

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

**KİRAZ VE USLU ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE PEDİSELE HAS GENLERİN
TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şakir AKGÜN

Balıkesir, Temmuz – 2011

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

**KİRAZ VE USLU ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE PEDİSELE HAS GENLERİN
TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şakir AKGÜN

Balıkesir, Temmuz-2011

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

KIRAZ VE USLU ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE PEDİSELE HAS GENLERİN
TESPİTİ

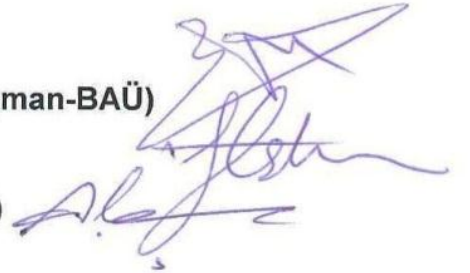
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şakir AKGÜN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 15.07.2011

Jüri Üyeleri: Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (Danışman-BAÜ)
Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (BAÜ)
Yard. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK (BAÜ)



Balıkesir, Temmuz-2011

Bu tez alışması TÜBİTAK tarafından 110O005 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

KIRAZ VE USLU ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE PEDİSELE HAS GENLERİN TESPİTİ

Şakir AKGÜN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada zeytinde (*Olea europaea* L.) Uslu (Meyvesi kolay dökülen) ve Kiraz (Meyvesi zor dökülen) çeşitlerinin meyve pedisellerinden cDNA kütüphaneleri oluşturuldu. Her iki kütüphaneden rastgele toplam 400 koloni seçilerek taşıdıkları insertlerin biyoinformatik analizi yapıldı. Biyoinformatik analizler sonucunda başka bitkilerden rapor edilmiş 19 farklı cDNA elde edildi. Bu 19 cDNA molekülünden 14'ünün daha zeytinde bulunmamış olduğu tespit edildi. Ayrıca 9 cDNA'nın muhtemelen açık okuma çerçevesi içerdikleri fakat erişimi olan veritabanlarında benzerlerinin bulunmadığı tespit edildi. Bu cDNA'lardan 14'ü EST veritabanında zeytinle homoloji göstermedi. Dolayısıyla bu cDNA'lar zeytinden ilk defa elde edilmiş oldu. Sonuçların genel analizi elde edilen cDNA moleküllerinin çoğunlukla zeytin pediseline özgü olabileceğini düşündürmektedir. Uslu pedisel kütüphanesinde bulunan meyve dökülmesinde rol oynayan ACC sentazın ekspresyon seviyesi Kiraz pediselindekinden yaklaşık 5 kat fazla ölçüldü. Bunun gibi farklılık gösteren cDNA moleküllerinin, iki çeşit arasındaki dökülme farkını açıklama potansiyeli taşıdıkları söylenebilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Zeytin, *Olea europaea* L., Meyve - Pedisel kütüphaneleri, Absisyon ile alakalı genler.

ABSTRACT

ISOLATION OF PEDICEL SPECIFIC OLIVE GENES IN KIRAZ AND USLU CULTIVARS

Şakir AKGÜN

Balıkesir University, Department of Biology

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

Balıkesir - Turkey, 2011

In this study, cDNA libraries from Uslu (firm fruit holder) and Kiraz (loose fruit holder) olive (*Olea europaea* L.) cultivars were constructed for capturing and analysis of differentially expressed cDNAs, using randomly picked 400 colonies in total from both libraries. Of all the cDNAs analysed, 19 were found to be unique genes through bioinformatic analyses. Of these 19 cDNAs, 14 were not reported from olive before and hence were detected for the first time with this study. Nine cDNA were found to harbor one or more open reading frames but not to have any similarity in any record from the public databases. Most of the cDNAs obtained from these libraries appeared to be pedicel specific if not cultivar – pedicel specific. The expression level of ACC synthase acting in fruit abscission found 5 fold more 'Uslu' cDNA library than that of 'Kiraz' Similarly differentiating cDNAs suggest a potential to explain the abscission difference between two cultivars.

KEYWORDS : Olive, *Olea europaea* L., Fruit-Pedicel Libraries, Genes related to Abscission

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	ii
ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT	iii
KEYWORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin Hakkında Genel Bilgiler	1
1.2 cDNA Kütüphaneleri	4
1.3 Meyve Sapı (Pedisel)	5
1.4 Meyve Dökülmesi	5
1.4.1 Absisyonu Etkileyen Faktörler	6
1.4.2 Absisyonla Alakalı Gen Aktivitesi	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM	13
2.1 Örneklerin Toplanması	13
2.2 RNA İzolasyonu	13
2.3 RT-PCR ve cDNA Eldesi:	14
2.3.1 ssDNA (Second Strand DNA, çift zincir DNA) Eldesi	14
2.4 ssDNA'nın Saflaştırılması	14
2.5 cDNA Havuzunun Klonlanması ve Transformasyonu	15
2.5.1 Ligasyon	15
2.5.2 Transformasyon İçin Hazırlık Aşamaları	16
2.5.2.1 LB (Luria-Bertani Broth) Agar Hazırlanması	16
2.5.2.2 Sıvı LB Hazırlanması	17

2.5.2.3 Kompetan Hücre Hazırlanması	17
2.5.3 Transformasyon	18
2.6 Plazmit İzolasyonu	19
2.7 <i>Bgl</i> II Restriksiyon Enzimi ile Plazmitlerin Kesilerek İnsertlerin Belirlenmesi	19
2.8 <i>EcoR</i> I Restriksiyon Enzimi ile Plazmitlerin Kesilerek İnsertlerin Belirlenmesi	20
2.9 pCR8/GW/TOPO Plazmitine Ait Primerler Kullanılarak İnsertlerin Belirlenmesi	20
2.10 DNA Dizileme	20
2.11 Bioinformatik Analiz	20
2.12 Gerçek Zamanlı PZR (Real – Time PCR)	21
3. BULGULAR	22
3.1 cDNA Kütüphanelerinin Oluşturulması	22
3.1.1 RNA İzolasyonu Sonucu	22
3.1.2 Transformasyon Sonuçları	22
3.1.3 Uslu Pedisel Kütüphanesi İnsertlerinin Analizi	23
3.1.3.1 pJET Vektörünün <i>Bgl</i> II Enzimi ile Kesim Sonuçları	23
3.1.3.2 pCR®8/GW/TOPO® Vektörü Primeriyle Yapılan PCR Sonuçları	26
3.1.4 Kiraz Pedisel Kütüphanesi İnsertlerinin Analizi	33
3.1.4.1 pJET Vektörünün <i>Bgl</i> II Enzimi Kesim Sonuçları	33
3.1.4.2 pCR®8/GW/TOPO® Vektörünün <i>EcoR</i> I Enzimi Kesim Sonuçları	37
3.2 Gerçek Zamanlı PZR (Real – Time PCR) Sonuçları	46
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
4.1 Pedisel Kütüphanelerinin Sonuçları	48
4.2 Elde Edilen Genlerin Analizi	48
5. KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
DNA	Deoksiribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
AB	Absisyon Bölgesi
ABA	Absisik Asit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ssDNA	Second Strand DNA (Çift Zincir Deoksiribonükleik asit)
EB	Elüsyon Tamponu (Elution Buffer)
LB	Luria-Bertani Broth
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit)
UPK	Uslu Pedisel Kütüphanesi
KPK	Kiraz Pedisel Kütüphanesi
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
DEPC	Diethylpyrocarbonate (Dietilpirokarbonat)
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
dH₂O	Distile Su
DAO	Diamine Oxidase (Diamin okdisaz)
PAO	Polyamine Oxidase (Poliamin oksidaz)
SAM	S-adenosylmethionine (S-adenozilmetiyonin)
SAMDC	S-adenosylmethionine decarboxylase (S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz)
Put	Putrescine
Spd	Spermidine
Spm	Spermine
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz)
WAK	Wall-associated kinase
SOD	Superoksit dismutaz geninin (Superoxide dismutase)

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1	Kiraz ve Uslu Zeytin çeşidleri	3
Şekil 2	Zeytin meyvesi ayrılma bölgeleri	6
Şekil 3	pJET 1.2 Klonlama Vektörünün haritası	16
Şekil 4	pCR®8/GW/TOPO® Vektörünün haritası	16
Şekil 5	Uslu ve Kiraz çeşidlerinin pediselinden elde edilen RNA izolasyonu sonucu RNA'nın eşit yüklenerek elde edildiği jel fotoğrafı	22
Şekil 6	Uslu zeytin çeşidine ait iki farklı klonlama kiti kullanılarak yapılan transformasyon sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü	23
Şekil 7	Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	24
Şekil 8	Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	24
Şekil 9	Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	25
Şekil 10	Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin pCR®8/GW/TOPO® TA primerleriyle yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü	26
Şekil 11	Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin pCR®8/GW/TOPO® TA primerleriyle yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü	27
Şekil 12	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	33
Şekil 13	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	34
Şekil 14	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	34
Şekil 15	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	35
Şekil 16	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>Bgl</i> II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	35

Şekil 17	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>BglII</i>) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	36
Şekil 18	Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (<i>EcoRI</i>) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü	37
Şekil 19	Uslu pedisel kütüphanesinden elde edilen 3 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik	46
Şekil 20	Uslu pedisel kütüphanesinden elde edilen 71 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik	46
Şekil 21	Kiraz pedisel kütüphanesinden elde edilen 52 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik	47
Şekil 22	Kiraz pedisel kütüphanesinden elde edilen 52 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik	47

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1	Uslu Pedisel kütüphanesinden (UPK) elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeştiği kayıtlar	27
Tablo 2	Kiraz Pedisel kütüphanesinden (KPK) elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeştiği kayıtlar	38

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılmasında en büyük paya sahip olan birçok yönüyle kendisini örnek aldığım ve bana böyle bir çalışmada yer almayı sağlayıp göstermiş olduğu sabırdan dolayı değerli hocam ve danışmanım Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Bilgilerinden ve tecrübelerinden her zaman faydalanmamı sağlayan bu konuda yardımlarını esirgemeyen laboratuvar malzeme sıkıntılarımızda her zaman yanımızda olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a ve öğrencilerine,

Çalışmalarımız için kullanılan sıvı azot teminini sağlayan engin cömertliğinden dolayı Balıkesir Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği Müdürü Sayın Hasan Dertli ve Çalışanlarına,

Çalışma materyalimiz olan zeytini temin etmemizde bize kapılarını açan Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu Müdürü Sayın Mehmet BALCI toplama işleminde yardım eden, Mustafa YÜZGEÇ ve İbrahim KIYMAZ'a,

Laboratuvar tecrübe ve bilgilerini yorulmadan ve sabırla anlatan ve sayelerinde çok rahat deney aşamalarını geçirdiğim sevgili hocalarım ve aynı zamanda arkadaşlarım Öznur SUAKAR, Sevilay BARAK, Araş. Gör. Görkem DENİZ SÖNMEZ ve Evrim ÇELEBİ'ye,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları arkadaşlıktan ve vermiş oldukları destekten dolayı Gamze YENER, Gülçin ÇETİN, Müslime YAVUZ, Şenay SÜNGÜ ve Zeynep KARABAŞ'a,

Maddi destekçimiz TÜBİTAK'a,

Beni bu günlere getirip bu satırları yazmama sebep olan maddi ve manevi desteklerinden hiçbir zaman mahrum kalmadığım sevgili aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Balıkesir, 2011

Şakir AKGÜN

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin Hakkında Genel Bilgiler

Zeytin (*Olea europaea* L.), tarih öncesi çağlarda Suriye ve Akdeniz bölgelerinin doğusundan köken almış olup şu anda Akdeniz ülkelerinde ve Akdeniz bölgesi dışındaki birçok ülkede yetiştirilen tipik bir meyve ağacı olmuştur [1, 2]. Zeytin yağı ve meyvesinin besinsel olarak çok zengin olması zeytin tüketimini arttırmış ve ekonomik olarak milyonlarca insanın geçim kaynağı olarak yetiştiriciliği gittikçe artan bir ağaç olmuştur [3]. Hasat ve yetiştirilmesi oldukça zor olmasına rağmen yüksek sağlık değeri zeytinin Akdeniz ülkelerinden başka Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Güney Afrika, Latin Amerika ve Avustralya'da da yetiştiriciliğinin yapılmasına neden olmuştur [2, 4].

Kültürü yapılan zeytinler Oleaceae familyasına dahildir. Oleaceae familyası 180 tür ve 30 cins içermektedir [5]. Bu familyaya ait birçok cins ekonomik öneme sahiptir fakat *Olea europaea* meyvesi ve yağı için üretilen tek türdür [6]. *Olea europaea* L. yabani olan *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* ve yetiştiriciliği yapılan *Olea europaea* L. subsp. *europaea* olarak iki varyeteye sahiptir [2]. Kültürü yapılan *Olea europaea* L. subsp. *europaea* yabani olan *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* 'den köken almıştır [2, 7]. *Olea europaea* L. bilimsel ismi 1764 'te Linnaeus tarafından verilmiştir. *Olea* cins isminin Yunanca kelime olan *elaion* (yağ) dan türediği düşünülmektedir [2].

Zeytin her zaman yeşil, ağaç boyu 4 ile 8 metre arasında değişen bir bitkidir. Yaralandığında kolayca kendini yenileyebilen zeytin 2n=46 kromozoma sahiptir. Soğuk kışlar, kuru ve sıcak yazlarda bile gelişimine devam edebilir [2, 5]. Ekonomik ve besinsel olarak çok önemli özelliklere

sahip olan zeytin ağacı ayrıca binlerce yıl yaşayabilme özelliğine de sahiptir [4].

Zeytin yetiştiriciliğinde İspanya, İtalya ve Yunanistandan sonra Türkiye dördüncü sırada yer almaktadır [8]. Sofralık olarak Türkiye ve İspanya, zeytinyağında ise İspanya, İtalya ve Yunanistan başlıca üreticilerdir [2]. 2009'da dünyada üretilen yaklaşık 16 milyon ton zeytinin yaklaşık 1.3 milyon tonu Türkiye'de üretilmiştir [9].

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nden alınan bilgilere göre Türkiye'de yetiştirilen 87 zeytin çeşidi bulunmaktadır [10]. Bu tez kapsamında çalışılan Kiraz ve Uslu çeşidlerinin özellikleri Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nden (İzmir) alınan bilgiler ışığında aşağıda özetlenmektedir.

Kiraz: Anavatanı Türkiye olan Kiraz zeytin çeşidi Manisa-Akhisar'ın Zeytinli Ova beldesindeki zeytinliklerde görülen pek yaygın olmayan çeşittir. Büyük ağaç oluşturur. Yörede iki tipi vardır. Bunlar *topan kiraz* ve *oval kiraz*'dir. Olgunluk döneminde meyve rengi kiraza benzediğinden bu isimle anılmaktadır. Meyve sapları uzundur. Soğuğa fazla duyarlı değildir. Çeliklerinin köklenme oranı orta düzeydedir (%42). Yağlık ve sofralık olarak değerlendirilebilir. Meyve eti yumuşak ve çekirdeğe bağlantısı sıkıdır. Daldan ayrılması oldukça zordur. Kuvvetli periyodisite gösterir (Şekil 1).

Uslu: Anavatanı Türkiye olan Uslu zeytin çeşidi Manisa'nın Akhisar ilçesi ve civarı, Turgutlu, İzmir'in Kemalpaşa ve Selçuk ilçeleri, Muğla Merkez ve Yatağan ilçeleri zeytinliklerinde görülür. Üretimi yeşil dal çelikleriyle ve aşı ile yapılmaktadır. Ağacı erken meyveye yatar ve meyvesi erken olgunlaşır. Olgun meyvede et yumuşak olduğu için taşıma sırasında dikkatli taşınmaktadır. Ağaçların odun dokusu yumuşak olması nedeniyle zeytin dal kanserine duyarlıdır. Meyvelerin tam olgunluktaki parlak koyu siyah rengi ve tadı nedeniyle siyah sofralık olarak tercih edilmektedir. Soğuğa hassastır. Erken soğukların olduğu yörelerde hasat soğuklardan önce yapılmalıdır. Daldan ayrılması oldukça kolaydır. Periyodisite göstermez (Şekil 1).



KIRAZ

USLU

Şekil 1 Kiraz ve Uslu Zeytin çeşitleri (Resimler Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Web Sayfasından [10] Alınmıştır).

Birçok bitkide olduğu gibi zeytinde de hasat, maliyetli olmakla birlikte ürün verimliliğini etkileyen bir durumdur. Ayrıca kullanılan bazı yöntemlerle hasattan dolayı zeytinde periyodisite denilen ağacın bir yıl meyve verip (var yılı), diğer yıl meyve vermemesi (yok yılı) problemi olmaktadır. Ekonomik olarak dünyanın önde gelen bitkilerinden biri olan zeytindeki bu problemin çözümü için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar meyve hasatının kolaylıkla yapılabilmesi ve meyve dökülmesinin istenilen zamanda gerçekleşmesini sağlayarak ürün verimliliğinin artırılması üzerinedir [8, 11-13].

Bu çalışmada Uslu (Meyvesini kolay bırakan) ve Kiraz (Meyvesini zor bırakan) zeytin çeşitleri kullanılmıştır. İki zıt karaktere sahip olan bu çeşitler arasında meyve pedisellerinden elde edilen cDNA molekülleri incelenmiş ve bunların zeytin çeşidine veya pedisele has olup olmadıklarının ve meyve dökülmesi ile olan ilişkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.2 cDNA Kütüphaneleri

Artan dünya nüfusu ve azalan tarım alanları nedeniyle daha kaliteli ve ürün verimliliği yüksek olan bitkilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden birçok bitki genetik çalışmaları bu yönde yapılmaktadır [14]. Bu alanda yapılan genetik çalışmalar için gerekli olan önemli bilgilerden biride yetiştiriciliği yapılan bitkilerin genomlarının aydınlatılmasıdır. Gelişen DNA dizileme yöntemleriyle birlikte bitkilerin genomları ve yapısal genleri bilinmektedir. Belirli bir dokuda ve/ veya belirli bir zamanda görev yapan genleri tespit etmenin en uygun yollarından biri cDNA kütüphanesi oluşturma tekniğidir [15].

Her canlının dokusuna veya organına özgü ifade olan genler vardır. Hatta belli zamanlarda ve şartlardada bu gen ifadesi kompozisyonunda değişiklikler olmaktadır. Dokuya ve organa özgü farklı gen ifadesinin karmaşıklığını ortaya çıkarmada ve özel gen ifadesi çalışmalarında kullanılan en temel adım mRNA aracı molekülünden Ters Transkriptaz (Reverse Transcriptase) yoluyla elde edilen cDNA kütüphaneleridir [16]. cDNA kütüphanesi yaklaşımı sayesinde bir canlıda ifade olan bilinmeyen genler, dokuya veya organa hatta türe özgü olanlar keşfedilerek, moleküler karakterizasyonu yapıp yapısal fonksiyonlarının aydınlatılması mümkündür.

Zeytin ekonomik olarak, tarihi olarak ve besin değeri açısından önemli olmakla birlikte zeytin genom dizilenmesi henüz yapılmamıştır [17]. Zeytin genetik çalışmaların temelini meydana getirmek için yapılacak çalışmaların başında cDNA kütüphanelerinin oluşturulması gelmektedir. Bu çalışmada cDNA kütüphaneleri oluşturulmasıyla büyük ve karışık bir genoma sahip zeytinin gen kompozisyonunu aydınlatılmasına bir katkı sağlanmış olacaktır.

1.3 Meyve Sapı (Pedisel)

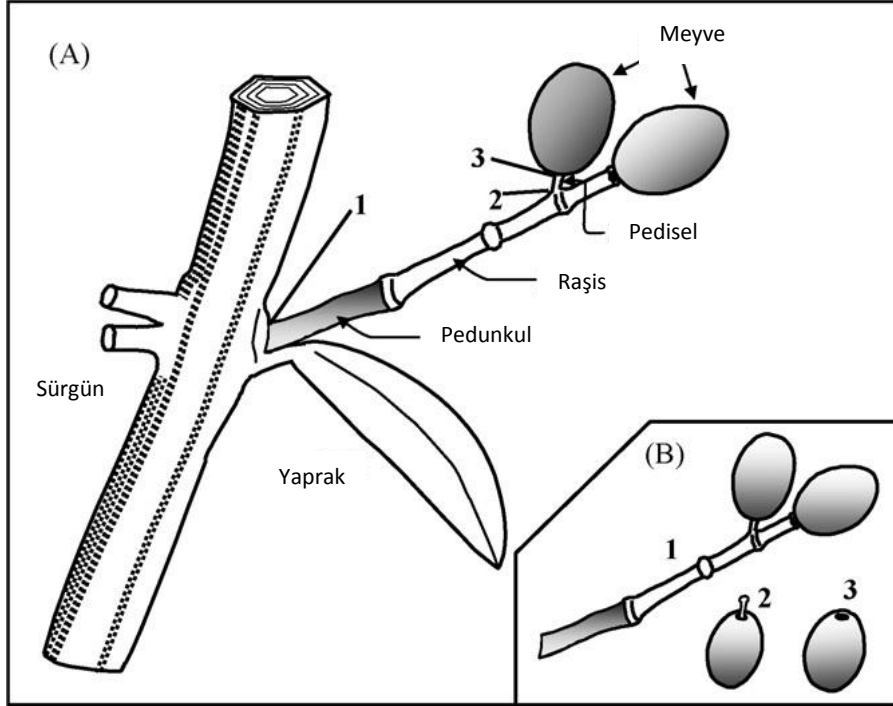
Pedisel meyveyle ağaç arasında bir köprüdür. Pedisel de gövde gibi bir yapıya sahip olduğundan gövdeden türediği düşünülebilir. Çiçek pediseli bahar başlarında tek bir internoddan oluşmaya başlar ve meyvenin olgunlaştığı sonbaharda birçok değişiklikler gösterir. Bu süreler bölgeye ve zeytin türüne göre farklılık göstermektedir [18].

1.4 Meyve Dökülmesi

Absisyon, meyve yaprak ve tomurcuk gibi bitki organlarının doğal olarak dökülmesidir [19]. Çok karışık bir süreç olan absisyon, absisyon bölgesi (AB) denilen absisyonu uyarıcı sinyalleri alma özelliğinde olan bir hücre tabakasının zayıflamasıyla meydana gelir [20, 21]. AB, birbirinden ayrılan çoklu hücre bölgesi olarak düşünülebilir [19]. AB'de bulunan bu hücre tabakası genetik olarak belirlenmiş bir bölge olup bitkiye, türe ve organa göre değişmektedir [22-25]. AB iki fonksiyona sahiptir. Birincisi; belirlenmiş olan hücre tabakasının duvar materyallerini hidroliziyle ayrılmaya olanak sağlamak, ikincisi de bitkiyi su kaybı ve mikroorganizma enfeksiyonundan korumak için gerekli materyallerin sentezini başlatmaktır [22]. AB'de canlı hücrelerin duvarlarının enzimatik olarak yıkılmasıyla gerçekleşen absisyon için mutlaka dış kuvvetlere (rüzgar, yerçekimi vb.) ihtiyaç vardır [20]. Absisyon işlemi, AB'de bulunan hücrelerin hücre duvarlarının zayıflamasını sağlayan hücre duvarlarının hidrolizlenmesine ek olarak dökülme işlemi için gerekli dış kuvvetlerin yardımına bağlıdır.

Absisyon başlamadan önce AB'de bulunan hücreler, morfolojik olarak farklıdır. Küçük, kare şeklinde ve yoğun sitoplazmaya sahiptirler. Absisyon süresince boşluklarını arttırmak ve büyümek için kapasitelerini kaybederler [19].

Absisyon bölgesi ve bu bölgedeki hücrelerin sayısı türden türe farklılık göstermektedir. AB'ni tespit etmek için yaptıkları çalışma ile Castillo-Llanque ve arkadaşları (2008), zeytinde meyve absisyonunun 3 bölgede (pedisel, pedisel-meyve bağlanma bölgesi, pedisel ve raşis) olduğunu, zeytin türlerine ve hasat zamanına göre AB'nin değiştiğini, çalıştıkları iki farklı zeytin çeşidinde AB'nin farklı yerlerde olduğunu göstermişlerdir (Şekil 2).



Şekil 2 Zeytin meyvesi ayrılma bölgeleri (A) ve ayrılan parçaların karşılığı (B): (1) sürgün-çiçek sapı; (2) pedisel-raşis; (3) pedisel-meyve (Şekil Dr. Hava Rapoport'un izni ile alınmıştır) [23].

1.4.1 Absisyonu Etkileyen Faktörler

Çok karmaşık bir işlem olan absisyonda birçok faktör rol oynamaktadır. Çevresel ve gelişimsel olarak birçok durum absisyonla alakadardır. Mevsimsel değişiklikler, düşük sıcaklıklar, kısa günler, su yokluğu veya predatör saldırısı tarafından oluşan stress, veya patojen istilası absisyonu etkileyen faktörlerdendir. Çevresel ve gelişimsel absisyonu etkileyen bu mekanizmaların yanında, hücre seviyesinde gerçekleşen

moleküler düzeyde işleyen absisyon işlemini gerçekleştiren organik bileşikler keşfedilmiştir.

Bitki hormonları, gelişme ve fizyolojik olayların başlaması için gerekli olan sinyal iletiminde hücre reseptörlerine bağlanarak gerekli etkinin gösterilmesini sağlayan en ideal moleküllerdir. Absisik asit ve etilen absisyonu hızlandırmakta, sitokin ve öksin ise absisyonu inhibe etmektedir [26]. Absisyonun en önemli düzenleyicileri etilen ve öksindir ve bu hormonlar absisyonda ters etkiye sahiptir [19, 24]. Etilen hızlandırıcı bir etkiye sahipken, öksin geciktirmektedir [19]. Öksin AB'ne cereyan ettiğinde hücre ayrılmasını inhibe ederek absisyonu engeller [27]. AB'ndeki öksin durumu bölgenin etilene olan duyarlılığını etkiler. Dolayısıyla öksinin temin edilmesini etkileyen herhangi bir faktör aynı zamanda etilene olan duyarlılığıda etkileyecektir. Diğer yandan etilen öksin taşınmasının güçlü bir inhibitörüdür ve öksin taşınmasına müdahale edip AB'nin yıkımını kuvvetlendirerek bizzat bölgenin duyarlılığını arttırabilir [19].

Etilenin bir çok bitkide meyve, yaprak ve çiçek gibi organlarının absisyonunu indüklediği gösterilmiştir [20, 22, 24, 28-30]. Etilen sentezini inhibe edici maddeler kullanılıp absisyon oranının azaltıldığı gösterilerek etilenin absisyondaki etkisi belirtilmiştir [22]. Etilen hücre ayrılması için gerekli enzimlerin oluşumundan birinci derece sorumludur [31]. Çoğu bitkide absisyon bölgesindeki hücre duvarı hidrolazların sentezini indükleyerek absisyonu hızlandırmaktadır [22, 32].

Olgunlaşma süresince etilen seviyesinde hiç bir değişim olmayan ve bu süreçte etilen seviyesi düşük olan meyveler "non-climacteric"tir (meyve koptuktan sonra olgunlaşma reaksiyonları devam etmeyen) [21]. Zeytin non-climacteric bir meyveye sahiptir ve olgunlaşma süresince etilen seviyesinin tespit edilemediği gösterilmiştir. Buna rağmen etilen non-climacteric olan zeytin meyvesinde absisyonu hızlandırmıştır [24, 33, 34]. Düşük miktarda etilen üretilen zeytinde dışarıdan, etilenin doğrudan öncüsü olan ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) uygulanmasıyla etilen üretimi

artmaktadır [35]. Böylelikle absisyonu hızlandırıcı etkiye sahip etilen üretimini arttırarak meyve dökülmesine ve dolayısıyla da hasatın daha kolay yapılmasına olanak sağlamaktadır. Hasatın ve meyve üretiminin verimini arttırmak için absisyon hızlandırıcı olarak görev yapan etilen sentezini arttırıcı kimyasallar (Etephon) kullanılarak zeytinde birçok çalışma yapılmıştır [8, 36]. Fakat yapılan bu çalışmalarda kullanılan kimyasallar sadece meyve absisyonunu değil yapraklarında absisyonuna neden olmaktadır.

Etilen tipik olarak absisyonu hızlandıran etkisine rağmen absisyonu düzenleyen tek faktör değildir hatta bazı durumlarda absisyonda hiç bir rolü yoktur. Fakat zeytinde yapılan çalışmalarda absisyonda büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir [33, 37, 38].

Etilen ve öksin dışında absisyonu etkileyen başka faktörlerde bulunmaktadır. Absisik asitin (ABA), çoğu dokuda etilen üretimine katkıda bulunarak absisyonu hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda birkaç bitkide absisyonun başlamasından sorumlu olduğuda tespit edilmiştir [39]. Pamuk ve fasülyede yapılmış olan çalışmalarda ABA'nın absisyonu arttıran bir etkiye sahip olan etilen üretimini arttırarak absisyonda hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda selülaz aktivitesini ve sentezini arttırarak absisyonu hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu da gözlenmiştir [40]. Zeyinde yaptıkları çalışma ile Kitsaki ve arkadaşları çiçek'te ABA'nın birikmesiyle etilen üretiminin arttığını gözlemlemişlerdir [41].

Jasmonat bitki dokularına uygulandığında, gelişme ve büyümede destekleyici ve engelleyici etkisi olmaktadır. Fasülyenin yaprak saplarında etilen üretimi olmaksızın jasmonatın absisyonu teşvik edici olduğu tespit edilmiştir. Jasmonat, absisyon bölgesindeki hücrelerin hücre duvarındaki polisakaritlerin metabolik proseslerini etkileyip selülaz aktivitesini sağlayarak absisyonda rol oynamaktadır [42].

Absisyonda hormonların dışında faktörlerde mevcuttur. Bu faktörlerden biri bitki gelişmesini etkileyen oligogalakturonitlerdir. Bezelyenin gövde bölmelerinde yapılan çalışmada oligogalakturonitlerin, öksin uyarılımlı gelişmede inhibitör etkisine sahip olduğu gösterilerek antiöksin olarak görev yaptığı da belirtilmiştir [43]. Oligogalakturonitler ayrılma tabakasındaki hücrelere öksinin bağlanma bölgelerini bloke ederek öksinin absisyonu inhibe etme yeteneğini engellemesiyle etilene olan duyarlılığın artırılmasına ve dolayısıyla da absisyonu arttırmaya neden olmaktadır [19].

DNA ve proteinleri bağlayan ve hücre zarını sağlamlaştıran poliaminlerin yaşlanmayan dokularda milimolar konsantrasyonlarda olduğu, yaşlanmayla birlikte seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Hücre duvarıyla alakalı olan bu polikatyonların oligogalakturonitlere bağlanıp, pektik parçalarının meydana gelme kapasitelerinde bir azalma meydana getirerek yoğun sinyal iletimini ayarlama görev aldıkları bildirilmiştir [44]. Pektik maddeler bitki duvarlarında ve orta lamelde oluşan yapısal polisakkaritlerdir [45]. Bu maddeleri, pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup madde oluşturur [46]. Hücre duvarıyla olan alakalarından dolayı poliaminler, yaşlanan dokularda meydana gelen absiyon süresince, artan etilen seviyesiyle azalabilirler. Azalan poliamin seviyesi konsantrasyonu, serbest oligogalakturonit seviyesini artırarak ayrılma tabakasındaki hücrelere sinyallerin engelsiz bir şekilde ulaşmasını sağlayacaktır [19]. Bu durumda absiyonun hızlanmasına neden olacaktır.

Poliaminler, etilen ile antagonistik bir ilişkiye sahiptirler ve gelişimsel süreçte bu ilişkinin bazı durumları açıklanmıştır [47]. Poliaminler, genel olarak putrescine (Put), spermidine (Spd) ve spermine (Spm) olarak bitkilerin bütün dokularında üretilmektedirler [48]. S-adenozilmetiyonin'den (SAM) üretilen S-adenozilmetiyonin dekarboksilazın (SAMDC), Spd ve Spm'nin sentezinde en büyük düzenleyici anahtar rolü oynadığı gibi etilen biyosentezinde öncü rol oynayan ACC'nin (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) de SAM'dan türetilmesiyle bitkilerde etilen üretimi miktarını etkilemede rol oynamaktadır [49].

Gelişmede hücre duvarı metabolizmasındaki etilen ve poliaminlerin ilişkileri hakkında bilinenlere rağmen meyve absisyonu ile olan ilgileri hakkında bilinen çok azdır [49]. Poliaminler büyüme ve gelişme prosesinde hücre duvarı metabolizmasında oynadığı rolün dışında mango ve asma meyve absisyonunu geciktirdiği belirtilmiştir [50, 51]. M.C. Gomez-Jimenez ve arkadaşlarının (2010) absisyona uğrayan ve absisyona uğramayan iki zeytin türünde yaptıkları çalışmada olgun meyve de absisyon bölgelerindeki poliamin seviyeleri ile birlikte diammin oksidaz (DAO), poliamin oksidaz (PAO) ve poliamin biyosentez enzimlerinin aktivitelerine bakmışlar ve olgun meyve absisyonuna olan etkilerini göstermişlerdir. DAO ve PAO'nun absisyon bölgesinin gelişmesi süresince hücre duvarının güçlendirilmesi için gerekli olan H₂O₂'in başlıca sağlayıcısı olarak görev yaptığını ve SAMDC'nin zeytin meyvesinde etilen ve poliamin arasındaki ilişkinin ve poliaminlerin seviyelerinin ayarlanmasında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir [49].

1.4.2 Absisyonla Alakalı Gen Aktivitesi

Absisyonun gerçekleştiği bölgede iki sınıf gen ifade edilmektedir. Birincisi Selülaz aktivitesine sahip hücre duvarı hidrolaz, endo-1,4- β -glukanaz (Selülaz) ve poligalakturonazdır. İkincisi ise patojen ve korumayla alakalı p-1,3-glukanaz, peroksidaz ve kitinaz'dır [20, 22]. Sadece hücre duvarının gevşemesi durumlarında ifade edilirler. Bu genlerin çoğu birçok bitkide karakterize edilip tanımlanmışlardır [52]. Etilenin absisyon bölgesindeki hücreleri uyarılmasından sonra selülaz aktivitesine sahip endo- β -1,4-glukanaz ve polygalakturonaz gibi enzimler sentezlenmeye başlar. Öksinin etkisiyle de bu enzimler baskılanmaktadır [53]. Geniş bir familyaya sahip olan β -1,4-glukanaz'ın *Arabidopsis* genomunda 20'den fazla izoformları bulunmuştur [54]. Zeytinde de meyve oluşumunun farklı aşamalarında üretilen hücre duvarı selülazlar karakterize edilmiştir [55].

İlk olarak meyve olgunlaşmasıyla arttığı tespit edilen *poligalakturonaz*'ın hücre ayrılmasındaki rolü tespit edildikten sonra [56]

absisyondaki rolü ilgi çekmeye başlamış meyve, yaprak ve çiçeklerin dökülmesindeki enzim aktivitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır [57-59]. Poligalakturonazın, bitki hücrelerinin ayrılmasını ve orta lamel ve hücre duvarındaki pektinleri hidroliz ederek gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [60]. Transgenik domates üzerinde yapılan çalışmalar absisyonla alakalı poligalakturonaz'ın meyve yumuşamasıyla alakalı olandan farklı olduğunu göstermiştir [61]. Domateste 9 farklı poligalakturonaz bulunmuştur. Bunlardan biri meyve yumuşamasına özgü [62], birkaçı absisyon bölgesinin ve pistillerin zayıflamasında [63], diğerleri ise yaralanmada ifade olmaktadır [64]. Zeytinde ise meyvenin 4 gelişme aşamasında poligalakturonaz tanımlanmıştır [65].

Bir diğer hücre zarı yumuşamasında ifade olan enzim *ekspansin*dir [66]. İlk olarak *Arabidopsis*'te tanımlanan ekspansin ailesinin bir üyesi *AtEXP10*'un yaprak sapının kökünde yapılan hücre duvarı proteinleri çalışmalarında absisyondaki rolü rapor edilmiştir [67]. Ekspansinlerin absisyondaki rolünün daha ikna edici kanıtları ise, *S.nigra*'nın etilen ile muamelesi sonucu yaprakçıklarının absisyon bölgesinde yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Hücre ayrılması süresince ifadesi artan iki tane dokuya özgü ekspansin karakterize edilmiştir [68].

Absisyonda rol oynayan bir diğer gen *ACC sentaz* ve *ACC oksidaz*'dır (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit). Etilen biyosentezinde en önemli adım S-adenozilmetiyonin'in (SAM) dönüşümü sonucu ACC'nin (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) oluşmasıdır. Bu basamak ACC sentaz tarafından gerçekleştirilir [69]. ACC sentaz ve ACC oksidaz elmada, patateste, domateste, şeftali ve birçok bitkide karakterize edilmiştir [70-72]. Nitekim A. Ferrante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada zeytinde ACC uygulamasıyla etilen üretiminin artarak meyve pediselinin zayıfladığını göstermişlerdir [38].

Absisyonun en önemli düzenleyicilerinden olan etilenin reseptörü *ETR1* *Arabidopsis*'te izole edilmiştir [73]. Ayrıca domateste *ETR1*'in (*eTAE1*)

bir homoloğu tanımlanarak çeşidli dokularda benzer şekilde ifade olduğu gösterilmiştir. Öksinin, absisyon bölgesinin etilene olan duyarlılığını azaltıcı rolünün *aTAE1* proteini seviyesine herhangi bir etkisi olduğu gözlenmemiştir [74]. Yine *Arabidopsis*'te *ETR1* ile temel homoloji gösteren etilen reseptörü olan *ERS* izole edilmiştir [75]. Aynı *ERS* gen homoloğu olan (*tETR*), domateste çiçek absisyon bölgesinde yüksek miktarda ifade edildiği bildirilmiştir [76].

Arabidopsis'te reseptör benzeri protein kinazın (HAESA) çiçek organlarının absisyonunda kritik bir bileşen olduğu, protein kinaz aktivitesi gösteren HAESA'nın bir plazma zarı serin / treonin kinase olduğu ve çiçek organ absisyonunu düzenlediği gösterilmiştir [77].

B. Ruperti ve arkadaşları *Sambucus nigra*'nın yaprakçık absisyon bölgesine etilen uygulamasıyla yaptıkları çalışmada sadece absisyon bölgesi hücrelerinde alerjen benzeri mRNA'ların (Sn20) arttığını gözlemişler ve muhtemelen hücre duvarı gevşemesinde rol oynadıklarını belirtmişler. Ayrıca Sn20'nin, EMBL [78] veritabanında yaptıkları araştırmada zeytinde bulunan başlıca allergen olan Olee1'in peptit gruplarına en yakın homolojiyi gösterdiğini bulmuşlardır [79].

Absisyon'un moleküler biyolojisi ile ilgili bilgilerin artmasıyla meyve dökülmesi kontrolüne daha da yaklaşılmaktadır. Absisyonu etkileyen faktörlerin tam olarak hangi genler ve nasıl kontrol edildiği daha da aydınlatıldıkça bu genlerin sentezinden sorumlu olan transkripsiyon faktörleri keşfedilebilir ve bu faktörler sayesinde istenilen zamanda bitkide istenilen organların dökülmesi sağlanabilir. Bu sayede birçok bitkide hasat kolaylaşarak ürün veriminde artış olabilecektir. Özellikle periyodisite gösteren bitkilerden ekonomik ve besinsel özellikleri açısından en önemli bitkilerden olan zeytinin hasat maliyetini düşürerek ürün veriminde de artış sağlanmış olabilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Örneklerin Toplanması

Projenin çalışma materyali olan zeytinin Uslu ve Kiraz çeşitlerine ait pedisel örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu'na bağlı Gömeç Zeytinliği'nden temin edildi. RNA izolasyonunun eşzamanlı ve sağlıklı olması için örnekler sıvı azot içerisinde getirilerek RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C buzdolabında muhafaza edildi.

2.2 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney bu kitin protokolüne uygun olarak yapıldı: İzolasyon için -80°C dolabından çıkarılan yaprak örnekleri havanda sıvı azotla toz haline getirildi ve sıvı azot buharlaştıktan sonra yaklaşık 100 mg tartılarak santrifüj tüpüne koyuldu. 450 µL RLT tamponu eklenerek vortex ile karıştırılarak homojen olması sağlandı. Pembe kolonun içine örnekler aktarıldı. 2 dk 13000 rpm de santrifüj yapıldı. Dipte kalan tabakaya değmeden sıvı kısım alınarak temiz 1.5 µL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 225 µL etanol eklenerek alt-üst yapıldı. 650 µL alınarak pembe kolonlara aktarıldı. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Alta kalan tabaka dökülerek 700 µL RW1 tamponu eklendi ve 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Alta kalan döküldü. 2 mL'lik temiz toplama tüplerine kolon yerleştirildi ve 500 µL RPE tamponu eklendi. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapıldı aynı işlem birkez daha uygulandı. Bir kez boş santrifüj yapıldı. Son olarak 30 µL RNaz içermeyen su ile 1 dk santrifüj yapılarak örnekler toplama tüplerine aktarıldı. Bu işlem yeni bir toplama tüpü kullanılarak tekrar yapıldı. Böylece toplam RNA izole edilmiş oldu.

2.3 RT-PCR ve cDNA Eldesi:

Elde edilen toplam RNA dan cDNA elde etmek için RevertAid H-minus 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanıldı. 5 µL toplam RNA, 1 µL oligo(dT)₁₈ primer ve 6 µL DEPC'li su karıştırılarak 3-5 sn santrifüj edildi. 5 dk 70°C'de inkübe edildi ve bir süre buzda bekletildi (Bu aşamadan sonraki işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi). 4 µL 5 X tampon, 1 µL ribonuclease inhibitörü, 2 µL dNTP eklenerek 5 dk 37°C'de inkübe edildi. Bu işlemten sonra 1 µL reverse transkriptaz eklendi ve 60 dk 42°C'de ve 10 dk 70°C'de inkübasyon yapıldıktan sonra buzda bekletildi. Böylece tek zincirli cDNA havuzu elde edilmiş oldu.

2.3.1 ssDNA (Second Strand DNA, çift zincir DNA) Eldesi

Bu yöntemde tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. 20 µL cDNA, 8 µL DNA Pol I 10 X tamponu, 68.8 µL nükleaz içermeyen su, 0.2 µL Ribonükleaz H ve 3 µL DNA Polimeraz I eklenerek 2 saat 15°C'de inkübe edildi. Ardından 2.5 µL T4 DNA Polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya) eklenerek 5 dk 15°C'de inkübe edildi (Bu aşama pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile yapılan klonlama için gerçekleştirilmedi). 5 µL 0.5 M EDTA (Ph 8) eklenerek durduruldu.

2.4 ssDNA'nın Saflaştırılması

Bu aşama Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle elde edilen toplam ssDNA hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklendi. Pipetaj yaparak karıştırıldı ve kit ile birlikte gelen kolona aktararak 1 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra altta kalan sıvı dökülerek 750 µL PE tamponu eklendi ve 1 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Alta kalan sıvı dökülerek boş santrifüj yapıldı. Steril 1.5 µL'lik

santrifüj tüpüne alınan kolona 50 µL EB solusyonu eklendi ve 13000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak saflaştırılmış DNA elde edildi.

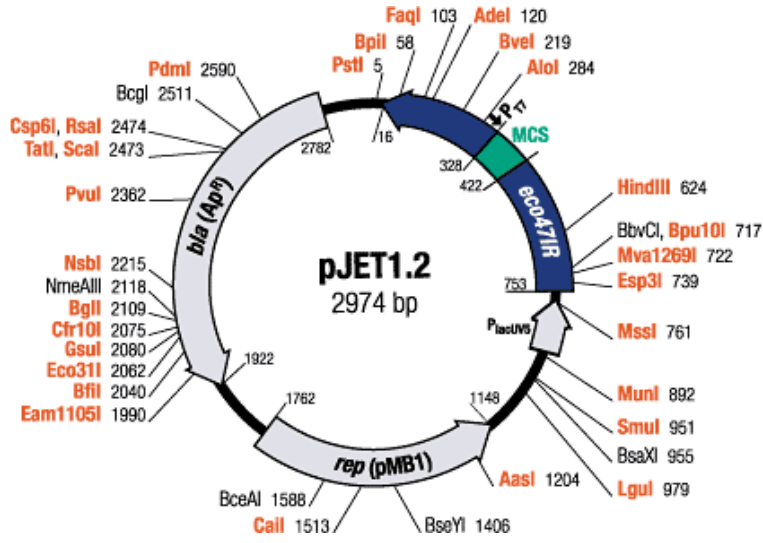
2.5 cDNA Havuzunun Klonlanması ve Transformasyonu

Klonlama için iki ayrı kit; DNA Ligasyon&Transformasyon kiti (Fermentas, Vilnius, Litvanya) ve pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanıldı.

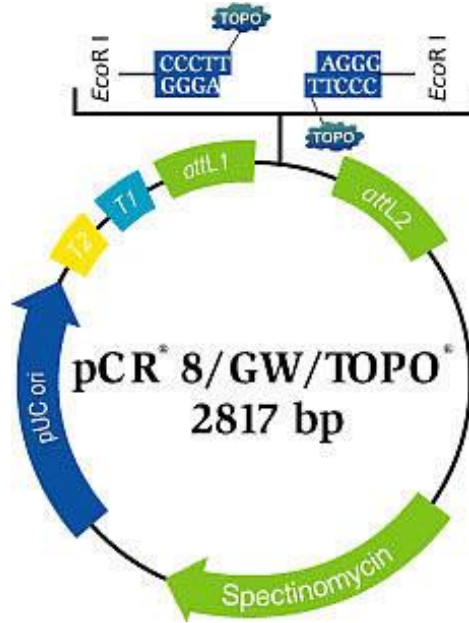
2.5.1 Ligasyon

DNA Ligasyon&Transformasyon Kiti (Fermentas, Vilnius, Litvanya) protokolü basamakları uygulandı. 10 µL 2 X reaksiyon tamponu, 8 µL ssDNA, 1 µL pJET 1.2/ kesik uç klonlama vektörü (Şekil 3'te haritası verilmiştir) ve 1 µL T4 DNA ligaz enzimi karıştırılarak (Toplam hacim 20 µL olacak şekilde) 30 dk 22°C'de inkübasyon yapıldı.

pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA) protokolü basamakları uygulandı. 4 µL ssDNA, 1 µL Salt Solution, 1 µL pCR®8/GW/TOPO® vektörü (Şekil 4'te haritası verilmiştir) karıştırılarak 30 dk 22.5°C'de inkübe edilerek ligasyon işlemi gerçekleştirilmiş oldu.



Şekil 3 pJET 1.2 Klonlama Vektörünün haritası [80].



Şekil 4 pCR®8/GW/TOPO® Vektörünün haritası [81].

2.5.2 Transformasyon İçin Hazırlık Aşamaları

2.5.2.1 LB (Luria-Bertani Broth) Agar Hazırlanması

500 mL LB Agar hazırlamak için; 5 g Tripton, 2.5 g Yeast Agar ve 5 g NaCl 200 mL saf suda çözülerek 7.5 g Agar eklendi ve son hacim 500 mL

olacak şekilde saf su eklenerek otoklavlandı. LB Agar'ın sıcaklığı 37°C'ye indiğinde kullanılacak klonlama kitine uygun antibiyotik (ampisilin veya spektinomisin) eklenerek petrilere döküldü.

2.5.2.2 Sıvı LB Hazırlanması

500 mL LB Agar hazırlamak için; 5 g Tripton, 2.5 g Yeast Agar ve 5 g NaCl 500 mL saf suda çözüldü ve ardından otoklavlandı. 37°C'ye geldiğinde klonlama kitine uygun antibiyotik (ampisilin veya spektinomisin) eklendi.

2.5.2.3 Kompetan Hücre Hazırlanması

E.coli GM 2163 (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kompetan hücresi sıvı LB ile çözüldü. Antibiyotiksiz LB agara tek koloni düşecek şekilde ekim yapılarak 1 gece 37°C'de inkübasyon yapıldı. 10 mL LB (Antibiyotiksiz) içerisine tek koloniden alınıp inokülasyon yapılarak 37°C de 1 gece çalkalayıcı etüvde bekletildi. 250 mL'lik erlen içine 100 mL antibiyotiksiz LB eklenerek ön kültürden 5 mL inoküle edildi ve 37°C de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. Kültürün OD₆₀₀ dalga boyunda 0.4 absorbans değerine ulaşması beklendi. Bu aşamadan sonraki işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi (CaCl₂ ve Gliserol soğuk olarak kullanıldı). 100 mL bakteri solusyonu 50 mL'lik 2 falkon tüplerine alındı ve 3000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüjlendi. Supernatant atılarak 25 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ eklendi ve yavaşça çözüldü. 25 dk buzda bekletildikten sonra 3000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj yapıldı ve sonrasında supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözüldükten sonra 1-4 saat arası buzda bekletildi.

Daha sonra kullanılmak üzere kompetan hücrelere 10 mL steril %40'lık gliserol eklenerek önceden buzda bekletilmiş santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra -80°C'de saklandı.

E.coli GM2163 Genotipi: F⁻ dam-13::Tn9 (Cam'^r) dcm-6 hsdR2 (r_k⁻m_k⁺)
leuB6 hisG4 thi-1 aracC14 lacy1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str'^r)
fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1

2.5.3 Transformasyon

DNA Ligasyon&Transformasyon Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanılarak yapılan ligasyon işleminden sonra transformasyon işlemi için şu protokol uygulandı: Daha önceden hazırlanmış olan kompetan hücreler - 80°C dolabından çıkartılarak buza alındı. 5 µL ligasyon ürünü ile kompetan hücre aynı kültür tüpene alındı ve 20 dk buzda bekletildi. Isı şoku için 42°C'de 90 sn tutulduktan hemen sonra buza alınarak 2 dk bekletildi. Kültür tüplerine 950 µL Antibiyotiksiz LB eklenerek 37°C'de 1.5 saat çalkalandı. Bulanıklaşma gözlendikten sonra tek koloni düşecek şekilde 5 petriye 200 µL olacak şekilde ekim yapıldı. Oluşan koloniler sıvı LB'ye (Ampisilinli) inokülasyon yapılarak 37°C'de 14 - 16 saat inkübasyon yapıldı.

pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak gerçekleştirilen ligasyon sonrası transformasyon için şu basamaklar uygulandı: 6 µL ligasyon ürünü, kit ile temin edilen One Shot® Chemically Competent *E. coli* hücreleriyle karıştırılarak 30 dk buzda bekletildi. Hücreleri 42°C'de 30 sn ısı şokuna maruz bırakılarak hemen ardından buz içerisinde bir süre bekletildi. Kit ile temin edilen S.O.C. Medium'dan 250 µL hücrelerin bulunduğu tüpe ekleyerek 1 saat 37°C'de çalkalandı. Bulanıklaşma gözlendikten sonra tek koloni düşecek şekilde 3 petriye 20 µL, 50 µL ve 180 µL olacak şekilde ekim yapıldı. Oluşan koloniler sıvı LB'ye (Spektinomisinli) inokülasyon yapıldı ve 37°C'de 14 - 16 saat inkübasyon yapıldı (Şekil 6).

2.6 Plazmit İzolasyonu

Bu işlem için GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanıldı ve yöntem kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerden plazmit elde edebilmek için şu işlemler yapıldı: 1.5 µL'lik santrifüj tüplerine 150 µL gliserol ve 850 µL sıvı besiyeri alınıp stok hazırlanarak -80°C de saklandı. Kalan sıvı kültür 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Çökeltiye (pellet) dokunulmadan sıvı kısım atıldı. Ardından 250 µL Resuspension solusyonunda çökelti çözüldü. 250 µL Lysis solusyonu eklenerek alt üst edildi ve devamında 350 µL Neutralizasyon solusyonu eklenerek hemen alt üst edilerek 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant alınıp kolona aktarıldı. 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL yıkama solusyonu eklendi ve 1 dk santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. Bir kez boş santrifüj yapıldıktan sonra kolon toplama tüplerine yerleştirilerek 50 µL EB (Elution Buffer) eklenerek 1 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı ve plazmit izolasyonu tamamlandı.

2.7 *Bgl* II Restriksiyon Enzimi ile Plazmitlerin Kesilerek İnsertlerin Belirlenmesi

Bgl II (Fermentas, Vilnius, Litvanya) restriksiyon enzimi ile pJET1.2 klonlama vektörü (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kesilerek içine giren insert büyüklüğünü tespit etmek için %0.8'lik Agaroz Jel'de yürütülerek görüntülendi. Kesim işlemi için; 7 µL plazmit, 1 µL tampon ve 2 µL *Bgl* II restriksiyon enzimi karıştırıldı ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Bundan sonra kesilen plazmitler %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi

2.8 *EcoR* I Restriksiyon Enzimi ile Plazmitlerin Kesilerek İnsertlerin Belirlenmesi

EcoR I (NEB, Frankfurt, Almanya) restriksiyon enzimi ile pCR8/GW/TOPO klonlama vektörü (Invitrogen, Carlsbad, CA) kesilerek içine giren insert büyüklüğünü tespit etmek için %0.8'lik agaroz jel'de yürütülerek görüntülendi. Kesim işlemi için; 7 µL plazmit, 1 µL tampon ve 2 µL *EcoR* I restriksiyon enzimi karıştırıldı ve 1 gece dk 37°C'de inkübe edildi. Bundan sonra kesilen plazmitler %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

2.9 pCR8/GW/TOPO Plazmitine Ait Primerler Kullanılarak İnsertlerin Belirlenmesi

Elde edilen plazmit örneklerini 9:1 oranında dH₂O ile sulandırılıp, kalıp DNA'dan 1 µL kullanılarak normal PCR koşulları uygulandı ve %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

2.10 DNA Dizileme

Plazmitlerdeki DNA parçalarının büyüklüklerini belirledikten sonra DNA dizilemesi için plazmit örnekleri RefGen'e (Gen Arastirmalari ve Biyoteknoloji, Ankara) gönderildi.

2.11 Bioinformatik Analiz

Elde edilen diziler NCBI Gen Bankası'nda (GenBank) BLAST [82] analizine tabi tutuldu. Gen Bankası'nın hiçbir veritabanında benzeri bulunmayan cDNA'lar hakkında herhangi bir ipucu elde etmek için ise GenomeNet [83] ve Plant Repeat Database [84] gen bankalarında analiz edildi. BioEdit (Hall, 1999), Tandem Repeat Finder (Dr. Gary Benson, 2009)

programları ve RepeatMasker [84] gibi web tabanlı araçlarla biyoinformatik analizler yapıldı.

2.12 Gerçek Zamanlı PZR (Real – Time PCR)

Gerçek Zamanlı PZR için, elde edilen cDNA 'lara uygun 25-30 nükleotit büyüklüğünde yaklaşık 150 nükleotit uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltacak primerler web aracıyla [85] dizayn edildi. Gerçek zamanlı PZR için yukarıda anlatıldığı gibi toplam RNA izolasyonu yapıldı ve daha önce yapıldığı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'lar Dnaz I (Fermentas, Vilnius, Litvanya) ile muamele edilerek real - time PCR için hazır hale getirildi. Bu yöntemle için 2 ayrı çeşitten 2 tane cDNA (toplam 4 cDNA) seçilerek analiz edildi. Daha önce elde edilen Temmuz var yılı ve yok yılı, Kasım var yılı ve yok yılı, meyve, Uslu ve Kiraz meyve sapı cDNA havuzlarında bu 4 genin ifade seviyeleri karşılaştırıldı.

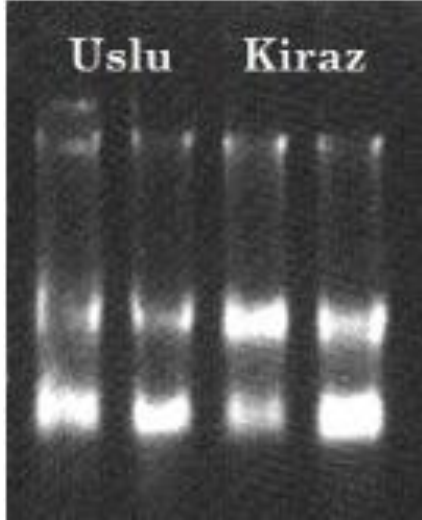
Gerçek zamanlı PZR yöntemi, FastStarr Universal SYBR Green Master (Rox) kitine (Roche, Mannheim, Almanya) uygun olarak gerçekleştirildi. Deney için izlenen prosedür; 5 µL SYBR Green, 1 µL 5' primer, 1 µL 3' primer, 1 µL kalıp cDNA, 2 µL nükleaz içermeyen su ile gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1 cDNA Kütüphanelerinin Oluşturulması

3.1.1 RNA İzolasyonu Sonucu

Materyal ve Metod bölümünde anlatıldığı gibi yapılan toplam RNA izolasyonu sonrasında, RNA'nın sağlamlığı ve konsantrasyonunu görmek için, 5 µL toplam RNA %0.8'lik (etidyum bromidli) agaroz jelde yürütüldü ve fotoğraflandı (Şekil 5).

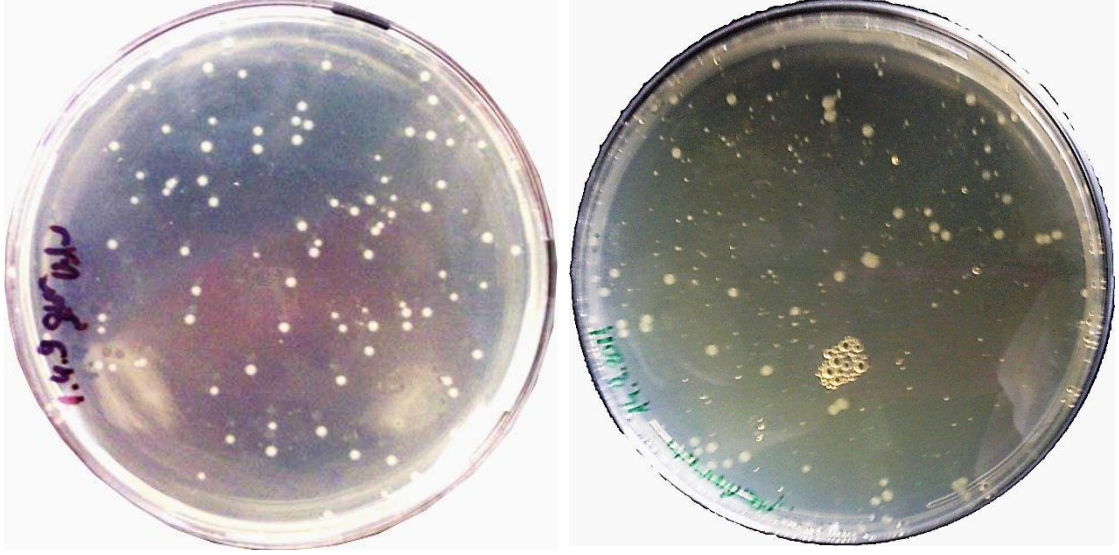


Şekil 5 Uslu ve Kiraz çeşidlerinin pediselinden elde edilen RNA izolasyonu sonucu RNA'nın eşit yüklenerek elde edildiği jel fotoğrafı (Her iki örnek iki farklı kuyucukta yürütüldü).

3.1.2 Transformasyon Sonuçları

Çift zincirli hale getirilmiş cDNA havuzu yöntemlerde anlatıldığı gibi ligasyon sonrasında transformasyona tabi tutuldu ve antibiyotikli (pJET 2.1

için Ampisilin, pCR®8/GW/TOPO® TA için spektinomisin) petri kaplarında üreyen koloniler görüntülendi (Şekil 6).



Şekil 6 Uslu zeytin çeşidine ait iki farklı klonlama kiti kullanılarak yapılan transformasyon sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü (**Soldaki:** DNA Ligasyon&Transformasyon Kiti (Fermentas, Vilnius, Litvanya), **Sağdaki:** pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama Kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA)).

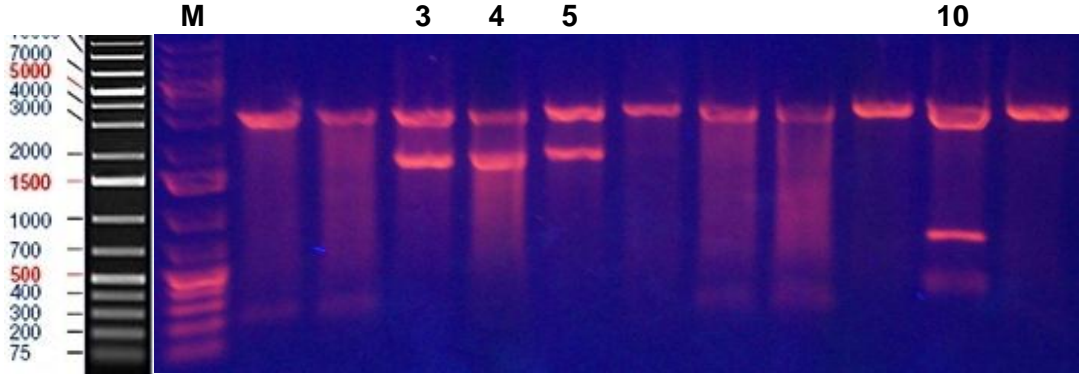
3.1.3 Uslu Pedisel Kütüphanesi İnsertlerinin Analizi

Uslu pedisel kütüphanesini oluşturmak için 200 koloni seçildi. Bunlardan 100 tanesi pJET1.2 klonlama vektörü (Fermentas, Vilnius, Litvanya) ile diğer 100 tanesi pCR®8/GW/TOPO® vektörü (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak üretildi.

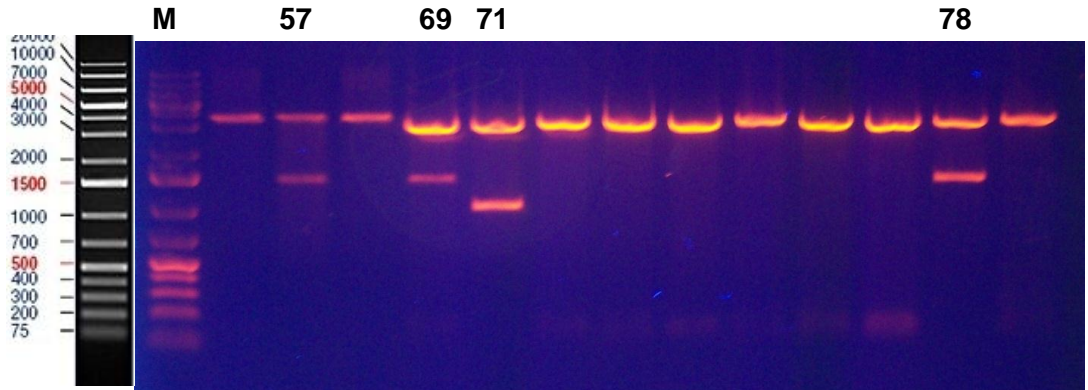
3.1.3.1 pJET Vektörünün *Bgl* II Enzimi ile Kesim Sonuçları

Yöntemlerde anlatıldığı gibi elde edilen plazmitler insertün başında ve sonunda kesim bölgesi bulunan *Bgl* II restriksiyon enzimleriyle (pJET 2.1 vektörü için), pCR®8/GW/TOPO® TA primerleri kullanılarak PCR kurularak

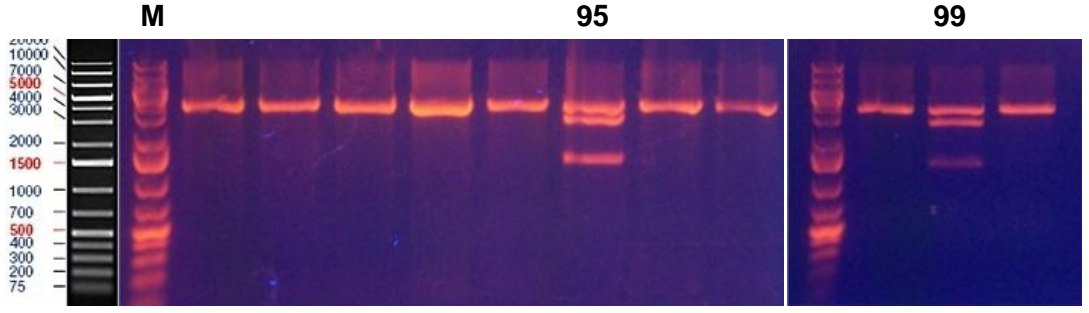
(pCR®8 / GW / TOPO® TA vektörü için) insert varlığı kontrol edildi (Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9).



Şekil 7 Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: koloni numaralarıdır).



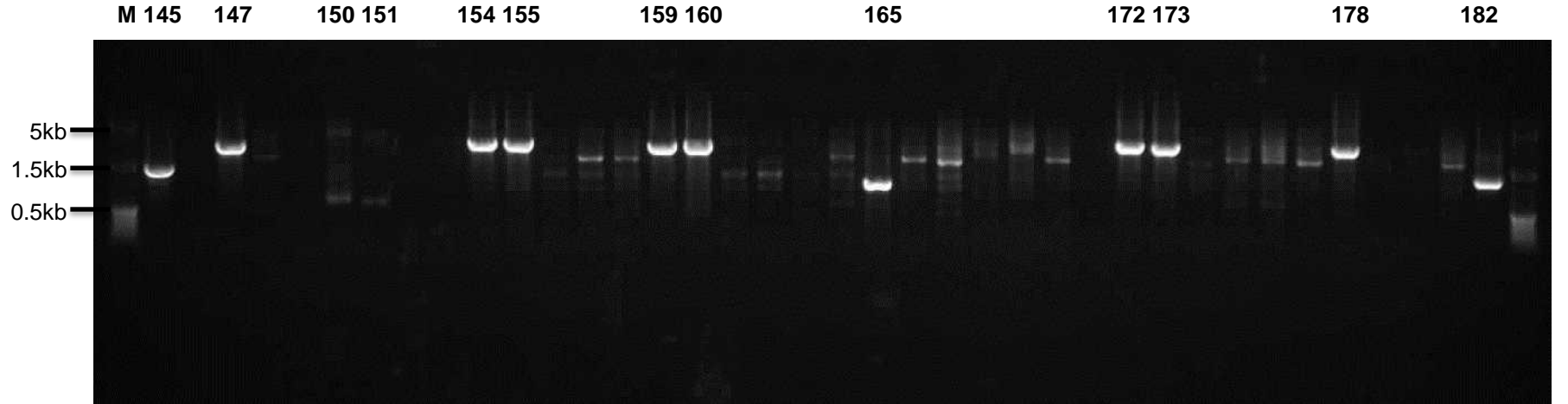
Şekil 8 Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: koloni numaralarıdır).



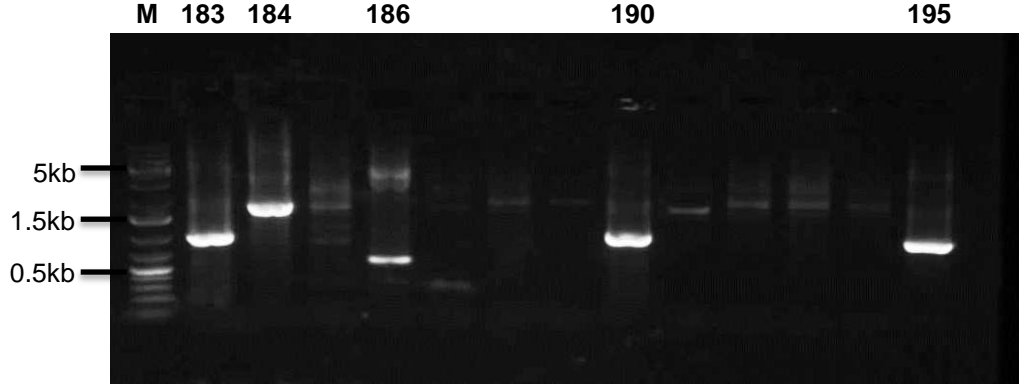
Şekil 9 Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: koloni numaralarıdır).

3.1.3.2 pCR®8/GW/TOPO® Vektörü Primeriyle Yapılan PCR Sonuçları

Restriksiyon öncesi insert içeren plazmitleri tespit etmek için veya restriksiyon enzimlerinin çalışmadığı durumlarda insert tespiti için vektör primerleriyle (insertü çevreleyen primerlerle) PCR yapıldı. Bu PCR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 10 ve Şekil 11’de görülmektedir.



Şekil 10 Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin pCR®8/GW/TOPO® TA primerleriyle yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M:** DNA marker, **Rakamlar:** klon numaralarıdır).



Şekil 11 Uslu zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin pCR®8/GW/TOPO® TA primerleriyle yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).

Uslu pedisel kütüphanesi plazmitlerine ait DNA dizilemesi sonucu dijital olarak elde edilen DNA dizilerinin NCBI web sayfasında öncelikle tekrarsız (nr) veritabanı olmak üzere bütün veritabanlarında BLAST yapılması [86] sonucu elde edilen benzer (homolog) kayıtlar Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1 Uslu pedisel kütüphanesinden (UPK) elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeştiği kayıtlar.

cDNA	Nükleotid Sayısı	Gen Bankasındaki Homolog Dizi	NCBI GenBank ID
UPK 3	1700	Hiç bir kayıda benzeşme yok (dizi okuması başarılı)	
UPK 4-5 - 160	2000	<i>Olea europaea</i> L. 26S rRNA (0e)	AF479171
UPK 10	700	Olive Sative tandem repeat (8e-32)	AJ002766
UPK 57-69-78	2000	<i>Corylus avellana</i> Wall-associated receptor kinase 2 precursor) *	FJ185658
UPK 71	1000	<i>Glycine max</i> transcriptase gene (5e-37) *	gb AF378070
UPK 95-99	5000	<i>Olea europaea</i> microsatellite sequence (1e-30)	gb DQ386909

Tablo 1'in Devamı

UPK 112	4000	Herhangi bir benzeşme göstermemiştir (dizi okuması başarılı) *	
UPK 145	1500	<i>Olea europaea</i> polyubiquitin OUB1 mRNA (0e)	gb AF429429
UPK 147	3000	Herhangi bir benzeşme göstermemiştir (dizi okuması başarısız)	
UPK 150	700	Herhangi bir benzeşme göstermemiştir (dizi okuması başarılı) *	
UPK 151-186	700	<i>Olea europaea</i> PsbJ (psbJ) gene (0e)	gb HQ241937
UPK 154-155-172	3000	<i>Vitis vinifera</i> hexose transporter-like (HT6) (4e-73) *	ref XM_002274379
UPK 159	3000	Herhangi bir benzeşme göstermemiştir (dizi okuması başarısız)	
UPK 165-183-190	1000	<i>Olea europaea</i> Cu/Zn super-oxide dismutase (0e)	emb AJ428575
UPK 173	2000	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 3 clone *	gb AC238465
UPK 184	2000	<i>Nicotiana benthamiana</i> microtubule-associated protein (MAP90) (8e-56)	gb FJ914316
UPK 195	1000	<i>Ricinus communis</i> aldose 1-epimerase (4e-118)	ref XM_002531183

*Bu cDNA'lar EST(Expressed Sequence Tags) databankında *Olea* cinsine ait bir türle hiçbir benzeşme göstermediğinden daha önce bulunmamış oldukları düşünülmektedir.

Tablo 1'de görülen cDNA moleküllerinin benzeştikleri Gen Bankası (GenBank) kayıtları ve benzeşme detayları aşağıda verilmiştir. Benzeşme özellikleri verilirken öncelikle en yüksek benzeşme gösterdiği kayıt alınmış, eğer bu kayıt bir gen / mRNA / protein kaydı değilse (fonksiyon bilgisi içermeyen genomik DNA gibi bir kayıtsa), bir sonraki en yüksek benzeşme gösteren kayıt listelenmiştir. Bu şekilde hiçbir kayıt bulunamadığı durumlarda en çok benzeşme gösteren kayıt not edilmiştir. Bütün bu incelemelerden sonra hala benzer kayıt bulunamadığı durumlarda mevcut

olan bütün açık veri tabanları taranmış ve bunlardaki benzeşmeler kaydedilmiştir. Bu taramalardan sonra hiçbir benzerlik bulunamayan cDNA örnekleri “bilinmeyen” olarak adlandırılmıştır.

UPK 3:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|GQ117662.1](#) *Chionanthus retusus* clone StvCHR_443 microsatellite sequence

Length=430

Score = 84.2 bits (92), Expect = 3e-12

Identities = 103/139 (74%), Gaps = 4/139 (3%)

Strand=Plus/Plus

UPK 4-5-160:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|AF479171.1](#) *Olea europaea* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1603

Score = 1637 bits (886), Expect = 0.0

Identities = 955/983 (97%), Gaps = 26/983 (3%)

Strand=Plus/Minus

UPK 10:

En Yüksek Benzeşme:

[embl|AJ002766.1](#) *Olea europaea* subsp. sativa tandem repeat (pOS218)

Length=218

Score = 148 bits (80), Expect = 9e-32

Identities = 115/132 (88%), Gaps = 1/132 (0%)

UPK 57-69-78:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|FJ185658.1](#) *Corylus avellana* isolate cav.wak.III.11 kinase-like protein gene, partial cds

Length=781

Score = 131 bits (144), Expect = 2e-26

Identities = 172/237 (73%), Gaps = 5/237 (2%)

UPK 71:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|ABD63142.1](#) Retrotransposon gag protein [*Asparagus officinalis*]

Length=1788

Score = 228 bits (580), Expect = 5e-58, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 107/161 (67%), Positives = 129/161 (81%), Gaps = 0/161 (0%)

UPK 95-99:

En yüksek benzeşme:

[gb|AAO13467.1](#) Putative retrovirus-related pol polyprotein [*Oryza sativa* Japonica Group]

[gb|ABF94286.1](#) retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)] Length=556

Score = 183 bits (464), Expect = 1e-44, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 96/191 (51%), Positives = 133/191 (70%), Gaps = 20/191 (10%)

UPK 145:

En yüksek benzeşme:

[gb|AF429429.1|AF429429](#) *Olea europaea* polyubiquitin OUB1 mRNA, complete cds

Length=1184

Score = 939 bits (508), Expect = 0.0

Identities = 510/511 (99%), Gaps = 0/511 (0%)

Strand=Plus/Plus

UPK 151-186:

En yüksek benzeşme:

[gb|HQ241937.1](#) *Olea europaea* PsbJ (psbJ) gene, partial cds; and psbJ-petA intergenic spacer, partial sequence; chloroplast

Length=907

Score = 688 bits (762), Expect = 0.0

Identities = 390/395 (99%), Gaps = 2/395 (1%)

Strand=Plus/Minus

UPK 154-155-172:

En yüksek benzeşme:

[ref|XM_002274379.1](#) **UGM** PREDICTED: *Vitis vinifera* hexose transporter-like (HT6), mRNA Length=2813

[GENE ID: 100232977 HT6](#) | hexose transporter-like [*Vitis vinifera*]

Score = 284 bits (314), Expect = 4e-73

Identities = 264/335 (79%), Gaps = 0/335 (0%)

Strand=Plus/Plus

UPK 165-183-190:

En yüksek benzeşme:

[emb|AJ428575.2](#) *Olea europaea* Cu/Zn super-oxide dismutase (ole e 5 allergen)


Length=714

Score = 1018 bits (1128), Expect = 0.0

Identities = 569/572 (99%), Gaps = 0/572 (0%) Strand=Plus/Plus

UPK 173:

En yüksek benzeşme:

[gb|AC238465.1](#)  *Solanum lycopersicum* chromosome 3 clone C03HBa0241F16,
complete
sequence
Length=133632
Score = 300 bits (332), Expect = 1e-77
Identities = 493/711 (69%), Gaps = 81/711 (11%)
Strand=Plus/Minus


UPK 184:

En yüksek benzeşme:

[gb|FJ914316.1](#) *Nicotiana benthamiana* microtubule-associated protein (MAP90)
mRNA, complete cds
Length=3204
Score = 226 bits (250), Expect = 8e-56
Identities = 314/435 (72%), Gaps = 16/435 (4%)
Strand=Plus/Plus

UPK 195:

En yüksek benzeşme:

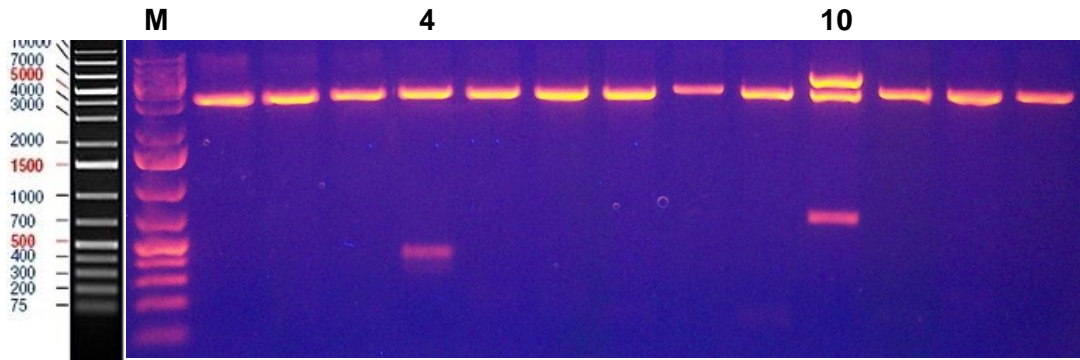
[ref|XM_002531183.1](#)  *Ricinus communis* aldose 1-epimerase, putative, mRNA
Length=726
[GENE ID: 8269030 RCOM_0121410](#) | aldose 1-epimerase, putative [*Ricinus communis*]
Score = 434 bits (480), Expect = 4e-118
Identities = 348/420 (83%), Gaps = 0/420 (0%)
Strand=Plus/Plus

3.1.4 Kiraz Pedisel Kütüphanesi İnsertlerinin Analizi

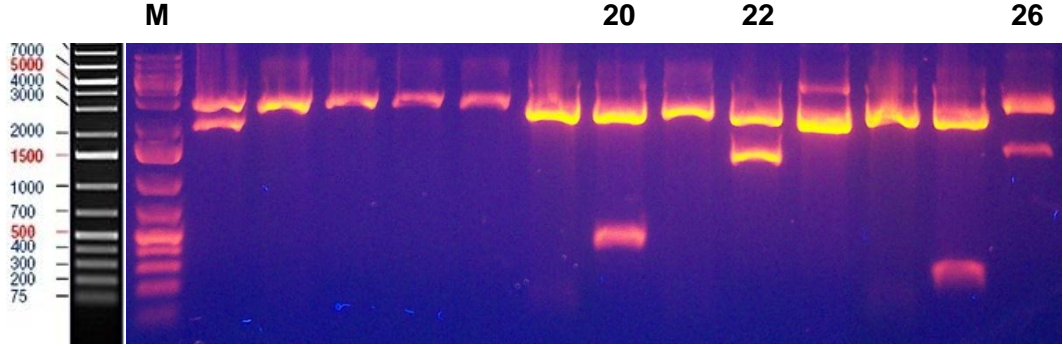
Kiraz pedisel kütüphanesini oluşturmak için seçilen 100 koloni pJET1.2 klonlama vektörü (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanılarak üretildi.

3.1.4.1 pJET Vektörünün *Bgl* II Enzimi Kesim Sonuçları

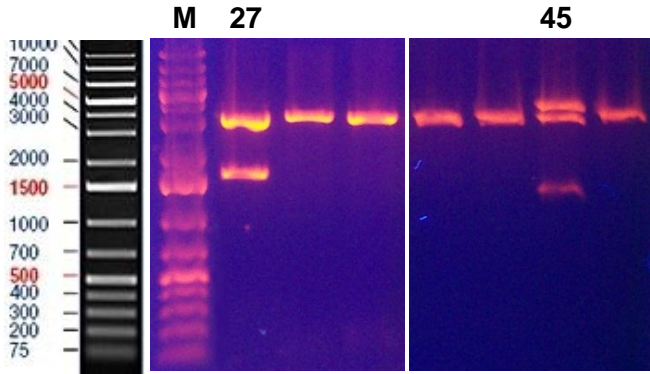
Yöntemlerde anlatıldığı gibi elde edilen plazmitler insertün başında ve sonunda kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimleriyle (pJET 1.2 için *Bgl* II) kesilerek insert varlığı kontrol edildi (Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17).



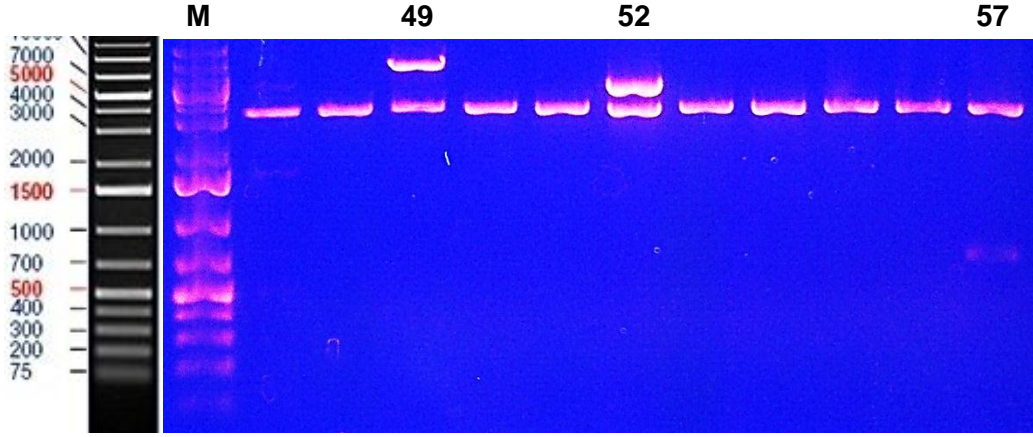
Şekil 12 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü. (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).



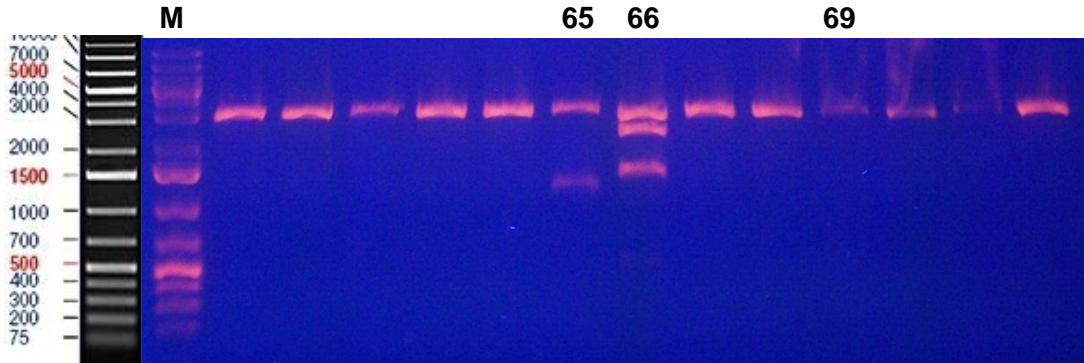
Şekil 13 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü. (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).



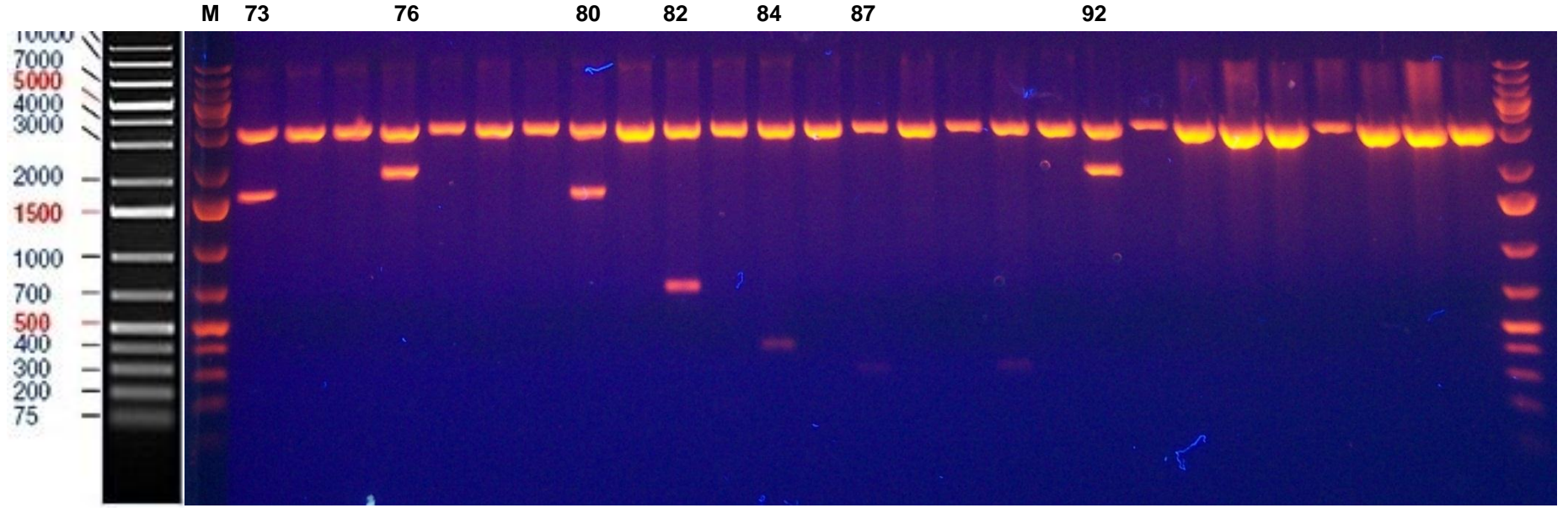
Şekil 14 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü. (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).



Şekil 15 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü. (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).



Şekil 16 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü. (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).

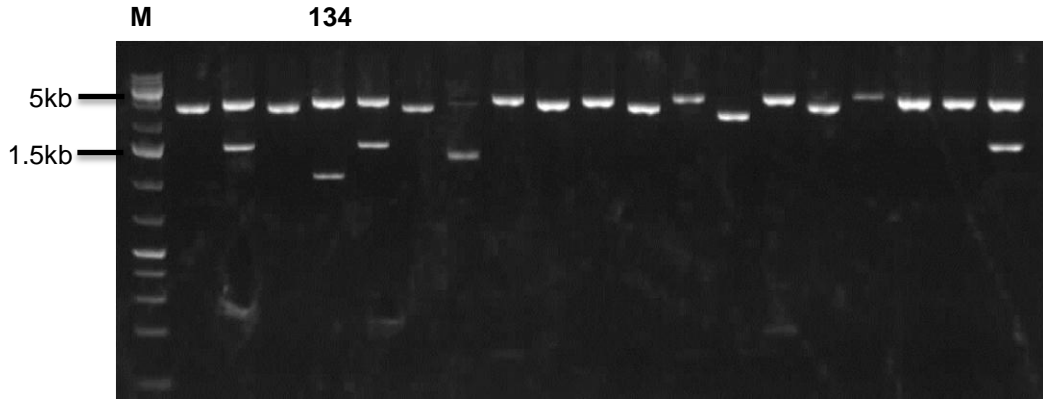


Şekil 17 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*Bgl*II) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).

3.1.4.2 pCR®8/GW/TOPO® Vektörünün *EcoR* I Enzimi Kesim

Sonuçları

Elde edilen plazmitler insertün başında ve sonunda kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimleriyle (pCR®8/GW/TOPO® vektörü için *EcoR* I) kesilerek insert varlığı kontrol edildi (Şekil 18).



Şekil 18 Kiraz zeytin çeşidinin pedisel kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi (*EcoRI*) ile kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü (**M**: DNA marker, **Rakamlar**: klon numaralarıdır).

Kiraz pedisel kütüphanesi plazmitlerine ait DNA dizilemesi sonucu dijital olarak elde edilen DNA dizilerinin NCBI web sayfasında öncelikle tekrarsız (nr) veritabanı olmak üzere bütün veritabanlarında BLAST yapılması [86] sonucu elde edilen benzer (homolog) kayıtlar Tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 2 Kiraz pedisel kütüphanesinden (KPK) elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeştiği kayıtlar.

cDNA	Nükleotid Sayısı	Gen Bankasındaki Homolog Dizi	NCBI GenBank ID
KPK 4	500	<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> microsattellite (2e-08)	gb FJ268736
KPK 10	6000	Hiç bir kayıda benzeşme yok (dizi okuması başarılı) *	
KPK 20-69	500	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein (7e-24)	ref XM_002265113
KPK 22-26-27-73	1550	<i>Ricinus communis</i> serine/arginine rich splicing factor (2e-95)	XM_002532014
KPK 23	1000	Herhangi bir kayda benzeşme yok(dizi okuması başarılı)	
KPK 25	250	<i>Vitis vinifera</i> glutathione-s-transferase 3 (2e-04)	ref XM_002283178
KPK 45	5000	<i>Oryza sativa</i> retrotranspozon (4.9e-17) *	gi 18378606 gb AF458765
KPK 49	7000	<i>Olea europaea</i> Tandem repeat (8e-55)	emb AJ297958
KPK 52	5000	<i>Lycopersicon esculentum</i> 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (2e-23)	gb AF167425
KPK 57-82	700	Soybean clone JCVI-FLGm-9L23 unknown mRNA (8e-26)	gb BT096327
KPK 65	1200	<i>Ricinus communis</i> imidazoleglycerol phosphate dehydratase his7 (5e-140) *	XM_002517093

Tablo 2'nin devamı

KPK 66	4000	<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> Nitrate reductase gene, intron 3 (2e-07)	gb EF113350
KPK 69	550	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein	ref XM_002265 113
KPK 76-92	2000	Herhangi bir benzeşme yok (dizi okuması başarılı) *	
KPK 80	1500	<i>Populus trichocarpa</i> clone POP082-J22, complete sequence *	gb AC214863
KPK 84	400	Herhangi bir benzeşme yok (dizi okuması başarılı) *	
KPK 86	900	<i>Ricinus communis</i> triacylglycerol lipase (2e-92)	XM_002518660
KPK 87	250	<i>Olea europaea</i> partial 25S rRNA gene, IGS and partial 18S rRNA gene (3e-118)	AJ865373
KPK134	1000	<i>Ipomoea batatas</i> microsatellite *	gb GU171970
KPK194	1500	<i>Arabidopsis lyrata</i> metal-dependent phosphohydrolase *	ref XM_002868 616

*Bu cDNA lar EST(Expressed Sequence Tags) databankında *Olea* cinsine ait bir türle hiçbir benzeşme göstermediğinden daha önce bulunmamış cDNA'lar olduğu düşünülmektedir.

Tablo 2'de görülen cDNA moleküllerinin benzeştikleri Gen Bankası (GenBank) kayıtları ve benzeşme detayları aşağıda verilmiştir. Benzeşme

özellikleri verilirken öncelikle en yüksek benzeşme gösterdiği kayıt alınmış, eğer bu kayıt bir gen / mRNA / protein kaydı değilse (fonksiyon bilgisi içermeyen genomik DNA gibi bir kayıtsa), bir sonraki en yüksek benzeşme gösteren kayıt listelenmiştir. Bu şekilde hiçbir kayıt bulunamadığı durumlarda en çok benzeşme gösteren kayıt not edilmiştir. Bütün bu incelemelerden sonra hala benzer kayıt bulunamadığı durumlarda mevcut olan bütün açık veri tabanları taranmış ve bunlardaki benzeşmeler kaydedilmiştir. Bu taramalardan sonra hiçbir benzerlik bulunamayan cDNA örnekleri “bilinmeyen” olarak adlandırılmıştır.

KPK 4:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|FJ268736.1](#) *Olea europaea* subsp. *europaea* microsatellite UDO01 sequence

Length=140

Score = 69.8 bits (76), Expect = 2e-08

Identities = 49/56 (87%), Gaps = 0/56 (0%)

KPK 20 - 69 :

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002265113.1](#) **UG** PREDICTED: *Vitis vinifera* hypothetical protein

LOC100262707 (LOC100262707), mRNA Length=411

[GENE ID: 100262707 LOC100262707](#) | hypothetical protein LOC100262707


[*Vitis vinifera*]

Score = 122 bits (134), Expect = 7e-24

Identities = 131/173 (76%), Gaps = 3/173 (1%)

KPK 22 – 26 – 27 – 73:

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002532014.1](#)  *Ricinus communis* serine/arginine rich splicing factor, putative, mRNA

Length=1207

[GENE ID: 8286289 RCOM_1360340](#) | serine/arginine rich splicing factor, putative [*Ricinus communis*]

Score = 360 bits (398), Expect = 2e-95

Identities = 436/589 (74%), Gaps = 25/589 (4%)

KPK 25:

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002283178.1](#)  PREDICTED: *Vitis vinifera* glutathione S-transferase 3 (GST3), mRNA Length=648


[GENE ID: 100233042 GST3](#) | glutathione S-transferase 3 [*Vitis vinifera*]

Score = 55.4 bits (60), Expect = 2e-04

Identities = 38/42 (91%), Gaps = 1/42 (2%)

KPK 45 :

En Yüksek Benzeşme:

[emb|AM435048.1](#)  *Vitis vinifera*, whole genome shotgun sequence, contig VV78X039811.21, clone ENTAV 115

Length=54367

Score = 257 bits (284), Expect = 8e-65

Identities = 277/367 (75%), Gaps = 0/367 (0%)

Strand=Plus/Minus

Plant Repeat Database Blast analiz sonucu:

>ORSiTERTOOT00014 gi|18378606|gb|AF458765.1| *Oryza sativa* LTR retrotransposon Osr3-1, complete sequence

Length = 5300

Plus Strand HSPs:

Score = 486 (79.0 bits), Expect = 4.9e-17, P = 4.9e-17

Identities = 290/476 (60%), Positives = 290/476 (60%)

KPK 49 :

En Yüksek Benzeşme:

[emb|AJ297958.1](#) *Olea europaea* tandem repeat, isolate OeTaq178


Length=179

Score = 224 bits (121), Expect = 8e-55

Identities = 162/181 (89%), Gaps = 5/181 (2%)

KPK 52 :

En Yüksek Benzeşme:

[gb|AF167425.1](#)  *Lycopersicon esculentum* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase

(ACS5) and LE5-7.2 genes, complete cds

Length=14362

Score = 120 bits (132), Expect = 2e-23

Identities = 135/181 (74%), Gaps = 0/181 (0%)

KPK 57 - 82 :

En Yüksek Benzeşme:

[gb|BT096327.1](#)  Soybean clone JCVI-FLGm-9L23 unknown mRNA

Length=694


Score = 127 bits (140), Expect = 2e-25

Identities = 117/148 (79%), Gaps = 0/148 (0%)

Strand=Plus/Plus

KPK 65 :

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002517093.1](#)  *Ricinus communis* imidazoleglycerol-phosphate dehydratase his7, putative, mRNA

Length=1327

[GENE ID: 8280924 RCOM_0912160](#) | imidazoleglycerol-phosphate dehydratase his7,

putative [*Ricinus communis*]

Score = 504 bits (558), Expect = 5e-140

Identities = 474/600 (79%), Gaps = 3/600 (0%)

KPK 66 :

En Yüksek Benzeşme:

[gb|EF113350.1](#) *Olea europaea* subsp. *europaea* cultivar Arbequina clone 4 NIA gene, intron 3


Length=758

Score = 66.2 bits (72), Expect = 2e-07

Identities = 95/129 (73%), Gaps = 14/129 (10%)

KPK 69 :

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002265113.1](#)  PREDICTED: *Vitis vinifera* hypothetical protein LOC100262707 (LOC100262707), mRNA

Length=411

[GENE ID: 100262707 LOC100262707](#) | hypothetical protein LOC100262707 [*Vitis vinifera*]


Score = 122 bits (134), Expect = 4e-24

Identities = 131/173 (76%), Gaps = 3/173 (2%)

Strand=Plus/Minus

KPK 80:

En yüksek benzeşme:

[gb|AC214863.1](#)  *Populus trichocarpa* clone POP082-J22, complete sequence

Length=102645


Score = 212 bits (234), Expect = 7e-51

Identities = 388/557 (70%), Gaps = 21/557 (4%)

Strand=Plus/Minus

KPK 86 :

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002518660.1](#)  *Ricinus communis* triacylglycerol lipase, putative, mRNA

Length=1318

[GENE ID: 8288145 RCOM_0812160](#) | triacylglycerol lipase, putative

[*Ricinus communis*]

Score = 349 bits (386), Expect = 2e-92

Identities = 422/572 (73%), Gaps = 2/572 (0%)

KPK 87 :

En Yüksek Benzeşme:

[emb|AJ865373.1](#) *Olea europaea* partial 25S rRNA gene, IGS and partial 18S rRNA gene, isolate Dolce Agogia Length=6665

Score = 433 bits (234), Expect = 3e-118

Identities = 234/234 (100%), Gaps = 0/234 (0%)

KPK 134:

En Yüksek Benzeşme:

[gb|GU171970.1](#) *Ipomoea batatas* microsatellite Stv_lpb_1623 sequence

Length=384


Score = 165 bits (182), Expect = 3e-37

Identities = 127/148 (86%), Gaps = 2/148 (1%)

Strand=Plus/Plus

KPK 194:

En Yüksek Benzeşme:

[ref|XM_002868616.1](#)  *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* metal-dependent

phosphohydrolase

HD domain-containing protein, mRNA

Length=1758

[GENE ID: 9304734 ARALYDRAFT_493953](#) | metal-dependent phosphohydrolase

HD

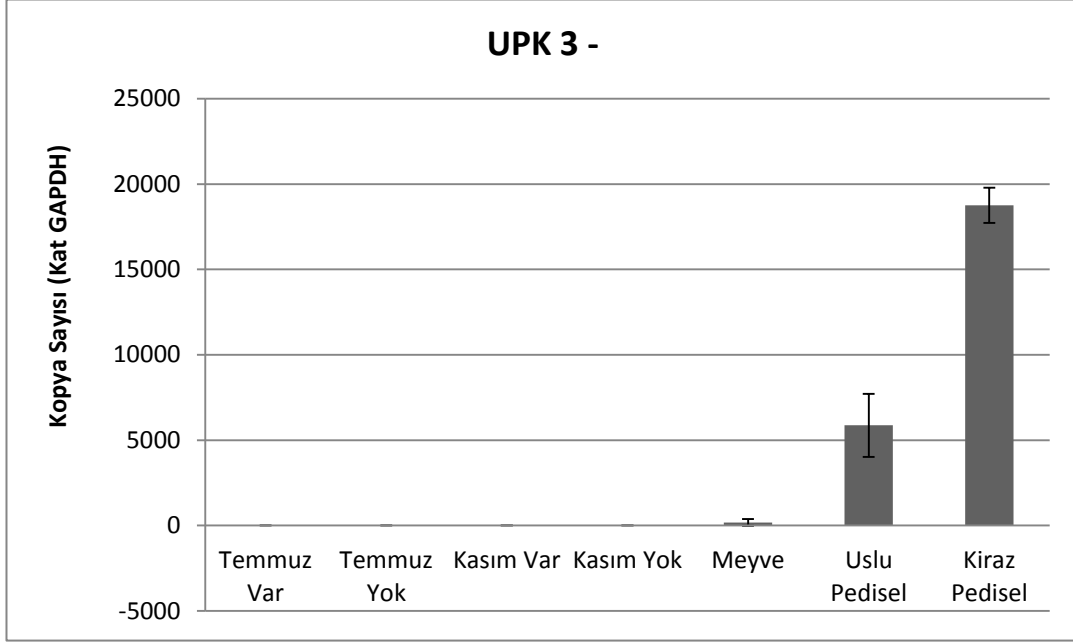
domain-containing protein [*Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*]

Score = 141 bits (156), Expect = 4e-30

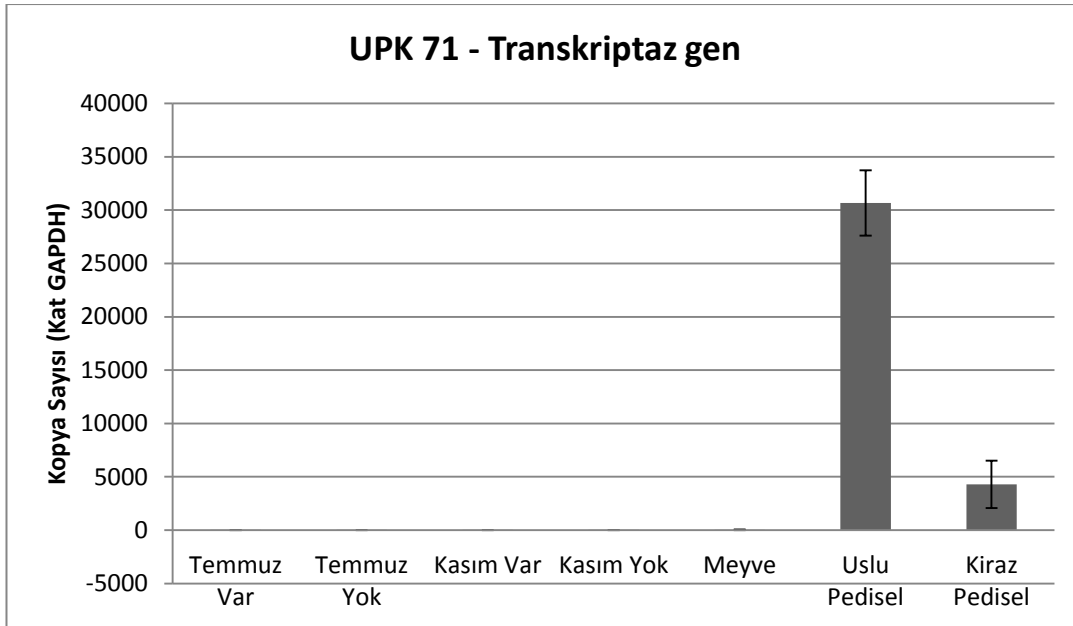
Identities = 162/218 (74%), Gaps = 0/218 (0%)

Strand=Plus/Plus

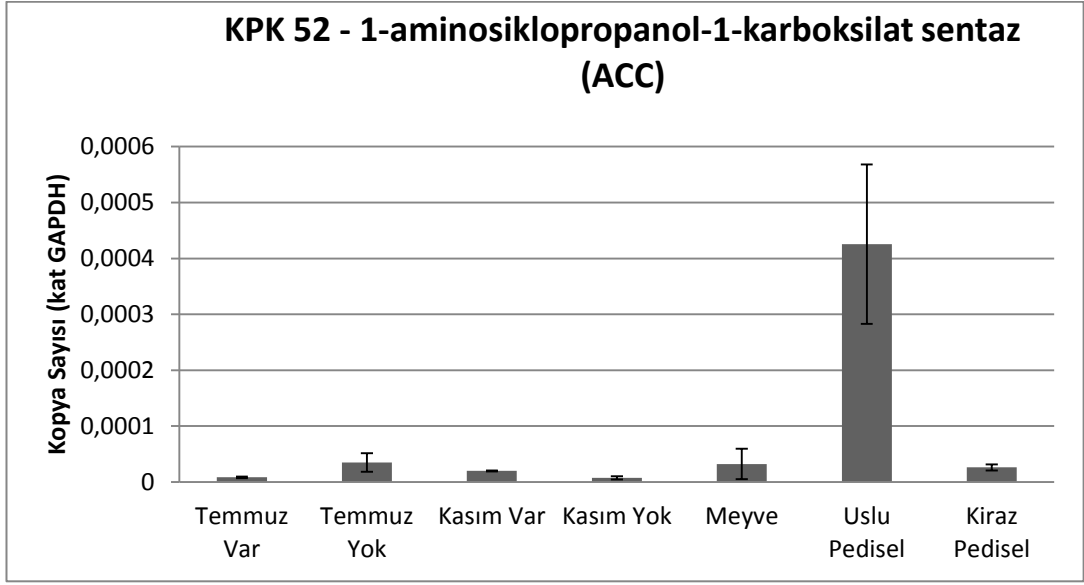
3.2 Gerçek Zamanlı PZR (Real – Time PCR) Sonuçları



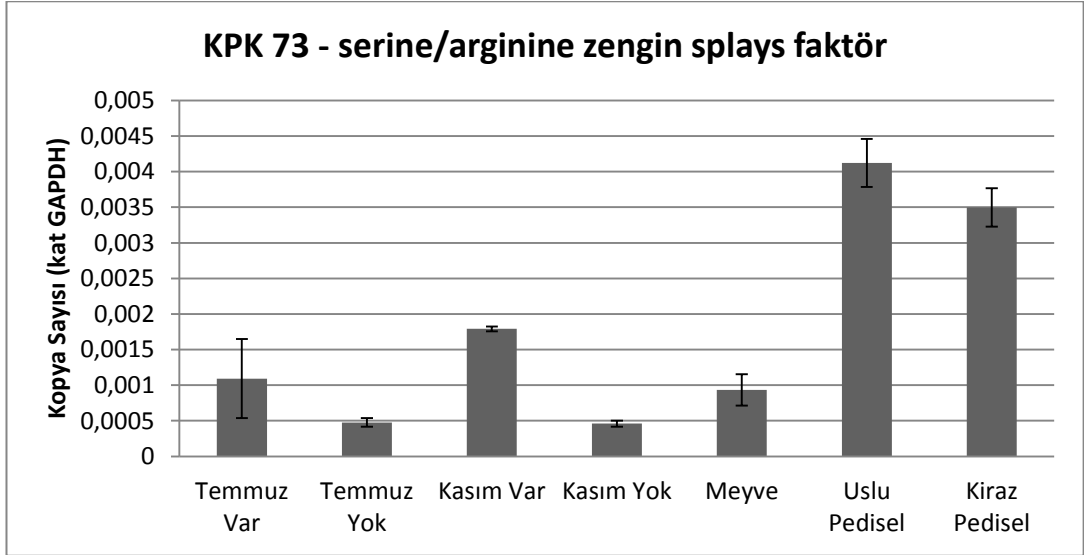
Şekil 19 Uslu pedisel kütüphanesinden elde edilen 3 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik (Normalizatör olarak GAPDH kullanılmıştır).



Şekil 20 Uslu pedisel kütüphanesinden elde edilen 71 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik (Normalizatör olarak GAPDH kullanılmıştır).



Şekil 21 Kiraz pedisel kütüphanesinden elde edilen 52 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik (Normalizatör olarak GAPDH kullanılmıştır).



Şekil 22 Kiraz pedisel kütüphanesinden elde edilen 52 numaralı klonun Temmuz var yılı,yok yılı ve Kasım var yılı, yok yılı yaprak kütüphaneleri, Meyve kütüphanesi, Uslu ve Kiraz pedisel kütüphanelerindeki ifadesinin kopya miktarlarını gösteren grafik (Normalizatör olarak GAPDH kullanılmıştır).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1 Pedisel Kütüphanelerinin Sonuçları

İki zeytin çeşidine ait pedisel kütüphanelerini oluşturmak için 400 koloni seçilmiştir ve bu kolonilerden 53 tanesinin insert aldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu 53 insertten de 36 tane farklı cDNA oldukları tespit edilmiştir. Veritabanlarındaki aramalar sonucunda 36 farklı cDNA'dan 19 tanesi bilinen herhangi bir gen ile anlamlı benzeşmeler göstermiştir. Bu 19 farklı genden 14 tanesinin zeytinde daha önce tanımlanmamış gen olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1 ve Tablo 2). 9 tane insert veritabanında herhangi anlamlı bir benzeşme göstermemiştir. 5 tanesi tekrar dizileri ve mikrosatelit olduğu tespit edilmiştir. 36 cDNA'dan 14 tanesinin EST databankında zeytin ait bir benzeşme göstermemesi bu cDNA'ların ilk olarak bu çalışma ile bulunmuş olduğunu göstermektedir.

Kiraz ve Uslu pedisel kütüphaneleri karşılaştırıldığında elde edilen insertlerden birkaç rRNA, mikrosatellit ve tekrar dizieri dışında bulunan genlere diğer kütüphanelerde (106O616 nolu TUBITAK projesi kapsamında yapılan 4 yaprak kütüphanesi ve 1 meyve kütüphanesi) rastlanmamıştır. Anatomik ve fizyolojik olarak oldukça farklılık gösteren bu iki çeşidin pedisellerinden elde edilen cDNA molekülleri arasındaki bu bariz fark beklenen bir sonuçtur.

4.2 Elde Edilen Genlerin Analizi

Uslu pedisel kütüphanelerinden elde edilen genlerden biri olan WAK ailesinden olan Duvar bağlantılı reseptör kinaz 2 habercisi'dir (Wall-associated receptor kinase 2 precursor). WAK'lar sitoplazma ile hücre duvarı

arasındaki sinyal alışverişini sağlayan aday moleküllerdendir ve duvar ile olan ilişkileri çok güçlüdür. WAK ailesinden olan WAK 2'nin ve habercilerinin, organ bağlanma bölgelerinde, vejetatif meristemlerde ve organların genişlediği alanlarda çoklukla ifade edildiği bildirilmiştir [87]. Ayrıca toplam WAK miktarının azalmasının hücre büyümesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir [87]. Elde edilen cDNA'lardan 3 tanesinin bu gen olması (Tablo 1) pedisel gibi bir organ bağlantı bölgesinde çoklukla bulunmasıyla alakalı olduğunu düşündürmektedir. Zeytinde daha önce tanımlanmamış olması ve Uslu çeşidinde 3 tane bulunması da dikkat çekmektedir.

Daha önce zeytinde bulunmuş olan PsbJ geni, kloroplastta bulunan çok geniş protein kompleksine sahip fotosistem II'nin en küçük polipeptitlerinden birini kodlamaktadır. Bu genin yokluğunda fototropik olarak bitki büyümesinin gerçekleşemediği gösterilmiştir [88].

Heksoz taşıyıcı (Hexose transporter) benzeri elde edilen gene UPK154, UPK155, UPK172 klonlarında rastlanmıştır. Zeytinde daha önce tanımlanmamış olan bu gen ailesinin birçok üyesi bazı bitkilerde klonlanıp karakterize edilmiştir [89-91]. Karbohidratların fotosentetik olarak üretildiği organlardan fotosentetik olmayan organlara taşınmasında görev alan taşıma proteinleridir [91]. Gelişme aşamasında bir çok doku ve organda spesifik olarak ifade olduğu gösterilmiştir [92].

UPK165, UPK183 ve UPK190'da rastlanan Cu/Zn superoksit dismutaz geni (SOD) oksijenli solunum yapan canlılar için hayati önem sahiptir. Zeytinde tanımlanan Olee5 allerjen olduğunu görmüşler [93]. Ayrıca domateste yapılan çalışmada, çeşitli stres koşulları altında bitkinin koruma mekanizması olarak rol oynadığını belirtmişler. Yine aynı çalışmada domatese etilen salınımını sağlayan etefon püskürterek Cu / Zn SOD geninin ifade seviyesinin arttığını gözlemişler [94]. Daha önce yapılmış olan *Sambucus nigra*'nın yaprakçıklarındaki absisyon bölgesinde ifade olan allerjen benzeri genin [79], zeytinde allerjen olan Cu / Zn SOD geni ile karşılaştırıldığında absisyonla alakası olabileceği düşünülmektedir.

Mikrotübül bağlantılı protein (MAP90), bitki hücrelerinin değişmesinde hayati öneme sahip mikrotübüllerin hareketlerini ve organizasyonlarını ayarlamaktadır [95].

Elde edilen bir diğer gen ise serin / arjinin zengin splays faktör'dür (serine/arginine rich splicing factor). SR proteinleri alternatif splays bölgelerinin seçimini yapmaktadır [96]. İki görevleri vardır. Birincisi, SR proteinler önemli splays faktörlerdir ve splays süresince intronları kapsayan protein-protein etkileşimlerine sebep olmasıdır. İkincisi, komşu intronlara splays komponentlerini toplar ve ekzonik enhansırlara bağlar. Sonraki aktivitesinde, alternatif splays ve splays bölgelerini tanımasıdır [97]. Real - time PCR sonuçlarına göre bu genin Uslu ve Kiraz pedisellerinde diğer organlara göre yaklaşık 2-3 kat fazla olması pedisel'de daha fazla alternatif splays olduğunu düşündürmektedir. İlerleyen çalışmalarda bu genlerin ifade seviyelerine başka çeşitlerde de bakılarak bu genler hakkında daha fazla yorum yapılabilecektir.

Kiraz pedisel kütüphanesinden elde edilmiş genlerden biri olan glutatyonin-s-transferaz teta ağır metal kirliliği, oksidatif stres ve patojen saldırıları gibi sayısız strese cevap vermede görev alır [98].

1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentaz (ACC sentaz) geni daha öncede anlatıldığı gibi etilen biyosentezinin öncü molekülü olan ACC'yi katalizlemektedir. Yeterli miktarda ACC'nin meyve pedisel bağlantısını zayıflatarak absisyonu hızlandırdığı zeytinlede yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [38]. Ayrıca gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakılacak olursa Uslu pediselinde diğer Kiraz pediselinden, meyve ve yapraklara göre yaklaşık 7 kat daha fazla sentezlendiği görülmektedir. Uslunun meyvesini kolay dökken bir çeşit olması nedeniyle bu genin Uslu pediselindeki ifadesinin fazla olmasının nedenini açıklar niteliktedir.

İmidazolgliserol fosfat dehidrataz his7'nin (İmidazoleglycerol-phosphate dehydratase his7) ise histidin biyosentezini katalizleyen

enzimlerden biri olan ve 9 karmaşık adımda sentezlenen histidinin 6 adımını katalizleyen imidazol gliserol fosfat dehidrataz olduğu belirtilmiştir [99].

Triaçilgliserol lipaz, triaçilgliseroller ester bağlarını katalizleyen bir enzim olarak görev yapmaktadır. Triaçilgliseroller ökaryotlarda karbon ve enerji açısından önemli kaynaklardandır [100]. *Arabidopsis*'te yapılan çalışmada *triaçilgliserol lipaz*'ın çiçek gövdesi, kök, çiçek ve yaprak gibi organlarda fazla miktarda ifade edildiği belirtilmiştir [101]. Pedisel gibi besin deposu az olan bir dokuda bulunması ilgi çekici olmakla birlikte meyveyle olan yakın alakasından dolayı bağlanma bölgesinde bulunabileceği akla gelmektedir. Daha sonraki gerçek zamanlı PZR çalışmalarında bu genin meyvedeki ifade seviyesi tespit edilerek pediselle arasındaki bağlantıya açıklık getirilebilecektir.

Hareketli genetik element olan retrotranspozonlar mRNA aracılığı ile genom içerisinde yerini değiştirmektedir [102]. Kromozomlar arasında yer değiştiren bu elementler kalıcı mutasyonlara sebep olmaktadır. Bitkilerin abiyotik ve biyotik strese maruz kaldığında retrotranspozonların ifade seviyesinin arttığı bildirilmiştir [103, 104]. Bazı retrotranspozonların mutasyonlar yoluyla genleri düzenleyici etkiye sahip olması ile ve DNA tamirini gerçekleştirilmesiyle yararlı olabileceği de belirtilmiştir [105, 106].

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarında UPK 3 numaralı bilinmeyen cDNA'nın 'Kiraz' pediselinde daha yüksek bulunması bu genin Kiraz'a özgü olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Daha fazla bilgi bu bilinmeyen genin tanımlanması ve diğer türlerdeki ifade seviyelerini incelemekle olacaktır.

Daha ileriki çalışmalarda, bulunan genlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonları tespit edilip zamana ve çeşitlere bağlı olan ekspresyon seviyeleri kontrol edilmesi amaçlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Zohary, D., Spiegel-Roy, P., "Beginnings of fruit growing in the old world", *Science*, **187**/4174 (1975) 319-327.
- [2] Fabbri, A., Lambardi, M., Ozden-Tokatli, Y., *Olive Breeding*, in *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, S.M. Jain, Priyadarshan, P. M., Editor. Springer New York. (2009) 423-465.
- [3] Ülger, S., Baktır, İ., Kaynak, L., "Zeytinlerde Periyodisite ve Çiçek Tomurcuğu Oluşumu Üzerine İçsel Büyüme Hormonlarının Etkilerinin Saptanması", *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, **3**/23, (1999) 619-623.
- [4] Hatzopoulos, P., Georgios Banilas Katerina Giannoulia Fotis Gazis Nikos Nikoloudakis Dimitra Milioni Kosmas Haralampidis, "Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree", *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**/9-10, (2002) 574-586.
- [5] Therios, I.N., *Olives*, CABI, Wallingford; Cambridge, MA, (2009).
- [6] Wallander, E.A., Victor A., "Phylogeny and Classification of Oleaceae Based on rps16 and trnL-F Sequence Data", *American Journal of Botany*, **87**/12, (2000) 1827-1841.
- [7] Kockar, F., Ilikci, R., "Investigations of genetic variation between olive (*Olea europaea* L.) cultivars using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)", *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **58**/11-12, (2003) 837-842.
- [8] Sessiz, A., Özcan, M. T., "Olive removal with pneumatic branch shaker and abscission chemical", *Journal of Food Engineering*, **76**/2, (2006) 148-153.
- [9] www.fao.org, (01.05.2011).
- [10] www.zae.gov.tr, (01.05.2011).
- [11] Hartmann, H., Heslop, A., Whisler J., "Chemical induction of fruit abscission in olives", *Cal Ag*, **22**/7, (1968) 14-16.
- [12] Polito, V.S., Shimon, L., "Anatomical and Histochemical Aspects of Ethephon-Induced Leaf Abscission in Olive (*Olea europaea* L.)", *Botanical Gazette*, **141**/4, (1980) 413-417.

- [13] Ferrante, A., Hunter, D. A., Reid, M.S., *The effect of topical application of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on olive fruit abscission*, in *Proceedings of the 4th International Conference on Postharvest Science, Vols 1 and 2*, R. BenArie and S. PhilosophHadas, Editors. International Society Horticultural Science: Leuven 1. (2001) 125-126.
- [14] Ozgenturk, N.O., Oruc, F., Sezerman, U., Kucukural, A., Korkut, S. V., Toksoz, F., Un, C., "Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea europaea* L", *Comparative and Functional Genomics*, **2010**, (2010).
- [15] Kato, S., Ohtoko, K., Ohtake, H., Kimura, T., "Vector-Capping: A Simple Method for Preparing a High-Quality Full-Length cDNA Library", *DNA Research*, **12/1**, (2005) 53-62.
- [16] Ying, S.Y., *Generation of cDNA libraries: methods and protocols*, Humana Press, (2003).
- [17] Dundar, E., Suakar, O., "Mining olive genome through library sequencing and bioinformatics: Novel sequences and new microsatellites", *African Journal of Biotechnology*, **9/17**, (2010) 2499-2509.
- [18] Ganino, T., Rapoport, H. F., Fabbri, A., "Anatomy of the olive inflorescence axis at flowering and fruiting", *Scientia Horticulturae*, **129/2**, (2011) 213-219.
- [19] Taylor, J.E., Whitelaw, C.A., "Signals in abscission", *New Phytologist*, **151/2**, (2001) 323-340.
- [20] Sexton, R., *Abscission*, in *Plant growth and development: hormones and environment*, M. Pessaraki, Editor. CRC Press. (1995) 205-228.
- [21] Srivastava, L.M., *Fruit Development and Ripening*, in *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press. (2002) 420.
- [22] Srivastava, L.M., *Vegetative Storage Protein, Tuberization, Senescence, and Abscission*, in *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press. (2002) 474-498.
- [23] Castillo-Llanque, F., Rapoport, H. F., "Identifying the location of olive fruit abscission", *Scientia Horticulturae*, **120/2**, (2009) 292-295.
- [24] Brown, K.M., "Ethylene and abscission", *Physiologia Plantarum*, **100/3**, (1997) 567-576.
- [25] Périn, C., Gomez-Jimenez, M.C., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J.-C., Latché, A., Pitrat, M., Lelièvre, J.-M., "Molecular and Genetic

Characterization of a Non-Climacteric Phenotype in Melon Reveals Two Loci Conferring Altered Ethylene Response in Fruit", *Plant Physiology*, **129**/1, (2002) 300-309.

- [26] Lewis, M.W., Leslie, M.E., Liljegren, S.J., "Plant separation: 50 ways to leave your mother", *Current Opinion in Plant Biology*, **9**/1, (2006) 59-65.
- [27] Addicott, F.T., *Abscission*, University of California Press, (1983) 113-122.
- [28] Abeles, F.B., Leather, G. R., "Abscission: Control of cellulase secretion by ethylene", *Planta*, **97**/1, (1971) 87-91.
- [29] Roberts, J.A., Schindler, C.B., Tucker, G.A., "Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor", *Planta*, **160**/2, (1984) 159-163.
- [30] Doorn, V., Wouter, G., "Effect of Ethylene on Flower Abscission: a Survey", *Annals of Botany*, **89**/6, (2002) 689-693.
- [31] Abeles, F.B., "Role of RNA and Protein Synthesis in Abscission", *Plant Physiology*, **43**/9, (1968) 1577-1586.
- [32] Patterson, S.E., Bleecker, A.B., "Ethylene-Dependent and -Independent Processes Associated with Floral Organ Abscission in Arabidopsis", *Plant Physiology*, **134**/1, (2004) 194-203.
- [33] Rugini, E., Bonghi, G., Fontanazza, G., "Effects of Etephon on Olive Ripening", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **107**/5, (1982) 835-838.
- [34] Lavee, S., Martin, G.C., "Ethylene evolution from various developing organs of olive (*Olea europaea*) after excision", *Physiologia Plantarum*, **51**/1, (1981) 33-38.
- [35] Kende, H., *Ethylene biosynthesis*, 44. Annual Reviews, Palo Alto, CA, ETATS-UNIS, (1993).
- [36] Denney, J.O., Martin, G.C., *Etephon Tissue Penetration And Harvest Effectiveness In Olive As A Function Of Solution Ph, Application Time, And Ba Or Naa Addition*, 119. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, ETATS-UNIS, (1994) 8.
- [37] Lavee, S., Martin, George C., "Ethylene Evolution following Treatment with 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid and Etephon in an in Vitro Olive Shoot System in Relation to Leaf Abscission", *Plant Physiol.*, **67**/6, (1981) 1204-1207.

- [38] Ferrante, A., Hunter, D. A., Reid, M.S., "Towards a molecular strategy for improving harvesting of olives (*Olea europaea* L.)", *Postharvest Biology and Technology*, **31/2**, (2004) 111-117.
- [39] Riov, J., Dagan, E., Goren, R., Yang, S.F., "Characterization of Abscisic Acid-Induced Ethylene Production in Citrus Leaf and Tomato Fruit Tissues", *Plant Physiology*, **92/1**, (1990) 48-53.
- [40] Cracker, L.E., Abeles, F. B., "Abscission: Role of Abscisic Acid", *Plant Physiology*, **44/8**, (1969) 1144-1149.
- [41] Kitsaki, C.K., Vemmos, S. N., Tzoutzoukou, C. G., "Changes of Respiration Rate, Ethylene Evolution, and Abscisic Acid Content in Developing Inflorescence and Young Fruit of Olive (*Olea europaea* L. *Konservolia*)", *Journal of Plant Growth Regulation*, **18/1**, (1999) 1-7.
- [42] Miyamoto, K., Oka, M., Ueda, J., "Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development", *Physiologia Plantarum*, **100**, (1997) 631-638.
- [43] Branca, C., Delorenzo, G., Cervone, F., "Competitive-Inhibition Of The Auxin-Induced Elongation By Alpha-D-Oligogalacturonides In Pea Stem Segments", *Physiologia Plantarum*, **72/3**, (1988) 499-504.
- [44] Messiaen, J., Van Cutsem, P., "Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction", *Planta*, **208/2**, (1999) 247-256.
- [45] Maraş, M., Çavuşoğlu, K., Aksöz, E., Kırındı, T., "Pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize pektinaz enziminin yapısal analizi", *İTÜ Dergisi*, **1**, (2004) 3-10.
- [46] Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis", *Plant Molecular Biology*, **47/1**, (2001) 9-27.
- [47] Liu, J., Nada, K., Pang, X., Honda, C., Kitashiba, H., Moriguchi, T., "Role of polyamines in peach fruit development and storage", *Tree Physiology*, **26/6**, (2006) 791-798.
- [48] Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., "Polyamines and environmental challenges: recent development", *Plant Science*, **140/2**, (1999) 103-125.
- [49] Gomez-Jimenez, M.C., Paredes, M.A., Gallardo, M.S.-C., Isabel M., "Mature fruit abscission is associated with up-regulation of polyamine metabolism in the olive abscission zone", *Journal of Plant Physiology*, **167/17**, (2010) 1432-1441.

- [50] Malik, A.U., Singh, Z, Abscission of mango fruitlets as influenced by biosynthesis of polyamines, 78. Headley, Ashford, ROYAUME-UNI, (2003) 7.
- [51] Aziz, A., Brun, O., Audran, J.-C., "Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*)", *Physiologia Plantarum*, **113**/1, (2001) 50-58.
- [52] Koehler, S.M., Matters, G.L., Nath, P., Kemmerer, E.C., Tucker, M.L., "The gene promoter for a bean abscission cellulase is ethylene-induced in transgenic tomato and shows high sequence conservation with a soybean abscission cellulase", *Plant Molecular Biology*, **31**/3, (1996) 595-606.
- [53] Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., Casadoro, G., "Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach", *Plant Molecular Biology*, **20**/5, (1992) 839-848.
- [54] del Campillo, E., *2 Multiple Endo-1, 4-[beta]-D-glucanase (Cellulase) Genes in Arabidopsis*, in *Current Topics in Developmental Biology*, A.P. Roger and P.S. Gerald, Editors. Academic Press. (1999) 39-56, 56A, 57-61.
- [55] Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., Heredia, A., Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit, 93. Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI, (1995).
- [56] Fischer, R.L., Bennett, A.B., Role of cell wall hydrolases in fruit ripening, 42. Annual Reviews, Palo Alto, CA, ETATS-UNIS, (1991) 29.
- [57] Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., and Casadoro, G., "Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach", *Plant Molecular Biology*, **20**/5, (1992) 839-848.
- [58] Taylor, J.E., Webb, S. T. J., Coupe, S. A., Tucker, G A., Roberts, J. A., "Changes in Polygalacturonase Activity and Solubility of Polyuronides during Ethylene-stimulated Leaf Abscission in *Sambucus nigra*", *Journal of Experimental Botany*, **44**/1, (1993) 93-98.
- [59] Tucker, G.A., Schindler, C. B., Roberts, J. A., "Flower abscission in mutant tomato plants", *Planta*, **160**/2, (1984) 164-167.
- [60] Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth", *The Plant Journal*, **3**/1, (1993) 1-30.

- [61] Taylor, J.E., Tucker, G. A., Lasslett, Y., Smith, C. J. S., Arnold, C. M., Watson, C. F., Schuch, W., Grierson, D., Roberts, J. A., "Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants", *Planta*, **183**/1, (1991) 133-138.
- [62] DellaPenna, D., Alexander, D. C., Bennett, A. B., "Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**/17, (1986) 6420-6424.
- [63] Kalaitzis, P., Koehler, S.M., Tucker, M.L., "Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission", *Plant Molecular Biology*, **28**/4, (1995) 647-656.
- [64] Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D.S., Ryan, C.A., "A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**/4, (1999) 1756-1760.
- [65] Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A., "Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit", *Physiologia Plantarum*, **93**/4, (1995) 651-658.
- [66] Cosgrove, D.J., "New genes and new biological roles for expansins", *Current Opinion in Plant Biology*, **3**/1, (2000) 73-78.
- [67] Cho, H.-T., Cosgrove, D.J., "Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**/17, (2000) 9783-9788.
- [68] Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J. A., McQueen-Mason, S., "Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*", *Journal of Experimental Botany*, **56**/413, (2005) 817-823.
- [69] Lau, O.L., Liu, Y., Yang, S. F., Effects of fruit detachment on ethylene biosynthesis and loss of flesh firmness, skin color, and starch in ripening golden delicious apples, 111. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, ETATS-UNIS, (1986).
- [70] Destéfano-Beltrán, L.J.C., Caeneghem, W., Gielen, J., Richard, L., Montagu, M., Straeten, D., "Characterization of three members of the ACC synthase gene family in *Solanum tuberosum* L", *Molecular and General Genetics MGG*, **246**/4, (1995) 496-508.
- [71] Dong, J.G., Kim, W.T., Yip, W. K., Thompson, G.A., Li, L., Bennett, A.B., Yang, S.F., "Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-

- 1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit", *Planta*, **185**/1, (1991) 38-45.
- [72] Rasori, A., Bertolasi, B., Furini, A., Bonghi, C., Tonutti, P., Ramina, A., "Functional analysis of peach ACC oxidase promoters in transgenic tomato and in ripening peach fruit", *Plant Science*, **165**/3, (2003) 523-530.
- [73] Schaller, G.E., Bleecker, A.B., "Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene", **270**/5243, (1995) 1809-1811.
- [74] Zhou, D., Kalaitzis, P., Mattoo, Autar K., Tucker, M.L., "The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues", *Plant Molecular Biology*, **30**/6, (1996) 1331-1338.
- [75] Hua, J., Chang, C., Sun, Q., "Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene", *Journal Name: Science; Journal Volume: 269; Journal Issue: 5231; Other Information: PBD: 22 Sep 1995*, (1995) Medium: X; Size: pp. 1712-1714.
- [76] Payton, S., Fray, R.G., Brown, S., Grierson, D., "Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission", *Plant Molecular Biology*, **31**/6, (1996) 1227-1231.
- [77] Jinn, T.-L., Stone, J.M., Walker, J.C., "HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission", *Genes & Development*, **14**/1, (2000) 108-117.
- [78] <http://www.ebi.ac.uk/embl/>, (06.07.2011).
- [79] Ruperti, B., Whitelaw, C. A., Roberts, J. A., "Isolation and expression of an allergen-like mRNA from ethylene-treated *Sambucus nigra* leaflet abscission zones", *Journal of Experimental Botany*, **50**/334, (1999) 733-734.
- [80] <http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pjet12>, (06.07.2011).
- [81] <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K250020>, (06.07.2011).
- [82] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, (06.07.2011).
- [83] <http://www.genome.jp/>, (06.07.2011).
- [84] <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>, (06.07.2011).

- [85] <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, (06.07.2011).
- [86] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, (06.07.2011).
- [87] Kohorn, B.D., "WAKs; cell wall associated kinases", *Current Opinion in Cell Biology*, **13**/5, (2001) 529-533.
- [88] Hager, M., Hermann, M., Biehler, K., Krieger-Liszkay, A., Bock, R., "Lack of the Small Plastid-encoded PsbJ Polypeptide Results in a Defective Water-splitting Apparatus of Photosystem II, Reduced Photosystem I Levels, and Hypersensitivity to Light", *Journal of Biological Chemistry*, **277**/16, (2002) 14031-14039.
- [89] Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B., Ward, J.M., "The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing", *The Plant Cell Online*, **11**/4, (1999) 707-726.
- [90] Weig, A., Franz, J., Sauer, N., Komor, E., Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers, 143. Elsevier, Munich, ALLEMAGNE, (1994).
- [91] Gear, M.L., McPhillips, M.L., Patrick, J.W., McCurdy, D.W., "Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization", *Plant Molecular Biology*, **44**/5, (2000) 687-697.
- [92] Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J., van Tunen, A.J., "Hexose Transport in Growing *Petunia* Pollen Tubes and Characterization of a Pollen-Specific, Putative Monosaccharide Transporter", *Plant Physiology*, **118**/1, (1998) 297-304.
- [93] Butteroni, C., Afferni, C., Barletta, B., Iacovacci, P., Corinti, S., Brunetto, B., Tinghino, R., Ariano, R., Panzani, R. C., Pini, C., Di Felice, G., "Cloning and Expression of the (*Olea europaea*) Allergen Ole e 5, the Pollen Cu/Zn Superoxide Dismutase", *International Archives of Allergy and Immunology*, **137**/1, (2005) 9-17.
- [94] Perl-Treves, R., Galun, E., "The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress", *Plant Molecular Biology*, **17**/4, (1991) 745-760.
- [95] Lloyd, C., Hussey, P., "Microtubule-associated proteins in plants [mdash] why we need a map", *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**/1, (2001) 40-47.
- [96] Gui, J.F., Tronchère, H., Chandler, S.D., Fu, X.D., "Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich

pre-mRNA splicing factors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91/23**, (1994) 10824-10828.

- [97] Hertel, K.J., Maniatis, T., "Serine arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96/6**, (1999) 2651-2655.
- [98] Marrs, K.A., "The Function and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants", *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, **47/1**, (1996) 127.
- [99] Sinha, S.C., Chaudhuri, B.N., Burgner, J.W., Yakovleva, G., Davisson, V.J., Smith, J.L., "Crystal Structure of Imidazole Glycerol-phosphate Dehydratase", *Journal of Biological Chemistry*, **279/15**, (2004) 15491-15498.
- [100] El-Kouhen, K., Blangy, S., Ortiz, E., Gardies, A.-M., Ferté, N., Arondel, V., "Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in Arabidopsis homologous to mammalian acid lipases", *FEBS Letters*, **579/27**, (2005) 6067-6073.
- [101] Padham, A.K., Hopkins, M.T., Wang, T.-W., McNamara, L.M., Lo, M., Richardson, L.G.L., Smith, M.D., Taylor, C.A., Thompson, J.E., "Characterization of a Plastid Triacylglycerol Lipase from Arabidopsis", *Plant Physiology*, **143/3**, (2007) 1372-1384.
- [102] Kumar, A., Bennetzen, J.L., Plant retrotransposons, 33. Annual Reviews, Palo Alto, CA, ETATS-UNIS, (1999).
- [103] Hirochika, H., Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture, 12. Nature Publishing Group, London, ROYAUME-UNI, (1993).
- [104] Mhiri, C., De Witt, P.J.G.M., Grandbastien, M.-A., Activation of the promoter of the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, 12. APS Press, St. Paul, MN, ETATS-UNIS, (1999).
- [105] Moore, J.K., Haber, J.E., "Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks", *Nature*, **383/6601**, (1996) 644-646.
- [106] Wessler, S.R., Bureau, T.E., White, S.E., "LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes", *Current Opinion in Genetics & Development*, **5/6**, (1995) 814-821.