.2005
Kiraz	13.07.2005	17.11.2005
Uslu	13.07.2005	17.11.2005
Memecik	13.07.2005	17.11.2005

3.9 RNA Eşit Yükleme

RT-PCR’da farklı örneklerden alınan toplam RNA miktarının eşit olduğundan emin olmak için, spektrofotometrede ölçülen RNA miktarlarına göre 1000 ng RNA % 0,9 luk agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, UVP monitörde görüntülendi. Şekil 6 ’ da görüldüğü gibi jel görüntüsü spektrofotometrik ölçüm değerlerinin doğru olduğunu teyit etmektedir Her çeşitten 1000 ng RNA yüklemek için gerekli hacim μ L olarak Tablo 15’ de görülmektedir.



Şekil 6. RNA eşit yüklemesi. 1. Ayvalık, 2. Memeli, 3. Kiraz, 4. Uslu, 5. Memecik

Tablo 15. RNA eşit yükleme hesaplaması için her çeşit ve örneklemeden 1000 ng'a karşılık gelen miktar.

Çeşitler	Aylar	RNA miktarı (1000ng)
Ayvalık	Temmuz	5 µL
	Kasım	8,44 µL
Memeli	Temmuz	1,76 µL
	Kasım	6,51 µL
Kiraz	Temmuz	2,17 µL
	Kasım	4,05 µL
Uslu	Temmuz	1,70 µL
	Kasım	5,29 µL
Memecik	Temmuz	2,28 µL
	Kasım	2,38 µL

Bu sonuçların güvenilirliğinden emin olmak için aynı örnekler yaklaşık olarak 4 defa tekrar edilmiştir. Ayrıca RT-PCR da 1,5 kb'lık (ürün oluşturan) primerlerin yanı sıra 1 kb lık (ürün oluşturan) primerler de denenmiştir.

3.10 Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

Çeşitler arasındaki SAD polimorfizmini tespit etmek için genin dizisi içinde kesim bölgeleri bulunan 4 restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Bu enzimler açısından Stearoyl ACP desaturazın restriksiyon haritası Şekil 7' de, bu enzimlerin kesim bölgeleri ve tanıma dizileri ise Tablo 16'da verilmiştir. Genomik DNA'nın ve cDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla elde edilen PCR ürünleri belirtilen restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesime tabi tutuldu. Bunun için restriksiyon enzimlerinin SAD cDNA'sındaki her kesimi başına 1 µg DNA olacak şekilde kalıp DNA eklendi. Restriksiyon enzim miktarı ise her µg başına 1 ünite enzim olacak şekilde eklendi. Her enzimin kendi tamponu eklendikten sonra reaksiyon mümkün olan en az hacimde olacak şekilde gerektiğinde su ilave edildi. 37 C° de 2 saat

inkübe edildikten sonra % 0.9- % 1.2'lik agaroz jelde koşturularak sonuçlar UV monitörde fotoğraflandı .

```
1      acaaattttc tgattattgt tttcattcaa taatttgaga agaaatggca ctgaaacttt
61     gctttccacc ccacaagatg ccttccttcc cccgatgctcg tatcagatct cacagggttt
121    tcatggcttc aactattcat tctccttcta tggaggctcg aaaagttaaa aagcctttca
181    cgctccacg agaggtacat gttcaagtaa cccattcctt agcaccagaa aagcgcgaga
241    tttttaattc tctgaacaat tgggcccaag agaatatctt ggtgctccta aaggatgctg
301    ataaatgctg gcaaccaagt gactttctac ccgactcagc ttctgaaggc tttgacgagc
361    aggtcatgga gctacgtaaa agatgcaagg aaattcctga tgattatttc attgtcttgg
421    ttggagatat gattacagag gaagcacttc ccacttacca gacgatgctt aacaccctag
481    atggagtctg agacgagacg ggtgctagcc ttactccttg ggctatttgg actagagcat
541    ggactgctga agagaatagg catgggtgacc ttctgaacaa atatctttat ctttctggac
601    gggttgacat gaagcaaat gaaaagacaa ttcaatacct aatcggttcc gggatggatc
661    ctcgtagcga aaacaatccc tacctgggat ttatctacac ttcattccag gagagggcaa
721    ctttcatttc tcatggaaac acggctaggc ttgccaagga acacggggac ctgaaattgg
781    ctcagatatg cggatcatt gctgcagatg agaagcgcca tgaactgctg tataccaaaa
841    ttgtgaaaa gctattcgag attgacctg atggcactgt gttggcactt gccgacatga
901    tgaggaagaa agtctctatg ccagctcatc tgatgtacga tggccaggac gataatctct
961    ttgagaactt ctcttctgta gcacagcggc taggggtcta tactgccaag gactatgccg
1021   atattttgga atttttggtc ggaaggtggg atattgagaa gttgacaggt ctttctggag
1081   aggggcgtaa agcacaagat tacgtgtgca ctttgctcctc tagaatccga aggttggagg
1141   agcgagcaca atcaagggtc aagaaagcat cggccacccc cttcagctgg attttcggtc
1201   gagaaatcaa tctatgaacg ctgcaactgaa cgtagggact cttctagcag cttttgataa
1261   gcaaatatat aaggtcggtc tgtcgccatc tggctctgtat caagaaatgt gttaaaaata
1321   aacataaaat tgttccagtg gtatatcttct cgttccttta tttgtttagt tttgatcaga
1381   tatgacagac gaataattcg agtcgagtga ggagacgatt tcttctgca atctttgttt
1441   tctttatcaa ctcgcttacg agtattataa aagtagaatc ttgtgcttgt tta
```

Şekil 7. Stearoyl ACP desaturaz cDNA'sının (*Olea europaea* L. cv. Koroneiki'ye ait) Msp I (koyu), BsuR I (kutu içine alınmış), Alu I (altı çizili) ve Hinf I (gri) restriksiyon haritası.

Tablo 16. Restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri ve tanıdığı diziler

Enzim	Kesim bölgesi	Tanıdığı dizi
Msp I	649	CCGG
BsuR I	264, 943, 1173	GGCC
Alu I	339, 371, 851, 924, 1186	AGCT
Hinf I	333, 1123, 1237, 1400, 1476	GANTC

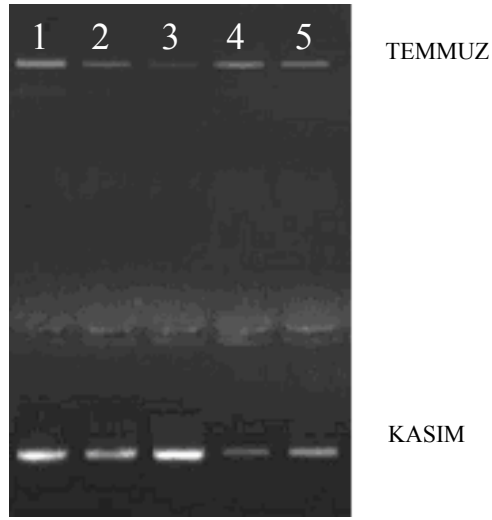
3.11 Yağ Çıkarma Deneyleri

Stearoyl ACP desaturaz geninin kodladığı enzimin katalizlemesiyle oluşan oleik asit zeytin yağının ana bileşenidir. Dolayısıyla bu genin ekspresyon seviyesi ile zeytin yağ verimi arasında bir korelasyon beklemek mantıklı görünmektedir. Bu amaçla RNA izolasyonu yapılan örneklerden aynı zamanda yağ da izole edildi. Bunun için her çeşit ve örneklemeden yaklaşık 10 g zeytin alınarak hem Soxhlet cihazında hemde hekzan içinde bekletme yöntemi ile ayrı ayrı yağ çıkarıldı. Bu denemenin sonucunda aynı örnek için Soxhlet cihazından % 5 verim, hekzan içinde beklettiğimizde ise % 4,5 verim elde edildi. İki yöntem arasında bariz bir fark olmadığı için daha pratik olan hekzan içinde bekletme yöntemi ile yağ çıkarma işleminin geri kalan kısmı tamamlandı..Bunun için 10 gr. zeytin 40 ml. Hekzan içerisinde 2 günde bir süzülme koşuluyla 2 hafta boyunca ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra çözelti süzülerek, çökelekten ayrıştırıldı. Çözeltinin çözücüsü evaporatör (Heidolph VV2011) ile uçurulduktan sonra, yağ elde edildi ve tartılarak miktarı belirlendi

4. BULGULAR

4.1 RT-PCR Sonuçları

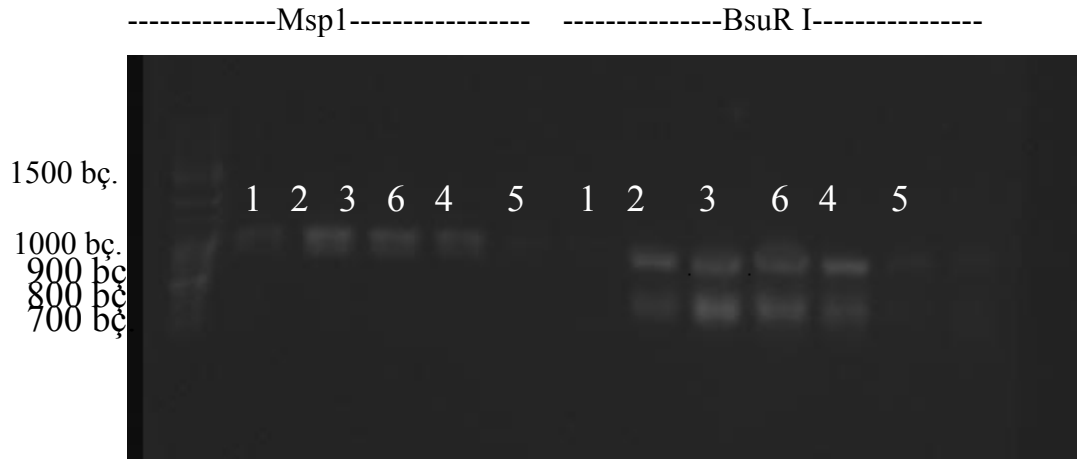
RNA eşit yüklemesiyle hesaplanan kalıp miktarına göre yapılan RT-PCR sonucunda SAD geninin aylar arasında ve çeşitler arasındaki ekspresyon farkı Şekil 8 'de görüldüğü gibi tespit edilmiştir.



Şekil 8. 1,5 kb lik.primeryerler ile yapılmış RT-PCR sonuçları

4.2 Restriksiyon Sonuçları

1,5 kb lik primeryerlerle ęoęaltılan cDNA rneryerleri Msp I, BsuR I, Hinf I ve Alu I enzimeryerleri ile kesilmiştir (Şekil 9, 10, 11, 12).

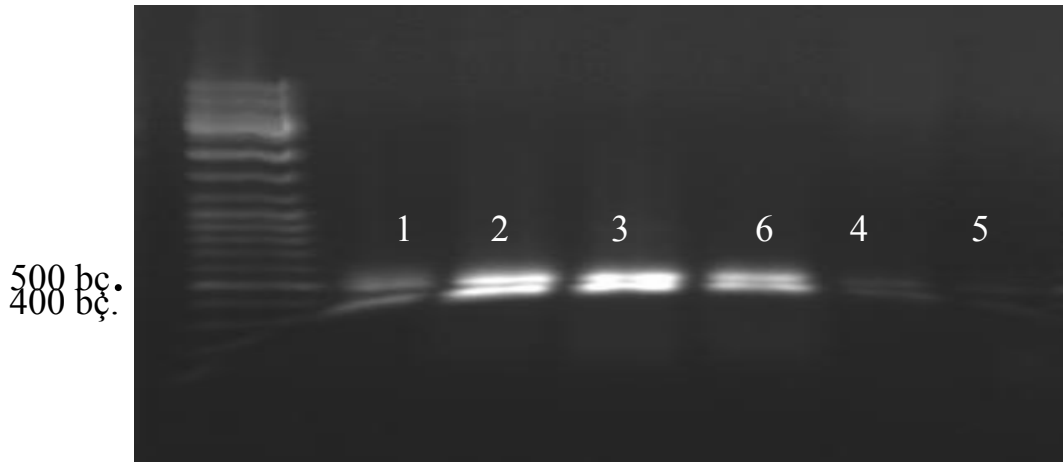


Şekil 9. Msp I ve BsuR I enzimeryerleri ile kesilmiş cDNA rneryerleri

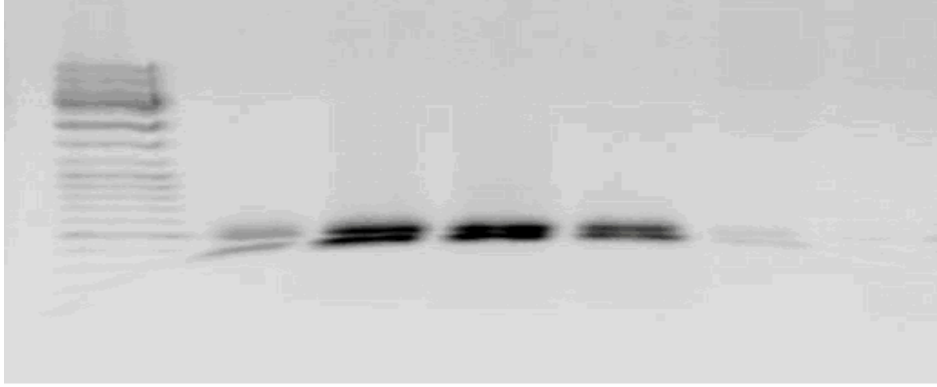


Şekil 10. Msp I ve BsuR I enzimleri ile kesilmiş cDNA örneklerinin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü.

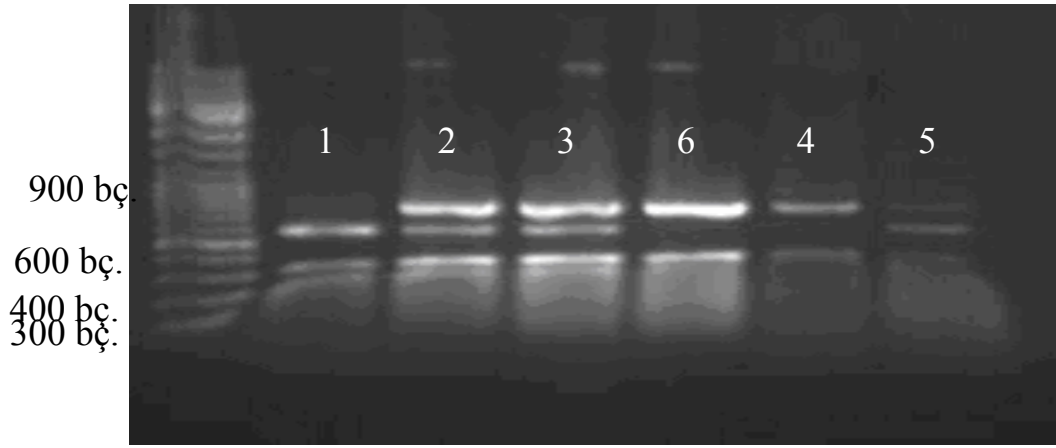
NOT: Elektroforez görüntüleri çok net olmadığından, bantların daha iyi görülmesi için renklerin ters çevrilmiş görüntüleride verilmiştir.



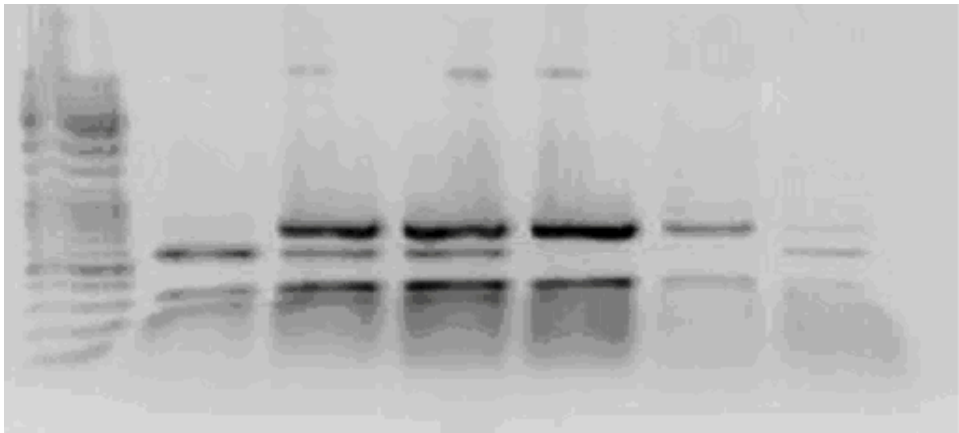
Şekil 11. AluI enzimi ile kesilmiş örnekler



Şekil 12. Alu I enzimi ile kesilmiş örneklerinin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü



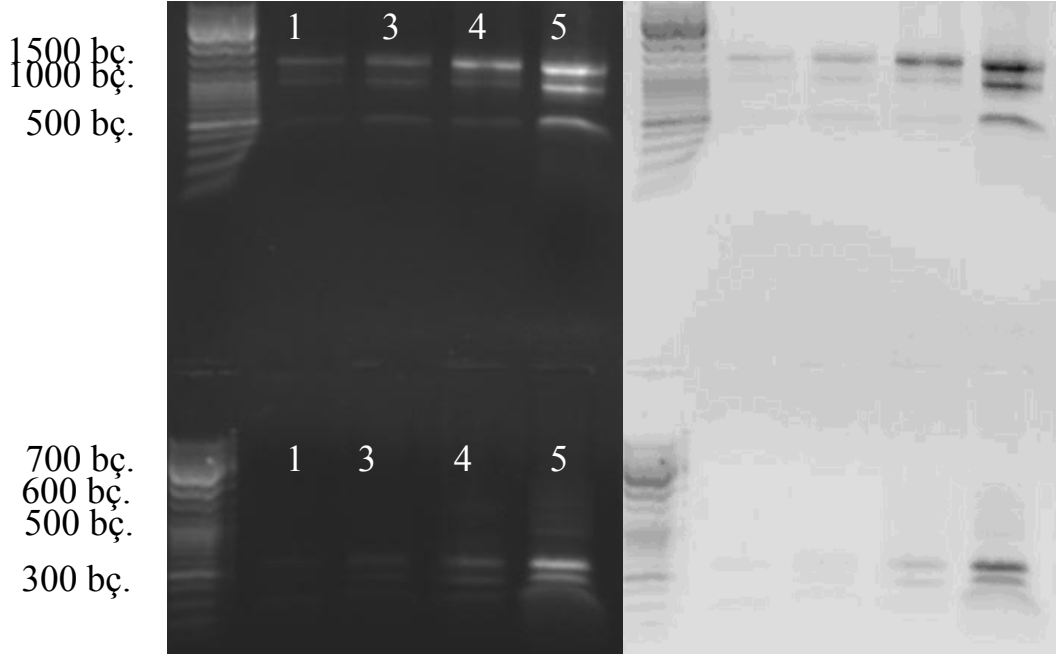
Şekil 13. Hinf I enzimi ile kesilmiş cDNA örnekleri



Şekil 14. Hinf I enzimi ile kesilmiş örneklerin renklerinin ters çevrilmiş görüntüsü.

4.3 DNA Örnekleri İle Yapılmış Restriksiyon Sonuçları

Şekil 15 genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesildiği sonuçları göstermektedir.



Şekil 15. MspI ve Hinf I enzimleri ile kesilmiş örneklerin ve ters çevrilmiş görüntüsü.

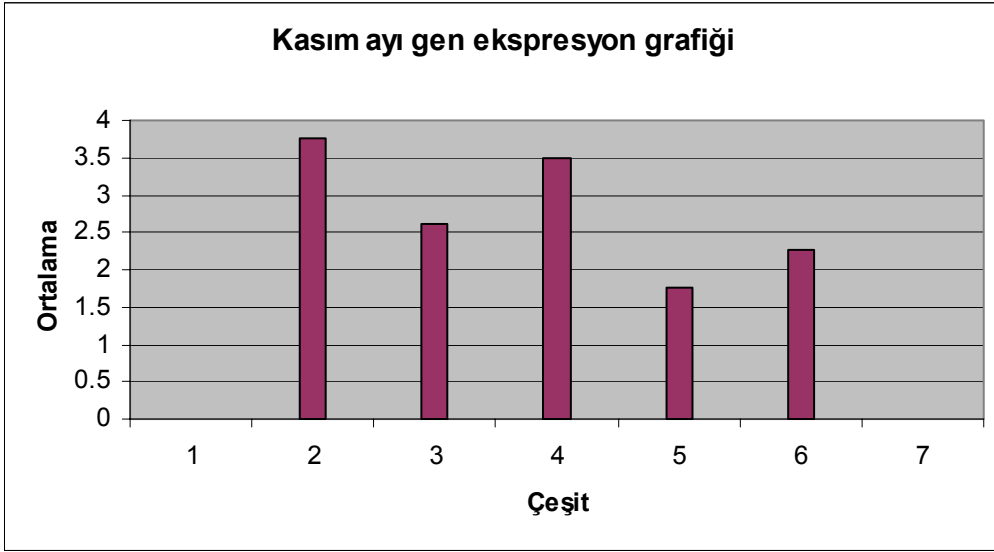
4.4 Verilerin Değerlendirilmesi

RT-PCR sonuçlarının analizinden, restriksiyon enzimleri ile elde edilen polimorfizm analizi sonuçları, çekilen fotoğraflar üzerinden yapılmıştır. Yağ çıkarma deneyi sonuçları ile yağ verimi elde edilmiştir.

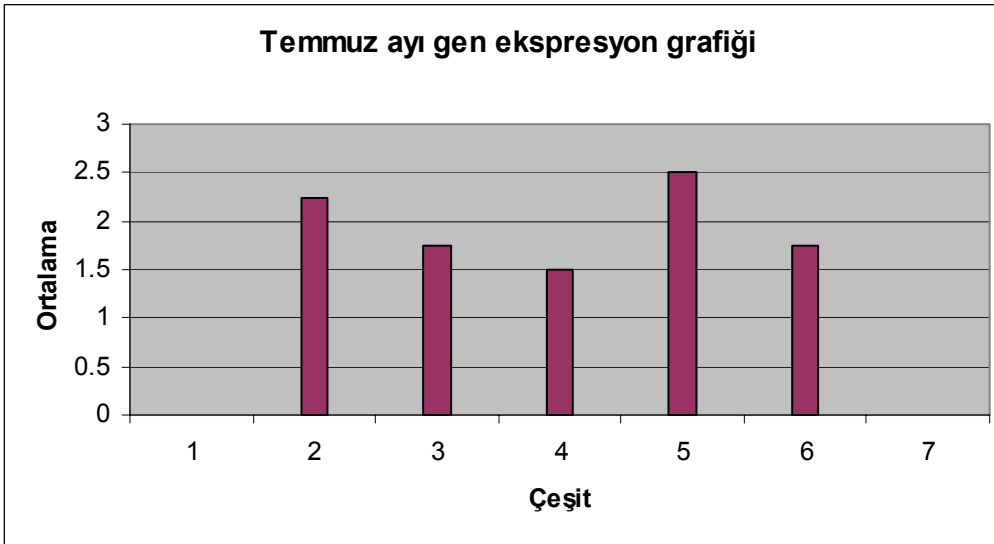
Ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında, Agaroz jel elektroforezinde ki bantların parlaklığı dikkate alınmıştır. Buna göre, parlak olan bantlarda, ekspresyon seviyesi yüksek, az parlak olmayan bantlarda ise ekspresyonun az olduğu sonucuna varılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi sonucu çeşitlerin gösterdiği ekspresyon seviyesi bantlarının parlaklığından yararlanılarak bir oran belirlenmiş ve bu verilerden yararlanılarak Temmuz ve Kasım ayları gen ekspresyon grafikleri Şekil 16 ve 17de görüldüğü gibi elde edilmiştir.

Şekil 16. Temmuz ayı gen ekspresyon analizi



Şekil 17. Kasım ayı gen ekspresyon analizi



4.5 Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları

Dört farklı restriksiyon enzimi ile kesilen RNA örneklerinin ve 2 farklı restriksiyon enzimi ile kesilen DNA örneklerinin kesim sonuçları ile ilgili bilgi aşağıdaki tablolarda (17, 18, 19, 20, 21, 22) verilmiştir.

Tablo 17. Msp I enzimi kesim sonuçları

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	Msp1	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.
Memeli	Msp I	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.
Kiraz	Msp I	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.
Uslu	Msp I	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.
Memecik	Msp I	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.
Çakır	Msp I	3 bant	1500 bç. 800 bç. 700bç.

Tablo 18. BsuRI enzimi kesim sonuçları

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.
Memeli	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.
Kiraz	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.
Uslu	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.
Memecik	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.
Çakır	BsuR I	4 bant	1000 bç 900 bç. 800 bç. 700bç.

Tablo 19. Alu I enzimi kesim sonuçları;

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.
Memeli	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.
Kiraz	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.
Uslu	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.
Memecik	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.
Çakır	Alu I	2 bant	500 bç. 400 bç.

Tablo 20. Hinf I enzimi kesim sonuçları

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	Hinf I	3 bant	600 bç. 400-300 bç. 300 bç.
Memeli	Hinf I	4 bant	900 bç. 600 bç. 400-300 bç. 300 bç.
Kiraz	Hinf I	4 bant	900 bç. 600 bç. 400-300 bç. 300 bç.
Uslu	Hinf I	2 bant	900 bç. 400 bç.
Memecik	Hinf I	3 bant	900 bç. 400-300 bç. 300 bç.
Çakır	Hinf I	3 bant	900 bç. 400 bç.

Tablo 21. Msp I enzimi kesim sonuçları (DNA)

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	Msp I	3 bant	1500 bç. 1000 bç. 500 bç.
Kiraz	Msp I	3 bant	1500 bç. 1000 bç. 500 bç.
Uslu	Msp I	3 bant	1500 bç. 1000 bç. 500 bç.
Memecik	Msp I	3 bant	1500 bç. 1000 bç. 500 bç.

Tablo 22. Hinf I enzimi kesim sonuçları (DNA)

Örnek	Enzim	Bant sayısı	Bantların büyüklüğü
Ayvalık	Hinf I	2 bant	600 bç. 300 bç.
Kiraz	Hinf I	3 bant	700-600 bç. 500 bç. 300 bç.
Uslu	Hinf I	5 bant	1000 bç. 800 bç. 700-600 bç. 500 bç. 300 bç.
Memecik	Hinf I	8 bant	1500 bç. 1200 bç. 1000 bç. 900 bç. 800 bç. 700-600 bç 500 bç. 300 bç.

4.6 Yağ Çıkarma Deneylerinin Verileri

Yağ verimi tespiti için; 1. ve 5. aylarda elde edilen yağ miktarları arasında belli bir oran hesaplaması yapılarak, verim hesaplaması yapılmıştır.

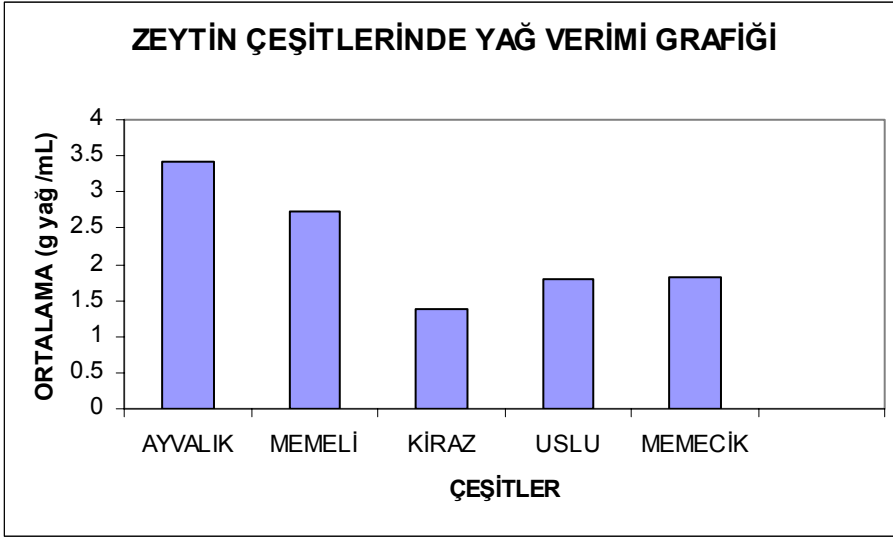
$$\text{Verim} : \frac{\text{Yağ miktarı} \times 100}{\text{Zeytinin tane ağırlığı}}$$

Olacak şekil de verim hesaplanarak aşağıdaki Tablo elde edilmiştir

Tablo 23. Yağ verimin aylara göre oranı

Çeşit	Temmuz ayı	Kasım ayı	Artış oranı
Ayvalık	% 0,82	% 5,7	7 kat
Memeli	% 0,85	% 4,6	5,4 kat
Kıra	% 0,78	% 2,0	2,56 kat
Uslu	% 0,96	% 2,6	2,7 kat
Memecik	% 0,83	% 2,8	3,3 kat

Tüm bu veriler bir grafiğe aktarıldığında Şekil 18 deki grafik elde edilmektedir.



Şekil 18. Zeytin çeşitlerinde yağ verimi grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Gen Ekspresyonu ve Yağ Verimi Sonuçları

Türkiye, zeytin yetiştiriciliği bakımından önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Yağlık zeytin üretiminde dünya genelinde 4. sıradadır. Ülkemizde yetiştiricilik genel olarak, beş bölgede yapılmaktadır. Bu bölgelerden Marmara ve Ege bölgeleri üretimin büyük bir kısmını karşılamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan zeytin örnekleri Marmara ve Ege bölgelerine aittir.

Zeytinyağı, zeytin meyvelerinden hiçbir kimyasal madde karıştırılmadan, meyvenin etli kısmından elde edilir. Zeytin yağı bileşiminin % 80-85' lik kısmını oluşturan oleik asit, zeytin yağının kalitesini belirlemede kullanılan önemli parametrelerdendir [2]. Doymuş stearik asitten (18:0), tekli doymamış oleik asit (18:1) üretimini katalizleyen, plastidsel ve çözünebilir enzim Stearoyl ACP desaturazdır (SAD).

$\Delta 9$ -SAD geni, zeytin çeşitlerinden sadece *Olea europaea* L. cv. Koroneiki' de çok ayrıntılı çalışılmış olmakla birlikte diğer çeşitlerde çok yaygın çalışılmamıştır. $\Delta 9$ -SAD geni, doymamış yağ asitlerinin, doymuş yağ asitlerine oranını belirlemede de kullanılmaktadır. Bu yüzden bu gen üzerine farklı bitkilerde de bir çok çalışma yapılmıştır.

Canlılar arasında, bulunan desaturazlardan, çözünebilir özelliğe sahip olan tek desaturaz enzimi SAD' dır. Hayvanlarda, mantarlarda ve insanlarda bulunan desaturazlar, integral membran proteinleridir. Çözülebilir SAD enzimi ise plastidlerin stromasında lokalize olur.

Çözülebilir plastidsel enzim olan SAD, Stearik asitin 9. ve 10. karbon atomları arasında ferrodoksini ve moleküler oksijeni kullanarak, *cis* konfigürasyonunda tekli doymamış bağı oluştururlar. Oluşan çift bağ stearik asitin, yüksek erime sıcaklığını düşürdüğü için, zeytin yağı oda sıcaklığında sıvıdır.

Hatzopoulos ve arkadaşları, *Olea europaea* L. cv. Koroneiki zeytininde yaptıkları çalışmada, SAD genin gelişimsel olarak düzenlendiğini, farklı dokularda farklı ekspresyon profili gösterdiğini, ve yağ verimi ile korelasyon içinde olduğunu tespit etmişlerdir [30]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da beklendiği gibi bu doğrultudadır. Ancak bu çalışmada sadece tek bir zeytin çeşidi değil beş ayrı çeşitte ekspresyon analizi yapılmış böylece gelişimsel ekspresyon farklarına ilaveten çeşitler arası farklar da tespit edilmiştir.

Zeytin meyvesinin gelişim aşamalarına baktığımızda, genel olarak, çimlenmeden sonra beş aşamada gözlenmektedir. Olgunlaşmanın ilk aşaması temmuz ayına denk gelmektedir. Son aşaması ise Kasım-Aralık aylarına denk gelmektedir.

Zeytin gelişiminin ilk aylarında, mezokarp dokusundaki SAD genin ekspresyon seviyesi, Ayvalık, Memeli, Kiraz,Uslu, Memecik zeytin çeşitlerinde tespit edilmiştir.

Ayvalık, Memecik, Memeli zeytin çeşitleri, yağlık olarak değerlendirilmektedir. Uslu sofralık olarak değerlendirilirken, Kiraz zeytini hem sofralık, hem yağlık olarak değerlendirilmektedir. Elde ettiğimiz gen ekspresyonu sonuçları yağlık çeşitlerde daha çok mRNA ekspresyonu olduğunu, yağ veriminin de bununla paralel olduğunu göstermiştir ki bu da çeşitlerin sofralık ve yağlık olarak ayrılmış olmasıyla paralellik göstermektedir. Aslında Ayvalık ve diğer zeytinlerde sofralık olarak değerlendirilebilir, ancak yağ verimi daha iyi olduğu için yağ amaçlı kullanımı tercih edilmektedir.

Yağlık zeytinlerde, SAD genini ekspresyon seviyesinde olgunlaşmaya paralel bir artış beklenirken, aynı zamanda yağ veriminde de paralel bir artış söz konusudur. Alınan sonuçlara göre; Ayvalık zeytin çeşidinde, Temmuz ve Kasım ayları arasında ekspresyon farkı ile yağ verimi arasında bir ilişki bulunmaktadır. Memeli zeytin çeşidinde de aynı şekilde, Temmuz ve Kasım ayları arasında ekspresyon farkı ile yağ verimi arasında bir orantı bulunmaktadır. Kiraz zeytin çeşidinde, Temmuz ayında ekspresyon az iken, Kasım ayında SAD ekspresyonu maksimum olmuştur. Ancak

ekspresyondaki bu artış yağ verimi ile paralel değildir. Bunun sebebi yağ eldesi sırasında kaynaklanan bir hata olabilir. Ancak cDNA örneklerinde 1 kb'lık primerler ile yaptığımız PCR sonuçları ile yağ verimi sonuçları birbirini doğrulamaktadır. Uslu zeytin çeşidinde, Temmuz ve Kasım ayları arasındaki ekspresyon seviyesi açısından farklılık bulunmamaktadır. Buradan Uslu zeytin çeşidinin sofralık için uygun olduğu yağ için kullanılamayacağı yorumu yapılabilir. Yağ verimi ile de paralellik vardır. Memecik zeytin çeşidinde; Temmuz ve Kasım ayları arasındaki ekspresyon farkı, diğer yağlık zeytinlere benzemektedir. Temmuz ayında ekspresyon az iken, Kasım ayında ekspresyon artmaktadır ve yağ artışı ile de orantılıdır.

Tüm bu sonuçlara göre 5 çeşit içinde en iyi yağlık olarak Ayvalık çeşidi belirlenmiştir ki bu çeşidin zaten çoğunlukla bu amaç için üretiliyor olması da bu sonucu doğrulamaktadır.

SAD geninin ekspresyon analizinin, çeşitler arası ve gelişimsel olarak tespiti, zeytinlerin yağlık ve sofralık olarak değerlendirilmesi açısından önemlidir. SAD geninin ekspresyonun çok olduğu zeytinler ticari olarak da yağlık amaçlı kullanılmaktadır.

5.2 Restriksiyon Analizi Sonuçları

Zeytin çeşitleri arasındaki, ekspresyon farkı ve yağ verimi arasındaki verimin karşılaştırılmasının yanı sıra, türler arası SAD geni polimorfizmi de tespit edildi. Bu amaç doğrultusunda, ekspresyon ve yağ verimi analizi için mevcut çeşitlere ilave olarak 1 tane daha yağlık çeşit (Çakır) eklendi.

Olea europaea L. cv. Koroneiki cDNA'sına göre belirlenmiş, enzim kesim bölgelerini içeren 4 enzim kullanıldı.. Bu enzimlerin kesim bölgeleri Şekil 7 ve Tablo 16'da verilmiştir.

Haralampidis ve arkadaşları [78] Southern Blotting Analizi ile *Olea europaea* L. cv. Koroneiki zeytin çeşidinde SAD geninin 2 kopya olduğunu tespit etmişlerdir. MspI enzimi ile cDNA'dan elde edilen intronsuz DNA örnekleri ile kesildiğinde 2

kopyalı olduğu Türkiye' de yetişen zeytin çeşitlerinde de tespit edilmiştir. MspI enzimi 1 bölgeden kesmesine rağmen; restriksiyon sonuçlarına göre 1500 bç'lik (kesilmemiş) bir bant, ve 800 bç'lik ile 700 bç'lik 2 bant elde edilmiştir. Buradan, birinci kopyada MspI enzim kesim bölgesi bulunmadığı ikinci kopyasında ise bir kesim bölgesi olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Tüm rneklerde, Alu I ve BsuR I enzimleri ile kesildiğinde, polimorfizm gözlenmemiştir.

Hinf I enzimi ile kestiğimizde 6 örnekten polimorfizm tespit edilmiştir. Kesim bölgelerine bakıldığında; Ayvalık zeytin çeşidinde, 3 bant elde edilmiştir ve polimorfizm vardır. Memeli zeytin çeşidinde, 4 bant elde edilmiştir ve polimorfizm vardır. Kiraz zeytin çeşidinde, 4 bant elde edilmiştir ve polimorfizm vardır. Uslu zeytin çeşidinde, 2 bant elde edilmiştir ve polimorfizm vardır. Memecik zeytin çeşidinde, 3 bant elde edilmiştir ve polimorfizm vardır.

Çeşitler arasında tespit edilen restriksiyon polimorfizmine göre; Memeli ve Kiraz zeytinleri yakın grupta yer almaktadır. Hepsinde ortak olan yaklaşık 350 bç'lik bir bant bulunmaktadır.

Genomik DNA rnekleri, MspI ve HinfI enzimleri ile kesildiğinde MspI enzimi ile SAD geninin iki kopyalı olduğu ve bu genin bir kopyası Msp I enzimi kesim bölgesi içermesine karşın diğerinin içermediği ve RT-PCR sonuçlarından elde edilen sonuçlara paralellik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Hinf I enzimi ile yapılan restriksiyon analizinde de polimorfizm teyid edilmiştir.

Bu alışma zeytin SAD geninin iki kopyasını birbirinden ayırmak için uygun bir kriter (Msp I restriksiyon analizi) geliştirdiği gibi, ayrıca bu genin çeşitler arasındaki polimorfik bölgelerinden birini de (Hinf I kesim bölgesi) ortaya çıkarmıştır. Devam eden çalışmalarda diğer çeşitler bu polimorfizm açısından analiz edilecek ve bu polimorfizmin enzim aktivitesi ile korelasyonu araştırılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Sanchez, J., "Lipid Photosynthesis in Olive Fruit", *Prog.Lipid.Res.*, **33**: 97-104 (1994).
- [2] Vergara, P.d., "**Dünya Zeytin Ansiklopedisi**", Madrid (İspanya). Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (1997).
- [3] Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milloni, D., and Haralampidis, K., "Breeding, Molecular Markers and Molecular Biology of the Olive Tree", *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**(9-10): 574-586 (2002).
- [4] Flahault, R., "L'olivier", *Ann. Ecole Nat. Agric. t. II. Montpellier*: (1886).
- [5] Morettini, A., "Olivicoltura", *Ramo Editoriale Degli Agricoltori Roma*: (1972).
- [6] Zohary, D., "**Centers of Diversity and Centers of Origin**", Oxford (1973).
- [7] Zohary, D. and Spiegel-Roy, P., "Beginnings of Fruit Growing in the Old World." *Science*, **187**: 319-327 (1975).
- [8] Ertem, H., ed. *Boğazköy Metinlerine Göre Hititler Devri Anadolu'sunun Florası. Atatürk Kültür, Dil Ve Tarih Yüksek Kurumu. Türk Tarih Kurumu Basımevi ed. Vol. VII. dizi. 1987, Türk Tarih Kurumu Yayınları: Ankara. 181.*
- [9] Anonim, "8000 Yıllık Müthiş Bir Serüven", *Komili zeytinyağı tanıtım kitapçığı İstanbul*: 23 (1996).
- [10] Garibanoğlu, M. and Baysal, A. *Kır5langıç Zeytinyağı Tanıtım Kitapçığı İstanbul*. 1998.

- [11] Hehn, V., "**Zeytin, Üzüm Ve İncir.**" Ankara. Dost Kitabevi Yayınları (1998).
- [12] Ergülen, E., Özkaya, M.T., Ülger, S., and Özilbey, N. *Identification of Some Turkish Olive Cultivars by Using Rapd-PCR Technique.* in *Proc. Fourth IS on Olive Growing.* 2002: Acta Hort ISHS.
- [13] Sensi, E., Vignani, R., Scali, M., Masi, E., and Cresti, M., "DNA Fingerprinting and Genetic Relatedness among Cultivated Varieties of *Olea Europaea* L. Estimated by Aflp Analysis", *Scientia Horticulturae*, **97**(3-4): 379-388 (2003).
- [14] Salas, J.J., Sanchez, J., Ramli, U.S., Manaf, A.M., Williams, M., and Harwood, J.L.s., "Biochemistry of Lipid Metabolism in Olive and Other Oil Fruits", *Progress in lipid research*, **39**: 151-180 (2000).
- [15] Tombesi, A., "Olive Fruit Growth and Metabolism", *Acta Horticulture*, **365**: 225-232 (1994).
- [16] Lavee. S., Haskal. A., and Wodner. M., "Barnea: A New olive Cultivar from First Breeding Generation", *Olea*, **17**: (1986).
- [17] Hartmann H. T., "Growth of the Olive Fruit", *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*, **54**: 86-94 (1949).
- [18] Shulman, Y. and Lavee, S., "Fruit Development and Maturation of Olives as Affected by Treatment with Auxins", *Riv. Ortoflorofrutti It.*, **63**: 31-40 (1979).
- [19] Lavee, S., Nashef, M., Wodner, M., and Harshemesh, H., "The Effect of Complementary Irrigation Added to Old Olive Trees (*Olea Europaea* L.) Cv. "Souri" on Fruit Characteristics, Yield and Oil Production." *Adv. Hort. Sci.*, **4**: 135-138 (1990).

- [20] Elant, H., "Effect of Irrigation on the Composition of Olives", *Terre Maroc.*, **30**: 118-129 (1956).
- [21] Spiegel, P., "The Water Requirement of the Olive Tree, Critical Periods of Moisture Stress and the Effect of Irrigation of Upon the Oil Content of Itsfruit", *14th Int. Hort. Cong. Netherlands*: 1363-1373 (1955).
- [22] Barronco, D. and Rallo, L., "Las Variedades De Olivo Cultivadas En Andalucia", *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Junta de Andalucia*: (1984).
- [23] Fernandez-Diez, M.S. "*the Olive*". in *The biochemistry of fruits and their products*. 1971. Londra: Acadeöic Press.
- [24] Nergiz, C. and Engez, Y., "Compositional Variation of Olive Fruit During Ripening", *Food Chemistry*, **69**: 55-59 (2000).
- [25] Rugini, E., Bongi, G., and Fontanazza, G., "Effect of Ethephon on Olive Ripening", *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, **107**: 835-838 (1982).
- [26] Ferrante, A., Hunter, D.A., and Reid, M.S., "Towards a Molecular Strategy for Improving Harvesting of Olives (*Olea Europaea L.*)", *Postharvest Biology and Technology*, **31**(2): 111-117 (2004).
- [27] Kitsaki, C.K., Vemmos, S.N., and Tzoutzoukou, C.G., "Changes of Respiration Rate, Ethylene Evolution, and Abscisic Acid Content in Devolving ýNfloreescence and Young Fruit of Olive(*Olea Europaea L.Cv. Konservolia*)", *J Plant Growth Regulation*, **18**: 1-7 (1999).
- [28] Lavee, S., "The Growth Potential of the Olive Fruit Mesocarp in Vitro (*Olea Europaea*)", *Acta Horticulture*, **78**: 115-122 (1977).

- [29] Baydar, H. and Turgut, I., "Yağlı Tohumlu Bitkilerde Yağ Asitleri Kompozisyonun Bazı Morfolojik Ve Fizyolojik Özelliklere Ve Ekolojik Bölgelere Göre Değişimi", *Tr.J. of Agriculture and Forestry*, **23**: 81-86 (1999).
- [30] Haralampidis, K., Milioni, D., Sanchez, J., Baltrusch, M., Heinz, E., and Hatzopoulos, P., "Temporal and Transient Expression of Stearoyl-Acp Carrier Protein Desaturase Gene During Olive Fruit Development", *Journal of Experimental Botany*, **49**: 1661-1669 (1998).
- [31] Akıllıoğlu, M., Özen, Y.A., Akay, Z., Özen, H., Aksu, B., Dizdaroğlu, T., Özilbey, N., Arsel, H., and Özahçı E., *Zeytin Raporu*, in *VII. beşyillik kalkınma planı bitkisel üretim özel ihtisas komisyonu meyvecilik grubu*. 2000, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü: İzmir.
- [32] Kaynas, N., Sutçu, A.R., and Fidan, A.E. *Olive Variety Trial in Marmara Region*. in *Proc. Fourth IS on Olive Growing*. 2002: Acta Hort.
- [33] Robards, K. and Mailer, R., "Olive Oil Yield, Quality and Cultivar Identification", *Rural industries research and development corporation*, **1(23)**: 1-15 (2001).
- [34] Perri, E., Parlati, M.V., Palopoli, A., and Rizzuti, B. *Characterization of Italian Virgin Olive Oils Using Fatty Acids*. in *Proc. Third Int. ISHS Symp. on Olive Growing*. 1999: Acta Hort.
- [35] Kaynaş, N., Sütçü, A.R., and Fidan, A.E., "Olive Variety Trial in Marmara Region": (2002).
- [36] Viola, P. and Audisio, M. *Olive Oil and Health*. in *International olive oil council*. 1987.

- [37] Shanklin, J. and Somerville, C., "Stearoyl-Acyl-Carrier-Protein Desaturase from Higher Plants Is Structurally Unrelated to the Animal and Fungal Homologs." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**: 2510-2514 (1991).
- [38] McKeon, T.A. and Stumpf, P.K., "Purification and Characterization of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase and the Acyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase from Maturing Seeds of Safflower", *The journal of biological chemistry*, **257**(25): 12141-12147 (1982).
- [39] Nelson, D.L. and Cox, M.M., "**Lehninger Biyokimyanın İlkeleri**", Ankara. Palme Yayıncılık (2005).
- [40] Gunstone, F.G., Harwood, J.L., and Padley, F.B., "**The Lipid Handbook**", London. Chapman and Hall (1994).
- [41] Harwood, J.L., "Ann Rev", *Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **39**: 101-138 (1988).
- [42] Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C., and Kridl, J.C., "Modification of Brassica Seed Oil by Antisense Expression of a Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 2624-2628 (1992).
- [43] Edip, K.E. and Küfrevioğlu, İ.Ö. "**Biyokimya**", Erzurum. Aktif yayınevi. p. 377-409 (2000).
- [44] Banilas, G., Moressis, A., Nikloudakis, N., and Hatzopoulos, P., "Spatial and Temporal Expressions of Two Distinct Oleate Desaturases from Olive (*Olea Europaea* L.)", *Plant Science*, **In Press, Uncorrected Proof**: 1-9 (2004).
- [45] Harwood, J.L., *Plant Acyl Lipids: Structure, Distribution, and Analysis*, In:, in *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf, Editor. 1980, Academic Press: New York. p. 1-55.

- [46] Stumpf, P.K., *Biosynthesis of Saturated and Unsaturated Fatty Acids*, In: , in *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf, Editor. 1980, Academic Press: New York. p. 177-204.
- [47] Jaworski, J.G., *Biosynthesis of Monoenoic and Polyenoic Fatty Acids*, In: , in *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf, Editor. 1987, Academic Press: Orlando. p. 159-174.
- [48] Los, D.A. and Murata, N., "Structure and Expression of Fatty Acid Desaturases", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1394**: 1-15 (1998).
- [49] Kates, M., Pugh, E.L., and Ferrante, G., "Regulation of Membrane Fluidity by Lipid Desaturases", *Biomembranes*, **12**: 379-395 (1984).
- [50] Murata, N. and Wada, H., "Acyl Lipid Desaturases and Their Importance in the Tolerance and Acclimatization to Cold of Cyanobacteria", *Biochemistry*, **308**: 1-8 (1995).
- [51] Zaborowska Z., Stazycki M., Femiak I., Swiderski, M., and Legocki, A.B., "Yellow Lupine Gene Encoding Stearoyl-Acp Desaturase-Organization, Expression and Potential Application." *Acta Biochim Pol.*, **49**: 29-42 (2002).
- [52] Murata, N., Wada, H., and Gombos, Z., "Modes of Fatty Acid Desaturation in Cyanobacteria", *Plant Cell Physiology*, **33**: 933-941 (1992).
- [53] Holloway, P.W., *Fatty Acid Desaturation In:*, in *The Enzymes*, P.D. Boyer, Editor. 1983, Academic Press: Orlando. p. 63-83.
- [54] Fox, B.G., Shanklin, J., Jingyuan, A., Loehr, T., M., and Sanders-Loehr, J., "Resonance Raman Evidence for an Fe-O-Fe Center in Stearoyl Acp Desaturase. Primary Sequence Identity with Diiron-Oxo Proteins." *Biochemistry*, **33**: 12776-12786 (1994).

- [55] Shanklin, J., Whittle, E., and Fox, B.G., "Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-Coa Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase", *Biochemistry*, **33**: 12787-12794 (1994).
- [56] Fox, B.G., Shanklin, J., Somerville, C., and Münck, E., "Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase from *Ricinus Communis* Is a Diiron-Oxo Protein", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 2486-2490 (1993).
- [57] Murata, N., Higashi, S., Wada, H., Sakamoto, M.H., Macherel, D., Tasaka, Y., and Los, D.A., *The Cyanobacterial Desaturases: Aspects of Their Structure and Regulation*, In: *Plant Lipid Metabolism*, J.C. Kader and P. Mazliak, Editors. 1995, Kluwer Academic: Dordrecht. p. 3-8.
- [58] Nishida, I. and Murata, N., "Chilling Sensitivity in Plants and Cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids", *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 541-568 (1996).
- [59] Akagi, H., Baba, T., Shiamada, H., and Fujimura, T., "Plant Gene Register; Nucleotide Sequence of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase cDNA from Developing Seeds of Rice", *Plant Physiology.*, **108**(2): 845-846 (1995).
- [60] Singh, S., et al., "Sequence of a cDNA from *Linum Usitatissimum* Encoding the Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase." *Plant Physiology*, **104**: 1075 (1994).
- [61] Akagi, H., et al., "Nucleotide Sequence of a Stearoyl- Acyl Carrier Protein Desaturase cDNA from Developing Seeds of Rice." *Plant Physiology.*, **108**: 845-6 (1995).
- [62] Shanklin, J., et al., "Sequence of a Complementary DNA from *Cucumis Sativus* Encoding the Stearoyl-Acyl Carrier Protein(Acp) Desaturase." *Plant Physiology*, **97**: 467-478 (1991).

- [63] Heinz, E., "Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids." *Lipid metabolism in plants, Boca Raton, FL: CRC Press: 33-89* (1993).
- [64] Fox, B.G.e.a., "Stearoyl Acyl Carrier Protein (Delta9) Desaturase from *Ricinus Communis* Is a Di-Iron-Oxo Protein." *Proceedings of the National Academy of Science, USA, 90: 2486-2490* (1993).
- [65] Lindqvist.Y., W. Huang., G, S., and J. Shanklin, "Crystal Structure of Delta Dokuz Stearoyl Acyl Carrier Protein Desaturase from Castor Seed and Its Relationship to Other Di-Iron Proteins." *EMBO journal, 15: 4081-92* (1996).
- [66] Nordlund, P., et al., "Three-Dimensional Structure of the Free Radical Protein of Ribonucleotide Reductase." *Nature, 345: 593-8* (1990).
- [67] Slocombe., S.P., et al., "Temporal and Tissue-Specific Regulation of a *Brassica Napus* Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase Gene." *Plant Physiology, 104: 1167-76* (1994).
- [68] Snah. Habib Farida., Rashid, O., and San, C.T., "Temporal Regulation of Two Isoform of cDNA Clones Encoding Delta 9 Stearoyl Acp Desaturase from Oil Palm (*Elaies Guineensis*)", *Plant Science, 152: 27-33* (2000).
- [69] Slocombe, S.P., Cummins, L., Jarvis, R.P., and J., M.D., "Nucleotide Sequence and Temporal Regulation of a Seed-Specific B. Napus cDNA Encoding a Stearoyl Acyl Carrier Protein (Acp) Desaturase." *Plant Molecular Biology, 20: 151-155* (1992).
- [70] Thompson., G.A., et al., "Primary Structure of the Precursor and Mature Forms of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase from Safflower Embryos and Requirement of Ferredoxin for Enzyme Activity." *Proceedings of the National Academy of Science, USA, 88: 2578-82* (1991).

- [71] Nishida, I., Beppu. T., Matsuo, T., and Murata, N., "Nucleotide Sequence of cDNA Clone Encoding a Precursor to Stearoyl Acp Desaturase from Spinach (*Spinacia Oleracea*)."
Plant Molecular Biology, **17**: 711-713 (1992).
- [72] Taylor. M. A., Smith. S. B., Davies. H. V., and R., B.L., "The Primary Structure of a cDNA Clone of the Stearoyl Acyl Carrier Protein Desaturase Gene from Potato (*Solanum Tuberosum L.*)",
Plant Physiology, **100**: 533-4 (1992).
- [73] Sato, A., Becker. C. K., and C., K.V., "Nucleotide Sequence of a Complementary DNA Clone Encoding Stearoyl Acyl Carrier Protein Desaturase from *Simmondsia Chinensis*",
Plant Physiology, **99**: 362-3 (1992).
- [74] Singh, S.P., McKinney, S., and Green, A., "Sequence of cDNA from *Linum Usitatissimum* Encoding the Stearoyl Acyl Carrier Protein Desaturase",
Plant Physiology, **104**: 1075 (1994).
- [75] Shanklin, J., et al., "Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase from Higher Plants Is Structurally Unrelated to the Animal and Fungal Homologs."
Proceedings of the National Academy of Science, USA, **88**: 2510-14 (1991).
- [76] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A Plant DNA Miniprep: Version II",
Plant Molecular Biology Reporter, **1**(4): 19-21 (1983).
- [77] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**", Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [78] Haralampidis, K., Milioni, D., Sanchez, J., Baltrusch, M., Heinz, E., and Hatzopoulos, P., "Temporal and Transient Expression of Stearoyl-Acp Carrier Protein Desaturase Gene During Olive Fruit Development",
J. Exp. Bot., **49**(327): 1661-1669 (1998).

- [79] www.agriankara.edu.tr. (16/06/2006)
- [80] www.iznikgen.tr. (16/06/2006)
- [81] <http://waynesword.palomar.edu> (16/06/2006)
- [82] www.zae.gov.tr. (16/06/2006)
- [83] www.lokmanhekim.com.tr. (16/06/2006)
- [84] www.tariszeytin.com.tr. (16/06/2006)
- [85] www.ncbi.nlm.nih.gov.tr. (16/06/2006)