



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ



ZEYTİNDE (*Olea europaea* L.) STRİGOLAKTON BİYOSENTEZİNDE

ROL ALAN GENLERİN KARAKTERİZASYONU

Ashhan ÖZBİLEN

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

Not: Tez kapağı yüksek lisans tezlerinde “Turkuaz”, doktora tezlerinde “Mavi” dir.

(Tez basımı aşamasında bu sayfa basılmayacaktır. Tez dış kapak örneğidir)

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

ZEYTİNDE (*Olea europaea L.*) STRİGOLAKTON
BİYOSENTEZİNDE ROL ALAN GENLERİN
KARAKTERİZASYONU

Ashhan ÖZBİLEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 28/06/2019

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN

ANAkkALE

Aslıhan ÖZBİLEN tarafından Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN yönetiminde hazırlanan ve **28/06/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Zeytinde (*Olea europaea L.*) Strigolakton Biyosentezinde Rol Alan Genlerin Karakterizasyonu**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN

.....

Başkan

Prof. Dr. Cüneyt AKI

.....

Üye

Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

.....

Üye

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

.....

Üye

Prof. Dr. Seyhun YURDUGÜL

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Aslıhan ÖZBİLEN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca; bilgi ve tecrübesi ile yolumu aydınlatan, olumsuzlukları aşmamda hoşgörüsünü, sabrını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, önerileriyle yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN'a bilimin asıl anlamını kavramam konusunda sağladığı destek ve bana ayırmış olduğu değerli zamanı için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince Tez İzleme Komitemde bulunarak değerli fikirleriyle çalışmama katkıda bulunan hocalarım Prof. Dr. Cüneyt AKI ve Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER'e, ayrıca tez savunma jürimde bulunan Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI ve Prof. Dr. Seyhun YURDUGÜL hocalarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, aynı laboratuvarı paylaştığım Fatih SEZER'e ve Uğur SAPMAZ'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın hiçbir döneminde emeklerini ve desteklerini esirgemeyen, daima bana inanan, güvenen ve yol gösteren aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında maddi olarak verdikleri desteklerden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na, bursiyeri olduğum 2150543 No'lu 1001 projesi için TÜBİTAK'a ve zeytin materyallerini temin ettiğim Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü'ne ve çalışanlarına teşekkür ederim.

2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Aslıhan ÖZBİLEN
Çanakkale, Haziran 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

3' RACE	3' Rapid Amplification of cDNA Ends
5' RACE	5' Rapid Amplification of cDNA Ends
aa	Aminoasit
AMF	Arbüsküler Mikorizal Fungus
bç	Baz çifti
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CoCl ₂	Kobalt klorür
CT	Threshold Cycle, Eşik değeri döngüsü
cv	Kültür varyetesi
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DEPC	Dietil pirokarbonat
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
GSP	Gen spesifik primer
kb	Kilobaz
KL	Karlakton
L	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar

µm	Mikrometre
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
pH	Power of Hydrogen, asitlik ya da bazlık derecesi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rac-GR24	Racemic GR24
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PZR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Sig	Significance, istatistiksel olarak anlam değeri
SL	Strigolaktonlar
sn	Saniye
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRA	Sequence Read Archive
TAE	Tris asetat EDTA
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
Tm	Melting Temperature, Erime Sıcaklığı
u	Ünite
UV	Ultraviyole
WT	Yabanıl tip
%	Yüzde değeri
°C	Santigrat derece

ÖZET

ZEYTİNDE (*Olea europaea* L.) STRİGOLAKTON BİYOSENTEZİNDE ROL ALAN GENLERİN KARAKTERİZASYONU

Aslıhan ÖZBİLEN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN

28/06/2019, 203

Strigolaktonlar (SL), bitkilerde fitohormon görevi yapan ve ayrıca sinyal molekülü olarak köklerden rizosfere salınan karotenoid kökenli metabolitlerdir. SL kök çevresinde parazit bitki tohumlarını çimlenmeye teşvik eder ve arbüsküler mikorizal fungusların bitkiler ile ilişkilerini düzenler. SL bitki hormonu olarak ise, gövde dallanmasını, kök gelişimini ve internod uzaklıklarını düzenleyerek bitki mimarisini kontrol ederler. Bu tez çalışmasında, zeytinde (*Olea europaea* L.) SL'nin biyosentezi, algılanması ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin (*D27*, *MAX3*, *MAX4*, *MAX1*, *D14* ve *MAX2*) mRNA dizileri RACE yöntemi ile ilk kez ortaya çıkarılmış ve veri bankalarındaki mevcut bilgiler kullanılarak biyoinformatik analizler yapılmıştır. Ayrıca zeytine ait kök, yaprak, apikal ve lateral tomurcuklarda bu genlerin anlatım profilleri belirlenmiştir. Ayvalık ve Domat çeşidi tohum, embriyo ve çeliklerin gelişimleri üzerine *in vitro* ve *in vivo* şartlarda SL analogu *rac*-GR24 ve inhibitörü TIS108'in etkileri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, SL'nin zeytinde dallanma şeklini ve çeliklerde kök gelişimini düzenlediği, ayrıca doku kültürü şartlarında kullanılan eksplant ve genotipe bağlı olarak etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Böylece SL'nin zeytin tarımı ve ıslahında kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu sonuçlar, SL'nin ekonomik önemi olan diğer çok yıllık odunsu bitkilerin tarımı ve ıslahında da kullanılma potansiyeli olduğunu işaret etmiştir.

Anahtar sözcükler: Strigolaktonlar, Gövde Dallanması, Zeytin, Çimlenme, Köklenme, Gerçek Zamanlı PZR

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE GENES INVOLVED IN STRIGOLACTONE BIOSYNTHESIS IN OLIVE (*Olea europaea* L.)

Aslıhan ÖZBİLEN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Biology

Advisor : Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN

28/06/2019, 203

Strigolactones (SLs) are carotenoid derived metabolites that are exuded to the rhizosphere from the roots as signalling molecules and also acts as phytohormones in plants. SLs induce germination of parasitic plant seeds and regulates arbuscular mycorrhizal fungi relationship with plants in rhizosphere. As plant hormones, SLs control plant architecture by regulating shoot branching, root development and internode length. In this study, mRNA sequences of the genes which are responsible for SLs biosynthesis, perception and signalling (*D27*, *MAX3*, *MAX4*, *MAX1*, *D14* and *MAX2*) are revealed in olive (*Olea europaea* L.) for the first time and bioinformatic analysis are performed with using available databases. Additionally, expression profiles of these genes are determined in olive root, leaf, apical and lateral buds. SL analogue *rac*-GR24 and inhibitor TIS108's effects on Ayvalık and Domat seed, embryo and cutting development in *in vitro* and *in vivo* conditions are also determined. As a result, it is revealed that SLs regulate shoot branching and rooting of cuttings in olive and show explant and genotype dependent effects in tissue culture conditions. Thus, our results showed that SLs could be used in olive agriculture and breeding. Moreover, these results point out the potential utilization of SLs in agriculture and breeding of other economically important woody plants.

Keywords: Strigolactones, Shoot Branching, Olive, Germination, Rooting, Real-Time PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Strigolaktonlar.....	1
1.1.1. Strigolaktonların Görevleri.....	2
1.1.2. Strigolaktonların Biyosentez Yolağı	3
1.1.3. Algılanma ve Sinyalizasyon	5
1.1.4. Strigolaktonların Çeşitleri	6
1.2. Zeytin Bitkisi.....	8
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	12
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. RACE Çalışmaları.....	26
3.1.1. Bitki Materyali ve RNA İzolasyonu.....	26
3.1.2. Zeytin Transkript Dizileri ile Primer Dizaynı	28
3.1.3. 3' RACE Çalışmaları.....	29
3.1.4. 5' RACE Çalışmaları.....	33
3.1.5. Transkriptlerin Orta Bölgelerinin Çoğaltımı	36
3.1.6. RACE Sonuçlarının Değerlendirilmesi	37
3.2. Biyoinformatik Analizler	38
3.3. Gen Anlatım Çalışmaları.....	40
3.3.1. Bitki Materyali.....	40
3.3.2. RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi.....	41
3.3.3. qPCR için Primer Dizaynı ve Verimlilik Çalışmaları	41
3.3.4. SYBR Green Methodu ile Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	42
3.4. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Doku Kültürü Çalışmaları	45

3.4.1. Tohumların Hazırlanması	46
3.4.2. <i>rac</i> -GR24 ve TIS108 Uygulamaları	48
3.4.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi	50
3.4.4. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon)	53
3.4.5. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	56
3.5. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Çelik Köklendirme Çalışmaları.....	57
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	60
4.1. RACE Çalışmaları.....	60
4.1.1. Bitki Materyali ve RNA İzolasyonu	60
4.1.2. RACE Çalışmaları İçin Seçilen Primerler	60
4.1.3. 3'RACE Çalışmaları.....	63
4.1.4. 5'RACE Çalışmaları.....	69
4.1.5. Transkriptlerin Orta Bölgelerinin Çoğaltımı	73
4.1.6. RACE Sonuçlarının Değerlendirilmesi	74
4.2. Biyoinformatik Analizler	83
4.2.1. <i>D27</i>	83
4.2.2. <i>MAX3</i>	86
4.2.3. <i>MAX4</i>	89
4.2.4. <i>MAX1</i>	93
4.2.5. <i>D14</i>	97
4.2.6. <i>MAX2</i>	102
4.2.7. Sylvestris Muhtemel SL Proteinlerinin Özellikleri	108
4.2.8. Promotor Analizleri	110
4.3. Gen Anlatımı Çalışmaları	111
4.4. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Doku Kültürü Çalışmaları	124
4.4.1. Çimlenme Oranları ve Kök Boyları	125
4.4.2. Yan Dal Sayıları ve İnternod Uzunlukları	138
4.5. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Çelik Köklendirme Çalışmaları.....	164
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	172
KAYNAKLAR	177
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Strigolaktonların genel yapısı (5-deoksistrigol)	1
Şekil 1.2. SL biyosentez yolağı (plastid içindeki kısmı)	4
Şekil 1.3. SL biyosentez yolağı (sitozoldeki kısmı)	5
Şekil 1.4. 2017 yılında dünyada zeytin üretimi (ton, http://www.fao.org/faostat , erişim 25.04.2019)	9
Şekil 3.1. Ayvalık çeşidine ait köklendirilmiş çelikler	26
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan marker haritası	27
Şekil 3.3. RACE çalışmaları için dizayn edilen primerlerin yerleşimi (Şekil üzerinde 3' RACE çalışmaları için seçilen primerlerin yerleşimi gösterilmektedir).....	29
Şekil 3.4. 3' RACE yöntemi	30
Şekil 3.5. 5' RACE yöntemi	34
Şekil 3.6. qPZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere toplanan Ayvalık dokuları	40
Şekil 3.7. Gerçek Zamanlı PZR için örnek bir çoğalma düzlemi	43
Şekil 3.8. Edremit Zeytincilik Üretim İstasyon Müdürlüğü'nden temin edilen meyve örnekleri	45
Şekil 3.9. Zeytin meyvesinin kısımları	46
Şekil 3.10. Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait meyve çekirdekleri	46
Şekil 3.11. Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohumlar	47
Şekil 3.12. Zeytin tohumlarında embriyonun tohum kabuğu ile endosperm dokusundan ayrılması.....	48
Şekil 3.13. Uygulamalarda kullanılan <i>rac</i> -GR24 ve TIS108.....	48
Şekil 3.14. Doku kültürü uygulamalarının gerçekleştirildiği steril kabin.....	50
Şekil 3.15. Kültüre alınan tohum (a) ve embriyolar (b).....	51
Şekil 3.16. Bitki yetiştirme kabinine alınan petri kapları	52
Şekil 3.17. Bitkilerin kök uzunluklarının steril kabin içerisinde ölçümü	53
Şekil 3.18. Bitkilerin doku kültürü ortamından dış ortama aktarımı	54
Şekil 3.19. Dış ortama aktarılan ve nem miktarının korunması amacıyla üzeri kapatılan bitkiler	55
Şekil 3.20. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde doku kültüründe yetiştirilen bitkilerde a) yan dal sayımı ve b) internod uzaklıkları ölçümü	56
Şekil 3.21. Köklendirme denemelerinde kullanılan zeytin çelikleri.....	58
Şekil 3.22. Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü'nde Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait çeliklere hormon uygulaması (1. gün).....	59
Şekil 3.23. Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü'nde Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait çeliklere hormon uygulaması (10. hafta).....	59
Şekil 4.1. RACE çalışmalarında kullanılan total kök RNA'ları	60
Şekil 4.2. <i>D27</i> geni için 3'RACE sonuçları.....	64
Şekil 4.3. <i>MAX3</i> geni için 3'RACE sonuçları	64
Şekil 4.4. <i>MAX4</i> geni için 3'RACE sonuçları	65
Şekil 4.5. <i>MAX1</i> geni için 3'RACE sonuçları	66
Şekil 4.6. <i>D14</i> geni için 3'RACE sonuçları.....	67
Şekil 4.7. <i>MAX2</i> geni için 3'RACE sonuçları	68
Şekil 4.8. <i>D27</i> geni için 5'RACE sonuçları.....	69
Şekil 4.9. <i>MAX3</i> geni için 5'RACE sonuçları	70
Şekil 4.10. <i>MAX4</i> geni için 5'RACE sonuçları	71
Şekil 4.11. <i>MAX1</i> geni için 5'RACE sonuçları	71
Şekil 4.12. <i>D14</i> geni için 5'RACE sonuçları.....	72

Şekil 4.13. MAX2 geni için 5'RACE sonuçları	73
Şekil 4.14. MAX2, D14 ve D27 genleri için orta bölgelerin çoğaltımı PZR sonuçları.....	74
Şekil 4.15. D27 genine ait birleştirilmiş okumalar	75
Şekil 4.16. Konsensüs D27 dizisi için BLAST sonucu	76
Şekil 4.17. MAX3 genine ait birleştirilmiş okumalar.....	77
Şekil 4.18. Konsensüs MAX3 dizisi için BLAST sonucu	78
Şekil 4.19. MAX4 genine ait birleştirilmiş okumalar.....	78
Şekil 4.20. Konsensüs MAX4 dizisi için BLAST sonucu	79
Şekil 4.21. MAX1 genine ait birleştirilmiş okumalar.....	80
Şekil 4.22. Konsensüs MAX1 dizisi için BLAST sonucu	80
Şekil 4.23. D14 genine ait birleştirilmiş okumalar	81
Şekil 4.24. Konsensüs D14 dizisi için BLAST sonucu	81
Şekil 4.25. MAX2 genine ait birleştirilmiş okumalar.....	82
Şekil 4. 26. Konsensüs MAX2 dizisi için BLAST sonucu	83
Şekil 4.27. D27 protein dizilerinin hizalanması	84
Şekil 4.28. Hizalanan D27 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel D27 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir...	84
Şekil 4.29. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036252 no'lu genomik bölge.....	85
Şekil 4.30. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019231930 no'lu genomik bölge..	86
Şekil 4.31. MAX3 protein dizilerinin hizalanması	87
Şekil 4.32. Hizalanan MAX3 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX3 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir	88
Şekil 4.33. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036252 no'lu genomik bölge.....	89
Şekil 4.34. MAX4 protein dizilerinin hizalanması	90
Şekil 4.35. Hizalanan MAX4 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX4 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir	91
Şekil 4.36. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036255 no'lu genomik bölge.....	92
Şekil 4.37. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019243807 no'lu genomik bölge..	93
Şekil 4.38. MAX1 protein dizilerinin hizalanması	94
Şekil 4.39. Hizalanan MAX1 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX1 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir	95
Şekil 4.40. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019249854 no'lu genomik bölge..	96
Şekil 4.41. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019233108 no'lu genomik bölge...	97
Şekil 4.42. D14 protein dizilerinin hizalanması	98
Şekil 4.43. Hizalanan D14 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel D14 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir...	99
Şekil 4.44. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036254 no'lu genomik bölge.....	101
Şekil 4.45. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036246 no'lu genomik bölge.....	101
Şekil 4.46. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019237586 no'lu genomik bölge	101
Şekil 4.47. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019264872 no'lu genomik bölge	102
Şekil 4.48. MAX2 protein dizilerinin hizalanması	103
Şekil 4.49. Hizalanan MAX2 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX2 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir	104
Şekil 4.50. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019266413 no'lu genomik bölge	105
Şekil 4.51. Sylvestris çeşidinde biyoinformatik analizler sonucu elde edilen diziler (Pembe renkli kutucuklar genomik bölgeleri, mavi renkli kutucuklar transkriptleri ve	

yeşil renkli kutucuklar ise proteinleri temsil etmektedir)	107
Şekil 4.52. Promotor analizleri sonucu tespit edilen cis-acting elementler	110
Şekil 4.53. qPZR çalışmalarında kullanılan RNA örnekleri	111
Şekil 4.54. D27 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	112
Şekil 4.55. MAX3 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	113
Şekil 4.56. MAX4 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	114
Şekil 4.57. MAX1 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	115
Şekil 4.58. D14 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	116
Şekil 4.59. MAX2 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi	117
Şekil 4.60. SL primerlerinin erime eğrisi analizleri	118
Şekil 4.61. D27 qPZR anlatım sonucu	119
Şekil 4.62. MAX3 qPZR anlatım sonucu	120
Şekil 4.63. MAX4 qPZR anlatım sonucu	121
Şekil 4.64. MAX1 qPZR anlatım sonucu	122
Şekil 4.65. D14 qPZR anlatım sonucu	123
Şekil 4.66. MAX2 qPZR anlatım sonucu	124
Şekil 4.67. Ayvalık tohum ve embriyolarında çimlenme hızları	125
Şekil 4.68. Ayvalık tohumlarının çimlenme yüzdeleri	127
Şekil 4.69. Ayvalık embriyolarının çimlenme yüzdeleri	128
Şekil 4.70. Ayvalık tohumlarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)	129
Şekil 4.71. Ayvalık embriyolarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)	131
Şekil 4.72. Domat tohum ve embriyolarında çimlenme hızları	133
Şekil 4.73. Domat tohumlarının çimlenme yüzdeleri	134
Şekil 4.74. Domat embriyolarının çimlenme yüzdeleri	135
Şekil 4.75. Domat tohumlarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)	136
Şekil 4.76. Domat embriyolarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)	137
Şekil 4.77. Ayvalık tohumlarının MS0 besi ortamında gelişimi	139
Şekil 4.78. Ayvalık tohumlarının rac-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ..	139
Şekil 4.79. Ayvalık tohumlarının rac-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ..	140
Şekil 4.80. Ayvalık tohumlarının rac-GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	140
Şekil 4.81. Ayvalık tohumlarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	141
Şekil 4.82. Ayvalık tohumlarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	141
Şekil 4.83. Ayvalık tohumlarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	142
Şekil 4.84. Ayvalık embriyolarının MS0 besi ortamında gelişimi	142
Şekil 4.85. Ayvalık embriyolarının rac-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	143
Şekil 4.86. Ayvalık embriyolarının rac-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	143
Şekil 4.87. Ayvalık embriyolarının rac-GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	144
Şekil 4.88. Ayvalık embriyolarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ...	144
Şekil 4.89. Ayvalık embriyolarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ...	145
Şekil 4.90. Ayvalık embriyolarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi .	145
Şekil 4.91. Ayvalık çeşidine ait tohumlardan gelişen 6 aylık bitkiler	146
Şekil 4.92. Ayvalık çeşidine ait embriyolardan gelişen 6 aylık bitkiler	146
Şekil 4.93. Tohumlardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları	147
Şekil 4.94. Embriyolardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan	

dal sayıları	148
Şekil 4.95. Tohumlardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir).....	149
Şekil 4.96. Embriyolardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir).....	150
Şekil 4.97. Domat tohumlarının MS0 besi ortamında gelişimi	152
Şekil 4.98. Domat tohumlarının <i>rac</i> -GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	153
Şekil 4.99. Domat tohumlarının <i>rac</i> -GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	153
Şekil 4.100. Domat tohumlarının <i>rac</i> -GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	154
Şekil 4.101. Domat tohumlarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi.....	154
Şekil 4.102. Domat tohumlarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi.....	155
Şekil 4.103. Domat tohumlarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi.....	155
Şekil 4.104. Domat embriyolarının MS0 besi ortamında gelişimi	156
Şekil 4.105. Domat embriyolarının <i>rac</i> -GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	156
Şekil 4.106. Domat embriyolarının <i>rac</i> -GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	157
Şekil 4.107. Domat embriyolarının <i>rac</i> -GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi	157
Şekil 4.108. Domat embriyolarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ...	158
Şekil 4.109. Domat embriyolarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi ...	158
Şekil 4.110. Domat embriyolarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi .	159
Şekil 4.111. Domat çeşidine ait tohumlardan gelişen 6 aylık bitkiler	159
Şekil 4.112. Domat çeşidine ait embriyolardan gelişen 6 aylık bitkiler	159
Şekil 4.113. Tohumlardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları.....	160
Şekil 4.114. Embriyolardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları.....	161
Şekil 4.115. Tohumlardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir).....	162
Şekil 4.116. Embriyolardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir).....	163
Şekil 4.117. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde kallus oluşturan bazı çelikler	165
Şekil 4.118. Ayvalık ve Domat çeliklerinde kallus oluşum oranları	166
Şekil 4.119. Çeliklerin oluşturduğu kallus ve kök dokuları	167
Şekil 4.120. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde kök oluşturan bazı çelikler.....	167
Şekil 4.121. Ayvalık ve Domat çeliklerinde kök oluşum oranları.....	169
Şekil 4.122. Ayvalık ve Domat çeliklerinde çelik başına düşen kök sayıları.....	170

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. 3'RACE için cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları	31
Çizelge 3.2. 3' RACE çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı	31
Çizelge 3.3. RACE çalışmaları için PZR bileşenleri ve konsantrasyonları	32
Çizelge 3.4. RACE çalışmaları için ilk RT-PZR koşulları	32
Çizelge 3.5. RACE çalışmaları için nested RT-PZR koşulları	33
Çizelge 3.6. 5' RACE için cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları	35
Çizelge 3.7. 5' RACE çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı	35
Çizelge 3.8. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları	37
Çizelge 3.9. cDNA sentezi programı	37
Çizelge 3.10. qPZR bileşenleri ve konsantrasyonları	44
Çizelge 3.11. qPZR için kullanılan PZR koşulları	44
Çizelge 4.1. 3' RACE çalışmalarında kullanılan primerler	61
Çizelge 4.2. 5' RACE çalışmalarında kullanılan primerler	62
Çizelge 4.3. Orta bölgelerin çoğaltımı çalışmalarında kullanılan primerler	63
Çizelge 4.4. Sylvestris çeşidine ait protein özellikleri	109
Çizelge 4.5. qPZR çalışmalarında kullanılan primerler	112
Çizelge 4.6. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde gözlenen kallus sayıları	165
Çizelge 4.7. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde gözlenen kök sayıları	168

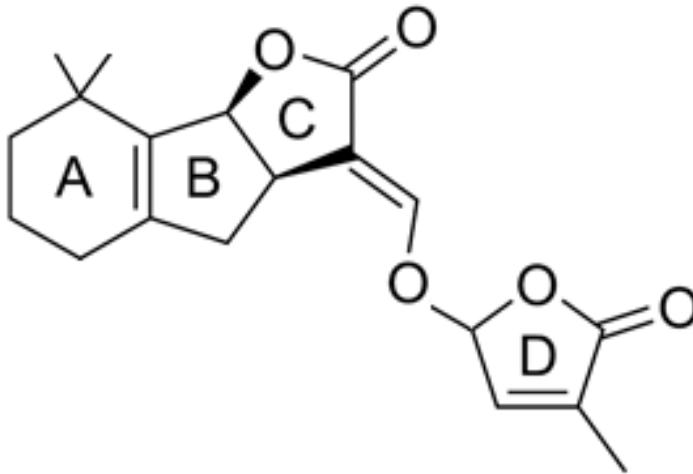
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Strigolaktonlar

Strigolaktonlar (SL) karotenoidlerden üretilen, bitkilerde hem fitohormon görevi üstlenen hem de köklerden rizosfere verilerek sinyal görevi gören moleküllerdir. İlk tespit edilen SL'a "Strigol" adı verilmiş ve parazit *Striga lutea* (cadı otu) tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği tespit edilmiştir (Cook ve ark., 1966). Bunun ardından SL'ın bitkilerin inorganik besinleri almasını sağlayan, simbiyotik arbüsküler mikorizal funguslar (AMF) için sinyal molekülü oldukları belirlenmiştir (Akiyama ve ark., 2005). Daha sonra, SL'ın endojen bitki hormonu olarak görev yaptığı ve bitkilerde gövde dallanmasını kontrol ettiği, bezelye, çeltik ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde gösterilmiştir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008).

Strigolaktonların kimyasal yapısı ilk kez 1972 yılında ortaya çıkarılmış (Cook ve ark., 1972) ve X-ray difraksiyon analizi ile tam detaylı analizleri 1985'te tamamlanmıştır (Brooks ve ark., 1985). Doğal SL'ın yapılarında üç halkalı lakton vardır ve bu metabolitler taşıdıkları lakton yapısı nedeni "Strigolaktonlar" olarak isimlendirilmişlerdir (Butler, 1995). Lakton halkaları A, B ve C halkalarıdır (Şekil 1.1). Bu üç halka bir enol-eter köprüsüyle bütanolit yapıda olan D-halkasına bağlıdır. D-halkası doğal SL'ın değişmez özelliğidir ve bu yapı biyolojik aktivite için önemlidir (Umehara ve ark., 2015).



Şekil 1.1. Strigolaktonların genel yapısı (5-deoksistrigol)

1.1.1. Strigolaktonların Görevleri

Parazit Bitki Türlerinde Çimlenmeyi Teşvik Ederler: SL ilk kez *Striga* konakçısı olmayan pamuk bitkisinde Cook ve ark. (1966) tarafından keşfedilmiştir. *Striga* cinsinin üyeleri parazit otlardır. Bu üyelerin tohumları konakçı köklerinden salgılanan SL'ı uyarıcı olarak algılar ve konakçıya yakın bir yerde çimlenirler. Konakçı bitkinin köklerinden toprağa salgılanan ve parazit bitki tohumlarının çimlenmesi için bir uyarıcı görevi yapan bu kimyasal ilk önce "strigol" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra SL'ın tarımı yapılan mısır, darı, sorgum gibi birçok *Striga* konakçısı tarafından salgılanarak çimlenmeyi teşvik ettiği gösterilmiştir (Siame ve ark., 1993). Benzer şekilde parazit bir tür olan *Orobanch* cinsine ait türlerin de ay çiçeği, domates, patates, tütün, kanola ve baklagiller gibi bitkiler için zararlı olduğu bilinmektedir (Press ve ark., 2001; Bouwmeester ve ark., 2003).

Bitki-AMF İlişkisi için Gereklidirler: SL'ın kök çevresine salınması ayrıca AMF ile iş birliğinde de önemlidir. SL, parazit bitkilerde olduğu gibi, AMF için de konakçının tanınmasında sinyal görevi üstlenirler (Akiyama ve ark., 2005; Brachmann ve Parniske, 2006). Bu sinyali algılayan funguslar, bitki ile simbiyoz oluşturmaya başlarlar (Parniske, 2008). SL arbüsküler mikorizal dallanmayı artırır (Akiyama ve ark., 2005, Parniske 2005, 2008). Kara bitkilerinin çoğu AMF ile simbiyoz yapmaktadır. Bu ilişkide bitkiler funguslara fotoasimilasyon ile elde ettikleri ürünleri sağlarken, funguslardan da özellikle fosfat olmak üzere inorganik besinleri alırlar. Bu nedenle fosfat yokluğunda bitkide SL sentezi ve toprağa salınımı artar (Yoneyama ve ark., 2007; Lopez-Raez ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008; Kohlen ve ark., 2011).

AMF gelişimi için hiplerin dallanması önemlidir ve dallanma bir uyarıcı ile gerçekleşir. İlk keşfedilen dallanma faktörü hidroponik ortamda büyütülmüş *Lotus japonicus* kök eksüdatlarından izole edilen 5-deoksistrigol'dür (Akiyama ve ark., 2005).

Bitkilerde hormon olarak görev yaparlar: Bitkilerde oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilene ek olarak jasmonatlar, salisilik asit ve brassinosteroidler de hormon listesine eklenmişlerdir (Demole ve ark., 1962; Grove ve ark., 1979; Raskin, 1992). Strigolaktonların ise bitkilerin kök çevrelerinde yaptıkları görevleri dışında, endojen hormon olarak bitki gelişiminde rol oynadıkları, 2008 yılında yapılan çalışmalar ile anlaşılmıştır (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008).

Bir bitki hormonu olarak SL'ın bilinen en önemli etkisi lateral tomurcuk gelişimi ve gövde dallanmasını baskılayarak bitki mimarisini kontrol etmektir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). Daha önce gövde dallanmasını oksin, sitokinin ve absisik asitin kontrol ettiği düşünülse de artık SL'ın da bu süreçte görev aldığı bilinmektedir.

Sürgün dallanması ayrıca sentetik bir SL analogu olan GR24 tarafından da baskılanabilmektedir.

SL, bitkilerde dallanmayı kontrol etmek dışında birçok süreçte daha görev almaktadırlar. Bunlar arasında en önemli görevlerinden biri de kök gelişiminin düzenlenmesidir. SL'ın köklerden kök çevresine salgılandığı bilinse de kök gelişimi üzerindeki etkilerinin anlaşılması daha sonraki yıllarda gerçekleşmiştir. *A. thaliana* ve mısırdaki SL'ın ana kök uzunluğunu arttırdığı bildirilmiştir (Ruyter-Spira ve ark., 2011; Guan ve ark., 2012). *A. thaliana* ve bezelyede ise SL'nin kök tüylerinin boyunu uzattığı, ancak lateral kök oluşumunu baskıladığı anlaşılmıştır (Kapulnik ve ark., 2011). Ayrıca, SL'ın bezelye ve domateste adventif köklenmeyi inhibe ettiği de rapor edilmiştir (Rasmussen ve ark., 2012; Kohlen ve ark., 2012).

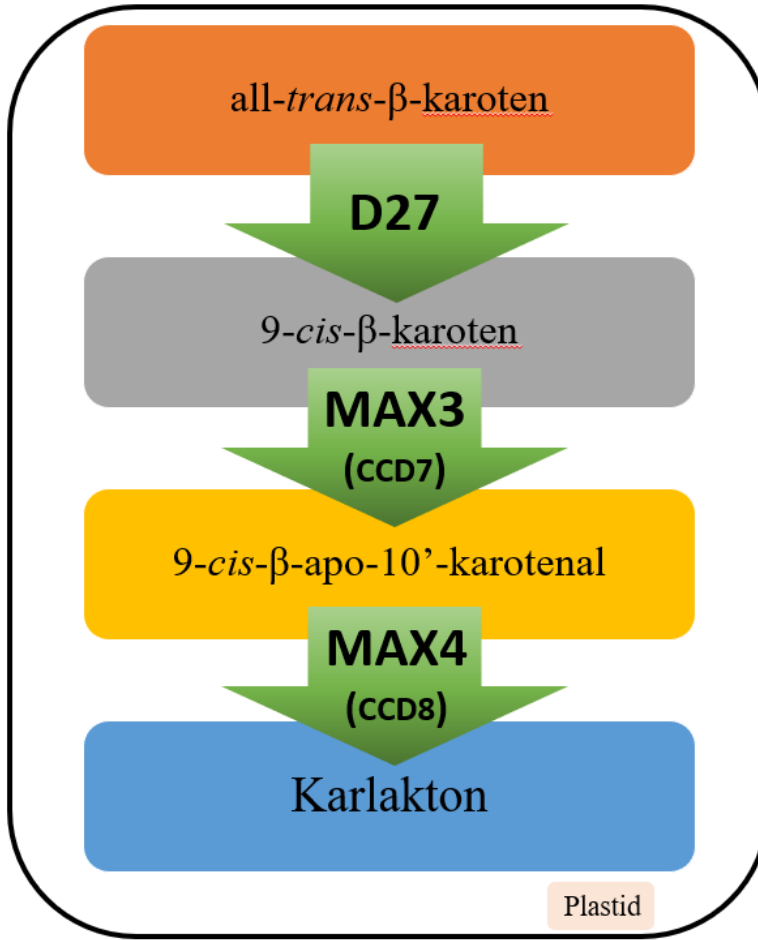
SL bunların dışında, nodlar arası mesafelerin artmasında ve gövde boyunun uzamasında (Guan ve ark., 2012; de Saint Germain ve ark., 2013), yaprak senesensinin hızlanmasında (Snowden ve ark., 2005; Yamada ve ark., 2014), gövdenin enine kalınlaşmasında (Agusti ve ark., 2011), yaprak şeklinin belirlenmesi (Stirnberg ve ark., 2002) ve kuraklık ve tuz stresine karşı pozitif yanıt oluşmasında (Ha ve ark., 2014) da görev almaktadırlar.

1.1.2. Strigolaktonların Biyosentez Yolağı

SL biyosentezi esasen bitki köklerinde meydana gelir. SL'ın hormonlar olarak keşfinden önce, bitkilerde gövde dallanmasını kontrol eden “uzun mesafeli” bir sinyal olduğu *A. thaliana*, bezelye, petunya bitkileri ile yapılan karşılıklı aşılama deneyleri ile belirlenmiştir (Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1996; Beveridge ve ark., 1997; Beveridge, 2000; Foo ve ark., 2001; Morris ve ark., 2001; Turnbull ve ark., 2002; Booker ve ark., 2004; Booker ve ark., 2005). Bu çalışmalar ile bu mobil sinyalin köklerde sentezlenen ve bitki gövdesi boyunca yukarıya doğru taşınan bir metabolit olduğu düşünülmüştür.

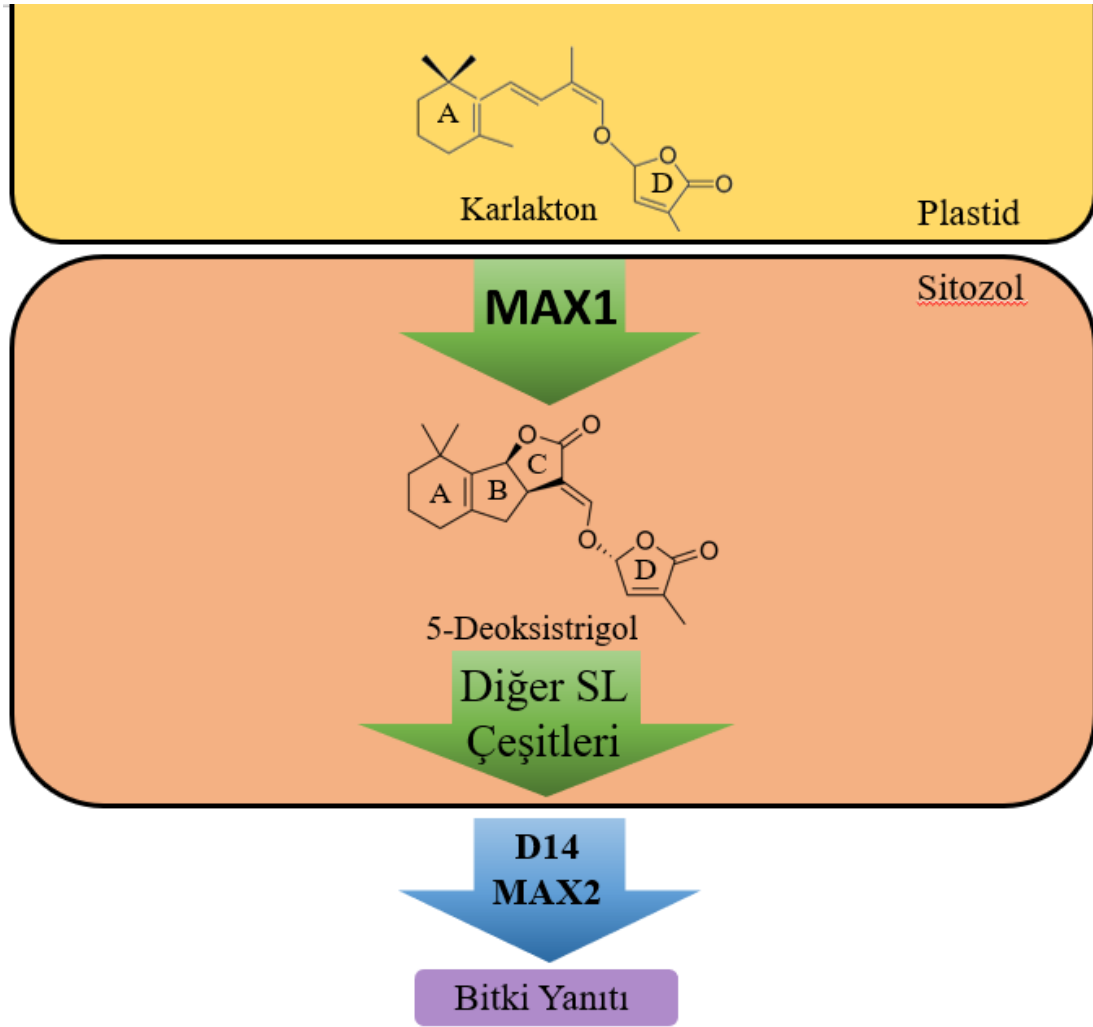
Kimyasal olarak terpenoid lakton sınıfında olan SL karotenoid kökenli metabolitlerdir (Matusova ve ark., 2005). Bu nedenle bitkilerde SL biyosentezinin ilk adımları plastid içinde gerçekleşir (Şekil 1.2). Bu adımlar izomerizasyon ve klivaj adımlarını içermektedir. İlk önce all-trans- β -karotenin 9-cis- β -karotene çevrildiği izomerizasyon basamağı gerçekleşir. Bu adımı D27 (DWARF 27) enzimi gerçekleştirir (Alder ve ark., 2012). Daha sonra 9-cis- β -karotenin 9-cis- β -apo-10'-karotenale ve onun da karlaktona (KL) dönüştüğü iki tane klivaj reaksiyonu gerçekleşir. Bu reaksiyonlarda ise sırası ile CCD7 (Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 / MAX3 - More Axillary Growth 3)

ve CCD8 (Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 / MAX4 - More AXillary Growth 4) görev alırlar (Booker ve ark., 2004; Schwartz ve ark., 2004)



Şekil 1.2. SL biyosentez yolağı (plastid içindeki kısmı)

Oluşan KL adlı ara metabolit strigolakton yapısında bulunan A ve D halkalarını içermektedir (Alder ve ark., 2012). KL'u substrat olarak kullanan MAX1 (More AXillary Growth 1) enzimi sitoplazmada görev yaptığı için, KL plastidten sitoplazmaya geçebilen mobil bir metabolit olarak değerlendirilmektedir (Waldie ve ark., 2014). SL için öncü bir molekül olan KL'un, SL'a dönüşümü için B ve C halkalarının da oluşması gerekir (Alder ve ark., 2012). Bu oluşumdan sorumlu olan MAX1 ise sitokrom p450 ailesi üyesidir (Booker ve ark., 2005) ve aktif SL sentezini sitoplazmada gerçekleştirir. Böylece diğer SL türevlerine dönüşebilen en basit SL yapısı olan 5-deoksistrigol oluşur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. SL biyosentez yolağı (sitozoldeki kısmı)

KL'un SL'a dönüşümünü sağlayan oksidasyon reaksiyonlarını MAX1'in tek başına yapabilmesi mümkün olsa da, bu aşamada bazı bilinmeyen enzimlerin olabileceği de düşünülmektedir (Xie ve ark., 2010; Seto ve ark., 2012; Ruyter-Spira ve ark., 2013; Waldie ve ark., 2014).

1.1.3. Algılanma ve Sinyalizasyon

SL'ın biyosentezi tamamlandıktan sonra bitkide hormonal yanıtın oluşabilmesi için bitki tarafından algılanması ve sinyal oluşması gerekmektedir. SL'ın algılanması D14 (DWARF 14), bu sinyalin iletimi ise MAX2 (More AXillary Growth 2) enzimleri tarafından yapılır (Şekil 1.3).

D14: D14 proteini α/β hidrolaz ailesine ait bir proteindir (Arite ve ark., 2009). İlk olarak petunya bitkisinde tanımlanmıştır (Hamiaux ve ark., 2012). D14, SL yapısında bulunan D-halkasının hidrolitik olarak ayrılmasını katalizler. Sentetik bir SL analogu olan

GR24 ile D14'ün inkübasyonu da ABC- ve D-halkalarının arasındaki enol-eter bağının kırılması ile sonuçlanır (Nakamura ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2013). SL yapısının asıl iş gören kısmı D-halkasıdır ancak D-halkası tek başına aktif değildir. Hidroliz adımından sonra D-halkası ile D14'ün ilişkisi kesilmez ve bu kompleks daha sonra sinyal iletiminde rol alır. Bu komplekse eğer baskılayıcı D53 proteini bağlanırsa SL sinyal iletimi inhibe olur (Jiang ve ark. 2013, Zhou ve ark. 2013).

MAX2: MAX2 F-box protein ailesinin bir üyesi olarak, D14 tarafından alınan SL sinyaline yanıtta görev alır (Stirnberg ve ark., 2002; Ishikawa ve ark., 2005; Johnson ve ark., 2006). SL sinyal iletimi, MAX2 aracılı bir protein degradasyonu işlemi ile gerçekleşir. D14'ün D-halkası ile beraber oluşturduğu komplekse D53 proteini bağlanırsa, sinyal iletiminin gerçekleşebilmesi için D53'ün yıkılması gerekir. Bu yıkımı MAX2 proteini SCF-tipi bir ubiquitin kompleksinin bir üyesi olarak katalizleyerek sinyal yolağını başlatır (Jiang ve ark. 2013, Zhou ve ark. 2013; Wang ve ark., 2015). D14'ün ve MAX2'nin dahil olduğu bu iki kompleks birleşir ve D53 proteini ubiquitinasyona uğratarak yıkılır. Böylece SL sinyalini inhibe eden faktör ortadan kalkar ve bitkide SL yanıtı gözlenir.

1.1.4. Strigolaktonların Çeşitleri

Doğal SL şimdiye kadar birçok bitkide tespit edilmiştir. En basit SL mono- ve dikotiledonlarda bulunan 5-deoksistrigol'dür (Awad ve ark., 2006; Yoneyama ve ark., 2008; Delaux ve ark., 2012). Literatürde 2005 yılına kadar 5-deoksistrigol varlığı bildirilmemiş (Akiyama ve ark. 2005) olup bu metabolit strigolün keşfinden yaklaşık 40 yıl sonra keşfedilmiştir (Prandi ve McErlean, 2019). 5-deoksistrigol'de A- ve B- halkalarında ek olarak bir oksijenli grup bulunmaz ve KL'dan oluşan en basit strigolaktondur (Şekil 1.3). AB- halkasına farklı pozisyonlarda hidroksil gruplarının eklenmesi ile bilinen birçok SL oluşur. Hidroksil grupların varlığı genellikle çimlenmeyi teşvik eden aktivite ile ilişkilendirilir. Bunun aksine hidrofobik ya da asetil bulunduran SL daha çok sürgün baskılanması ile ilişkilendirilir (Sato ve ark., 2005; Xie ve ark., 2008a).

Doğal SL C-halkasının stereokimyasına göre strigol (öncülü 5-deoksistrigol) ve orobanchol (öncülü 4-deoksiorobanchol) tipleri olarak ikiye ayrılmıştır (Xie ve ark., 2013). Strigol tipi SL'dan strigol, *Striga* konakçısı olmayan pamuk bitkisinden (Cook ve ark., 1966), sorgolakton ve sorgomol gerçek bir *Striga* konakçısı olan *Sorghum bicolor* bitkisinden (Hauck ve ark. 1992; Xie ve ark. 2008b), strigone *Houttuynia cordata* bitkisinden (Kisugi ve ark., 2013) izole edilmiştir. Orobanchol tipi SL'ın, hem pek çok

bitki türünde bulunması hem de çeşitliliğinin fazla olması nedeniyle, strigol tipi olanlardan daha önemli oldukları düşünülmektedir (Ćavar ve ark., 2015; Prandi ve McErlean, 2019). Orobanchol ilk kez kırmızı yoncadan (Yokota ve ark 1998), alektrol ise börölceden izole edilmiştir (Müller ve ark., 1992). Ancak daha sonra alektrolün kimyasal yapısının yanlış yorumlandığı anlaşılarak adı orobanchyl asetat olarak değiştirilmiştir (Xie ve ark 2008a). Solanacol ve solanacyl asetat ise tütünden izole edilmiştir (Xie ve ark., 2007).

Strigol ve orobanchol tipi SL, kanonik SL olarak sınıflandırılmaktadır. Kanonik SL'da ABC ve D halkası mevcuttur. Kanonik olmayan SL'da ise D-halkası değişmese de ABC-halkalarından biri veya birkaçı yoktur (Yoneyama ve ark., 2018a). Kanonik olmayan SL'a aveanol (Kim ve ark., 2014; Yasui ve ark., 2017), heliolactone (Ueno ve ark., 2014), zealactone (Charnikhova ve ark., 2017; Xie ve ark., 2017) ve lotuslactone (Xie ve ark., 2019) örnek verilebilir.

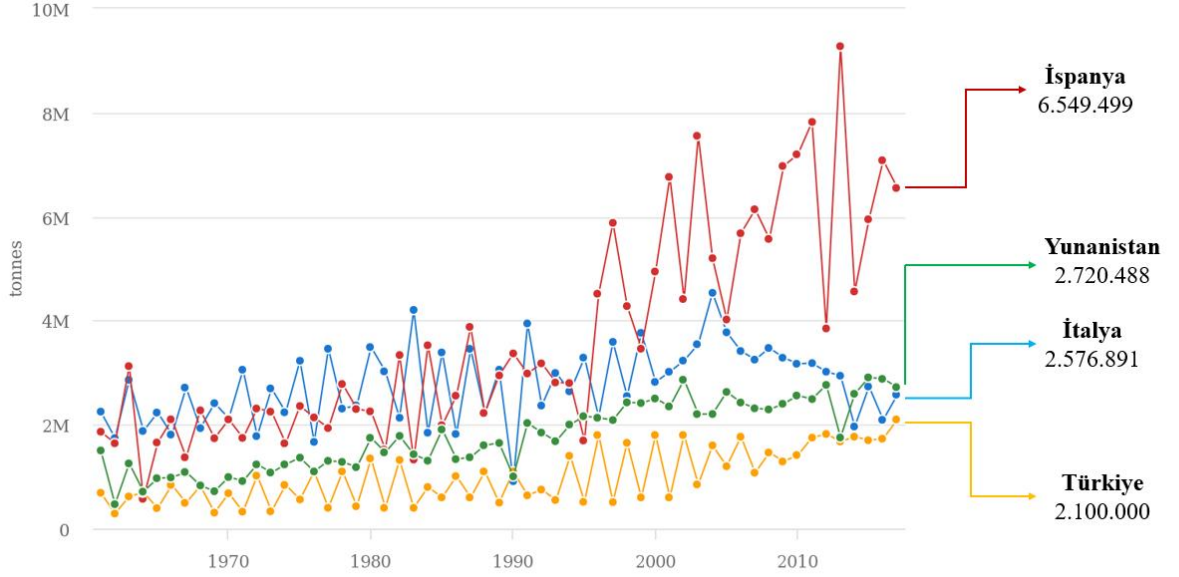
Doğal SL'ın miktarlarının bitkilerde çok az olması nedeniyle, SL ile yürütölen çalışmalarda genellikle sentetik SL kullanılmaktadır. Bu sentetik bitki büyüme düzenleyicilerinden GR24 ise küresel bir standart haline gelmiştir (Prandi ve McErlean, 2019). GR24 adını, ilk kez sentezleyen Gerald Rosebery'den almıştır (Johnson ve ark., 1981). GR24 bir SL analogudur ve GR24'ün hem 5-deoksistrigol hem de 4-deoksiorobanchol tipleri vardır. Bu iki stereoizomerin enantiyomerleri (GR24^{5DS} ile GR24^{ent-5DS} veya GR24^{4DO} ile GR24^{ent-4DO}) eşit miktarda karıştırılıp rasemik GR24 (*rac*-GR24) elde edilebilmektedir (Scaffidi ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında da SL uygulama deneyleri için 5-deoksistrigol'ün enantiyomerlerinin eşit miktarda bulunduğu *rac*-GR24 (GR24^{5DS} ile GR24^{ent-5DS}) kullanılmıştır (Strigolab, Torino, İtalya).

SL inhibitörü olarak ise ilk önce TIS13 adlı kimyasal sentezlenmiştir (Ito ve ark., 2010). Bu kimyasal ile çeltik üzerinde yapılan deneylerde SL seviyeleri azalmış olsa da, SL biyosentez inhibisyonundan kaynaklanmayan bazı anormal fenotipler gözlenmiştir. Bu yan etkileri azaltmak adına, birçok TIS13 türevi sentezlenerek yine çeltik üzerinde denemeler yapılmıştır. Bunlardan TIS108, hem kök eksüdalarındaki SL miktarını 100 kat daha fazla azaltmış hem de TIS13 kadar cüce bir fenotip oluşturmamıştır (Ito ve ark., 2011). Araştırmacılar daha sonra bu kimyasalı *A. thaliana* bitkisine uygulamış ve SL biyosentez genlerinin anlatımlarının arttığı bildirmişlerdir (Ito ve ark., 2013). Araştırmacılar TIS108'in SL biyosentezini etkilediğini ve bunu da büyük olasılıkla MAX1 üzerinde gerçekleştirdiğini düşünmektedirler (Ito ve ark., 2011; Ito ve ark., 2013). Bu nedenle bu tez çalışmasında SL inhibitörü olarak TIS108 adlı kimyasal kullanılmıştır (Strigolab, Torino, İtalya).

Strigolaktonların yapısı ve özellikleri halen birçok yeni çalışmaya konu olmaktadır. SL, birçok bitkide çalışılmış olsa da ağaç türleri üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bugüne kadar GR24 uygulanmış ya da endojen SL miktarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar sadece okaliptüs, söğüt, Japon akçaağacı, elma ve portakal ağaçlarında yapılmıştır (Agusti ve ark., 2011; Ward ve ark., 2013; Funnell, 2014; Zheng ve ark., 2018). SL genlerinin moleküler karakterizasyonu ise yalnızca kavak ağacında yapılmıştır (Czarnecki ve ark., 2014; Zheng ve ark., 2016). Literatürde zeytin bitkisi ve SL ilişkisi hakkında bir yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma ile hem SL genlerinin zeytin bitkisinde karakterizasyonu, hem de SL'in zeytin bitkisi üzerine etkilerinin ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Zeytin Bitkisi

Zeytin (*Olea europaea* L.) Akdeniz bölgesinde yaklaşık 8000 yıl önce kültüre alınan ilk bitkilerden biridir (Rugini, 1986; Zohary ve ark., 2012). Oleaceae familyasından olan zeytin her dem yeşil bir bitkidir. Zeytin hem sofralık hem de yağlık olarak kullanılabilen ticari öneme sahip bir tarım ürünüdür ve Türkiye zeytin üretimi konusunda dünyada en önemli ülkelerden biridir. Türkiye’de 2018 yılında meyve veren toplam zeytin ağacı sayısı 151.069.000 olup, bu ağaçlardan 426.995 ton sofralık ve 1.073.472 ton yağlık olmak üzere toplamda 1.500.467 ton zeytin elde edilmiştir (TÜİK, 2019). Dünya genelinde, zeytin üretimi konusunda Türkiye; İspanya, Yunanistan ve İtalya’dan sonra 4. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. 2017 yılında dünyada zeytin üretimi (ton, <http://www.fao.org/faostat>, erişim 25.04.2019)

Türkiye’de zeytin yetiştiriciliğinin yaklaşık %80’i Ege bölgesinde yapılmakta olup, bunu Akdeniz, Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri izlemektedir (Gürbüz ve ark., 2004).

Türkiye’de yüksek yağ kalitesi nedeniyle üretilen en önemli yağlık çeşit Ayvalık çeşididir (İsfendiyaroğlu ve ark., 2009). Zeytinyağının, sağlıklı olması açısından Akdeniz diyetinde önemli bir yeri vardır (Hrncirik ve Fritsche, 2004). Ayvalık çeşidi, Türkiye çapında tüm zeytin ağaçlarının %19’unu, Ege Bölgesi’ndeki ağaçların da %25,3’ünü oluşturmaktadır. Orijini Balıkesir Edremit (Kıralan ve Bayrak, 2013) olan Ayvalık çeşidi, Çanakkale ilinde de yetiştirilir (Orak ve ark., 2012; Ilgar, 2016). Bu nedenle bu tez çalışmasında Türkiye’nin yüksek kaliteli zeytinyağının üretildiği Ayvalık çeşidi kullanılmıştır. Ayvalık çeşidinde SL biyosentezi, algılanması ve sinyal iletiminden sorumlu olan genlerin moleküler karakterizasyonları yapılmış, bu genlerin farklı Ayvalık dokularındaki anlatımları belirlenmiş, bu çeşit için doku kültürü ortamında SL varlığı veya yokluğunda tohum çimlenmesi, kök oluşturma yeteneği, gövde dallanma miktarı ve internod uzunlukları belirlenmiş, son olarak da SL’in Ayvalık çelik köklenmesi üzerine etkileri gözlenmiştir.

Zeytin üretimi yapılan tüm ülkelerde zeytin ağacı çeşitli yöntemlerle çoğaltılmaktadır. 19. yüzyılın ortalarına kadar zeytin ovüllerden, dallardan ya da sürgünlerden çoğaltılmıştır (Fabbri ve ark., 2004). Daha sonra aşı ile üretim başlasa da

1940'lı yıllardan beri yarı odunsu çeliklerden nemli ortamda üretim, zeytin için birçok ülkede kullanılan ekonomik bir çoğaltım şekli olmuştur (Davies ve Hartmann, 1988; Fernandes Serrano ve ark., 2002; Fabbri ve ark., 2004). Bununla birlikte aşılama yöntemi tamamen terk edilmemiştir, çünkü köklenme problemi yaşayan zeytin çeşitleri vardır ve bunların çoğaltımı yalnızca aşılama yöntemi ile yapılabilmektedir (Fabbri ve ark., 2004).

Ayvalık çeşidi kolay köklenen bir çeşittir ve üretimi çelik köklendirmesi yolu ile yapılır (Fabbri ve ark., 2004), fakat Domat zor köklenen bir çeşittir ve çoğaltımı aşı ile yapılmaktadır (Özkaya ve Çelik, 1994; Fabbri ve ark., 2004; Çetintaş Gerrakakis ve Özkaya, 2005; İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2008). Köklenmesi yetersiz olan Domat çeşidinin aşılama ile çoğaltımı, bir anaç (çöğür) üzerine aşılama yoluyla gerçekleştirilmektedir. Ancak bu süreç oldukça uzundur ve iş gücü gerektirmektedir (Kaleci ve Orhan, 2010). Bu nedenle de aşı ile üretim ekonomik değildir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir çeşit olan Domat çeşidi ise, Türkiye'de üretilen en önemli sofralık yeşil zeytin çeşitlerindendir (İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2008). Meyvelerinin iri olması nedeniyle genellikle dolgu zeytini olarak değerlendirilir. Domat çeşidinin orijini ise Manisa Akhisar'dır (Orak ve ark., 2012).

Zeytin çeliklerin köklendirilmesi için uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinden en yaygını İndol Bütirik Asit (IBA)'tır (Wiesman ve Lavee 1994; Rahman ve ark., 2002). Ancak Domat çeşidinde IBA köklendirmeyi teşvik etmede yetersiz kalmaktadır (Özkaya ve Çelik, 1994; Çetintaş Gerakkakis ve Özkaya, 2005; Özelbaykal ve Gezerel, 2005; Türkoğlu ve Durmuş, 2005). Bu nedenle bu tez çalışmasının amaçlarından birisi de, zeytin Domat çeşidinin hem doku kültürü ortamında hızlı ve kitlesel anlamda yetiştirilmesi hem de çelik köklendirilmesi ile Türkiye sofralık yeşil zeytin üretimine katkı sağlamaktır. Bunun için, Domat çeşidinde doku kültürü ortamında SL varlığı veya yokluğunda çimlenme durumu, kök oluşturma yeteneği, gövde dallanma miktarı ve internod uzunlukları belirlenmiş, son olarak da SL'in Domat çelik köklenmesi üzerine etkileri gözlenmiştir.

Yeni keşfedilen bir hormon olarak SL ile ilgili yapılan çalışmaların birçoğu henüz model organizmalar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Zeytin bitkisi gibi ekonomik önemi olan türlerde de bu bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin belirlenmesi ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması önem arz etmektedir.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı;

-Zeytin bitkisinde ilk kez SL biyosentez, algılama ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin moleküler karakterizasyonunun yapılması ve gen anlatım profillerinin

belirlenmesi,

-Doku kültürü şartlarında SL’ın Ayvalık ve Domat eitlerinde, tohum çimlenmeleri, kök boyları, yan dal sayıları ve internod mesafeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi,

-Kolay köklenen Ayvalık ve zor köklenen Domat eitlerinde elik köklenmesi zerine SL’ın etkilerinin belirlenmesidir.

SL’ın veya inhibitörlerinin dışarıdan uygulanarak bitkide dallanma sayısını değiştirmesi, elik köklenmesini etkilemesi ya da doku kültürü şartlarında hızlı ve seri üretime olanak vermesi; tarımda ve ormancılıkta gen transferi yöntemleri kullanılmadan verimin arttırılmasını sağlayabilecektir.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Strigolaktonlar: Strigolaktonlar terpenoid lakton grubuna dahil olan bitki metabolitleridir (Umehara ve ark., 2008). Bu bitki metabolitleri, bitkilerin köklerinden dışarı salgılanarak bitki kök çevresinde sinyal molekülleri olarak bazı görevler yapmalarının yanı sıra, içsel olarak da bitkilerde hormonal yanıtlara neden olmaktadır.

Strigolaktonlar ilk olarak *Striga lutea* (cadıotu) isimli parazit bitki için çimlenme uyarıcı olarak keşfedilmişlerdir (Cook ve ark., 1966). *Striga*, *Orobanch*e, *Phelipanche* ve *Alectra* gibi cinslerin parazitik üyeleri, konak bitki köklerinden salgılanan kimyasal uyarıcıları algılayarak uygun konakçılarına yakın yerlerde çimlenirler (Bouwmeester ve ark., 2003; Humphrey ve Beale, 2006; Fernandez-Aparicio ve ark., 2010). Konak bitkilerin köklerinden toprağa salgılanan ve parazit tohumların çimlenmesi için sinyal görevi gören bu kimyasal uyarıcı ilk kez Cook ve ark. (1966) tarafından “Strigol” olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte, SL’ların kök kaynaklı çimlenme uyarıcı oldukları, ilk kez *Striga* konakçısı olmayan pamuk bitkisinde gösterilmiş olsa da (Cook ve ark., 1966); mısır, darı, sorgum gibi ticari öneme sahip birçok *Striga* konakçısı tarafından da salgılanarak çimlenmeyi teşvik ederler (Hauck ve ark., 1992; Siame ve ark., 1993). Benzer şekilde parazit bir tür olan *Orobanch*e cinsine ait türlerin de ayçiçeği, domates, patates, tütün, kanola ve baklagiller gibi bitkiler için zararlı olduğu bilinmektedir (Press ve ark., 2001; Kim ve ark., 2002; Bouwmeester ve ark., 2003).

SL parazit bitkilerde olduğu gibi, arbüsküler mikorizal funguslar için de konak bitkilerini tanımada sinyal görevi görürler (Akiyama ve ark., 2005). SL’in bitki tarafından kök çevresine salgılanması, AMF’in bu sinyali algılayarak bitki ile simbiyoz oluşturmasını sağlar ve kara bitkilerinin çoğu AMF ile simbiyotik ilişkiler kurarlar (Brachmann ve Parniske, 2006). Bu etkileşim doğada çok yaygındır çünkü AMF kendileri için uygun konakçıları bulamazlarsa yaşam döngülerini tamamlayamazlar (Parniske, 2008). Bir uyarıcı yardımı ile hifal dallanmanın gerçekleşmesi gelişimleri için en önemli aşamalardan biridir. İlk keşfedilen dallanma faktörü de *Lotus japonicus* bitkisi kök eksüdasından izole edilen 5-deoksistrigol’dür (Akiyama ve ark., 2005). Bu iş birliği sayesinde bitkiler AMF’a fotosentez ürünleri sağlarken, AMF da bitkilerin topraktaki nitrat, fosfat gibi inorganik besleyici maddeleri almasına yardımcı olurlar (Akiyama ve ark., 2005). Bu nedenle özellikle fosfat yokluğunda, SL sentezi ve toprağa salınımı uyarılır (Yoneyama ve ark., 2007; Lopez-Raez ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008; Kohlen ve ark., 2011). SL birçok

bitki türünde kök eksüdalarında tespit edilse de, *Arabidopsis thaliana* gibi funguslarla simbiyoz yapmayan bitkilerde de bulunması başka rolleri olabileceğini düşündürmüştür (Goldwasser ve ark., 2008).

Strigolaktonlar, kök çevresi dışında bitkilerde içsel olarak da görev yaparlar. SL'ın içsel hormon olarak görev yaptığı ve dallanmayı kontrol ettiği 2008 yılında bezelye, *A. thaliana* ve çeltikte gösterilmiştir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). Yeni bir hormon ailesi olarak SL gövde dallanmasını inhibe etmenin yanı sıra; kök büyümesi, lateral kök oluşumu, kök tüyü uzaması, adventif köklenme, gövde uzaması, yaprak genişlemesi, yaprak senesensi, bitkilerde sekonder büyüme, kuraklığa ve tuzluluğa yanıt gibi birçok önemli süreçte de görev alırlar (Stirnberg ve ark., 2002; Snowden ve ark., 2005; Agusti ve ark., 2011; Kapulnik ve ark., 2011; Ruyter-Spira ve ark., 2011; Arite ve ark., 2012; Guan ve ark., 2012; Kohlen ve ark., 2012; Rasmussen ve ark., 2012; de Saint Germain ve ark., 2013; Ha ve ark., 2014; Yamada ve ark., 2014).

SL'ın kimyasal yapısı ilk olarak 1972 yılında ortaya çıkarılmıştır (Cook ve ark., 1972) ve X-ray kristalografisi ile tam detaylı analizi 1985'te yapılmıştır (Brooks ve ark., 1985). Doğal SL A, B ve C halkalarından oluşan, üç halkalı lakton yapısındadırlar (Şekil 1.1). C halkası ise, bir enol-eter köprüsü ile bütenolit yapıda olan D-halkasına bağlıdır ve bu yapı biyolojik aktivite için gereklidir (Umehara ve ark., 2015). ABC-halkası zorunlu olmamakla birlikte, D-halkası ve enol-eter köprüsü doğal aktif SL'ın değişmez bir özelliğidir (Mangnus ve ark., 1992; Zwanenburg ve ark., 2009) ve gövde dallanması inhibisyonunda zorunludur (Boyer ve ark., 2012; Fukui ve ark., 2013). Bu özellik D-halkasının modifikasyonu sonucu, parazit tohum çimlenmesinin azalması ile deneysel olarak kanıtlanmıştır (Mangnus ve ark., 1992).

Bitkilerde gövde dallanma mutantları ile yapılan çalışmalar, SL'ın bitki hormonları olarak tanımlanması ile birlikte ivme kazanmıştır. SL üretemeyen veya sinyal iletimini sağlayamayan mutantlar sayesinde SL biyosentez ve algılanma/sinyal mekanizmasını anlamak mümkün olmuştur. Bu basamaklardaki enzimler dallanmanın arttığı mutantlarla belirlenmiştir. Bu mutantlar, *A. thaliana* için *more axillary growth (max)* (Sorefan ve ark., 2003; Booker ve ark., 2004, 2005; Stirnberg ve ark., 2007), çeltik için *dwarf (d)* ve *high tillering dwarf (htd)* (Ishikawa ve ark., 2005; Arite ve ark., 2007, 2009; Lin ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013), bezelye için *ramosus (rms)* (Beveridge ve ark., 1996; Beveridge, 2000; Morris ve ark., 2001; Foo ve ark., 2005) ve petunya için *decreased apical dominance (dad)* (Drummond ve ark., 2009; Hamiaux ve ark., 2012; Simons ve ark., 2007; Snowden ve ark., 2005)'tır. Bu mutantlarda içsel SL miktarlarının az olduğu

görülmüştür ve sürgün fenotipleri dışarıdan SL uygulaması ile veya WT (yabanıl tip) köklere aşılama ile geri döndürülebilmiştir. Bu bitkilere yakın zamanda yapılan çalışmalar ile domates, mısır, krizantem, söğüt ve kavak da eklenmiştir (Vogel ve ark., 2010; Guan ve ark., 2012; Dong ve ark., 2013; Ward ve ark., 2013; Czarnecki ve ark., 2014; Zheng ve ark., 2016). Bunun dışında yosun ve ciğerotları gibi daha temel bitkilerde de SL varlığı rapor edilmiştir (Proust ve ark., 2011; Delaux ve ark., 2012).

SL'in karotenoid kaynaklı absisik asit gibi bileşiklere yapısal olarak benzemesi nedeniyle, Matusova ve ark. (2005), hem karotenoid biyosentezini engelleyen fluridone adlı bir kimyasal uygulanan mısır, börülce ve sorgum bitkilerinden elde ettikleri, hem de mısır bitkisinin karotenoid biyosentez mutantlarından elde ettikleri kök eksüdalarını *Striga* ve *Orobanch*e tohumları üzerinde denemişlerdir. Bütün denemeler sonucunda kontrol grubuna oranla, karotenoid biyosentezi engellenen gruplarda parazit bitki çimlenmesi %80'e kadar azalma göstermiştir. Bu sonuçlara göre SL'in karotenoid kökenli bitki hormonları olduğu, karotenoid yıkımı sonucunda oluştuğu ve bir seri reaksiyon sonucunda ABC ve ona bağlı D-halkasının olduğu bildirilmiştir (Matusova ve ark., 2005). Bununla birlikte, çeltik bitkisi *d17/ccd7* ve *d10/ccd8* ve bezelye *rms1/ccd8* mutantlarında kök eksüdalarında SL miktarının oldukça azalması, SL'in karotenoid kökenli metabolitler olduğunu desteklemiştir (Umehara ve ark., 2008; Gomez-Roldan ve ark., 2008).

SL Biyosentezi: SL biyosentezinin ilk aşamaları karotenin izomerizasyon ve dioksijenaz aracılı yıkımını içermektedir. Bu adımlar sırasıyla plastidte görev yapan D27, CCD7 ve CCD8 enzimleriyle gerçekleşir (Sorefan ve ark., 2003; Booker ve ark., 2004; Arite ve ark., 2007; Lin ve ark., 2009; Waters ve ark., 2012a). İlk başlarda SL'in all-trans- β -karoten'den CCD7 ve CCD8 ile üretildiği düşünülmüş olsa da (Schwartz ve ark., 2004), SL biyosentezinin daha öncesinde bir izomerizasyon adımı içerdiği bildirilmiştir (Alder ve ark., 2012). all-trans- β -karoten'i, 9-cis- β -karoten'e çeviren bu reaksiyon, çeltik ve *A. thaliana* bitkilerinde demir içeren bir enzim olan D27 ile katalizlenir (Lin ve ark., 2009; Waters ve ark., 2012a; Alder ve ark., 2012). Bu enzim çeltik bitkisinde SL kusurlu fenotip sayesinde keşfedilmiştir (Lin ve ark., 2009). Çeltik ve *A. thaliana* *d27* mutantlarında aşırı dallanma fenotipi, diğer biyosentez mutantlarına göre daha hafiftir (Waters ve ark., 2012a). Bunun nedeni 9-cis- β -karoten'in, kendiliğinden oluşan izomerizasyon gibi alternatif bir kaynağının olması olabilir (Waldie ve ark., 2014).

İzomerizasyon adımı takiben 9-cis- β -karoten'in 9-cis- β -apo-10'-karotenal'a yıkımı Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 (CCD7) enzimi ile gerçekleşir. Bu enzimin *A.*

thaliana bitkisindeki adı MAX3, bezelyede RMS5, eltikte D17 ve petunyada DAD3'tür. Bu biyosentez adımından sonra ise 9-*cis*-β-*apo*-10'-karotenal'den Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 (CCD8) enzimi ile karlakton oluşur. Bu enzimin *A. thaliana* bitkisindeki adı MAX4, bezelyede RMS1, eltikte D10 ve petunyada DAD1'dir. Bu iki enzimin karotenoid klivaj dioksijenaz olarak görev yaptıkları ve bir sinyal molekülü oluşturmada rol aldıkları *A. thaliana*, bezelye, eltik, petunya ve domates bitkilerinde gösterilmiştir (Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1997; Sorefan ve ark. 2003; Booker ve ark. 2004; Foo ve ark. 2005; Arite ve ark. 2007; Alder ve ark., 2008; Umehara ve ark. 2008; Vogel ve ark., 2010). Bu sinyalin de kökten sürgüne doğru hareket ederek lateral tomurcuk oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir (Foo ve ark., 2001). CCD7 ve CCD8 enzimlerini kodlayan genlerin kök dokularında yüksek oranda anlatıma uğradıkları bildirilmiştir (Sorefan ve ark. 2003; Booker ve ark., 2004; Bainbridge ve ark., 2005; Foo ve ark., 2005; Snowden ve ark., 2005; Auldridge ve ark., 2006; Johnson ve ark., 2006; Drummond ve ark., 2009; Mashiguchi ve ark., 2009).

Bezelye *rms5/ccd7* ve *rms1/ccd8* mutantlarının kök eksüdaları, bezelyenin doğal paraziti olan *Orobanche crenata* tohumlarına uygulanmıştır. WT grup ile kıyaslandığında, mutant bitki eksüdalarının parazit bitki çimlenme oranını arttırmadığı gözlenmiştir (Gomez-Roldan ve ark., 2008). Bu mutantlarda ayrıca AMF ile ilişkinin de etkilendiğı, kök eksüdalarının AMF'in hifal dallanmasını azalttığı ve bu durumun dışarıdan SL uygulaması ile geri çevrilebildiğı görülmüştür (Gomez-Roldan ve ark., 2008). Bununla birlikte *A. thaliana*, bezelye ve çeltikte *max3/rms5/d17/ccd7* ve *max4/rms1/d10/ccd8* mutantlarında kök eksüdalarında SL miktarının azaldığı ve doğal ya da sentetik SL uygulamasının ise gövde dallanmasını yeniden baskıladığı bildirilmiştir (Gomez-Roldan ve ark. 2008; Umehara ve ark. 2008). Ayrıca, *A. thaliana* bitkisinde dışarıdan GR24 uygulaması CCD7 ve CCD8 transkript seviyelerini azaltmıştır (Mashiguchi ve ark., 2009).

CCD8, SL'in hem A halkasını hem de karakteristik olan enol-eter köprüsü ile D-halkasını oluşturarak SL biyosentezinde bir ara ürün olan KL'u oluşturur (Alder ve ark., 2012). Karlakton, kanonik SL'lar ile, yani ABC halkaları tam olan SL ile (örn: 5-deoksistrigol ve 4-deoksiorobanchol) yapısal olarak benzerdir. Bunun da ötesinde KL, SL ile benzer aktiviteye de sahiptir. Örneğın, *A. thaliana max4/ccd8* ve eltik *d10/ccd8* ve *d27* mutantlarında KL uygulaması ile dallanmanın baskılandığı gözlenmiştir (Alder ve ark., 2012; Scaffidi ve ark., 2013). Ayrıca, eltik *d10/ccd8* ve *d27* mutantlarında *Striga hermonthica* imlenmesi de KL tarafından uyarılmıştır (Alder ve ark., 2012). *A. thaliana* ve çeltikte yapılan radyoaktif işaretli KL deneyleri de, KL'un SL'in biyosentezinde bir ara

ürün olduğunu doğrulamıştır (Seto ve ark., 2014).

KL molekülü en basit SL olan 5-deoksistrigol'e dönüşebilmek için bir oksidasyon basamağından geçmelidir (Zhang ve ark., 2014). Bu adımı bir sitokrom p450 monooksijenaz enzimi olan MAX1 gerçekleştirmektedir. KL'un SL'a dönüşebilmesi için B ve C-halkalarının oluşmasına yönelik birkaç adım kalmaktadır (Alder ve ark., 2012). Bu adımları MAX1 tek başına yapıyor olabilir, ancak bu aşamada henüz bilinmeyen enzimler olması da mümkündür (Seto ve ark., 2012; Ruyter-Spira ve ark., 2013; Seto ve ark., 2014). Aktif bir SL metabolitinin sentezlenebilmesi için, CCD8'den sonra bir sitokrom p450 monooksijenaz olan MAX1'in aktivitesi gereklidir (Booker ve ark., 2005; Kohlen ve ark., 2011; Scaffidi ve ark., 2013). Bu mekanizma aşılama deneyleri ile aydınlatılmıştır. *d27*, *max3* ve *max4* mutantlarına ait gövde eksplantları, *max1* mutantının anaç köklerine aşılandığı zaman bitkilerin WT dallanma fenotipi gösterdiği, ancak tam tersi durumda aşırı dallanma gösterdiği gözlenmiştir (Booker ve ark., 2005; Waters ve ark., 2012a). Bu sonuçlar, SL öncülü olan KL'un bitkide yukarı kısımlara taşınabilen mobil bir öncül olduğunu, ayrıca MAX1'in SL biyosentez yolağında D27, MAX3 ve MAX4'ten sonraki bir aşamada görev yaptığını kanıtlar niteliktedir (Booker ve ark., 2005; Seto ve ark., 2014). *A. thaliana max1* mutantında ise KL miktarı, WT bitkiye oranla yaklaşık 700 kat fazla ölçülmüştür (Seto ve ark., 2014). Bunlara ek olarak, *max1* mutantlarında KL uygulamasının sürgün fenotipini geri çevirememesi ve bu mutantlarda aşırı KL birikimi gözlenmesi, KL'un MAX1 için bir substrat olduğunu göstermiştir (Scaffidi ve ark., 2013; Seto ve ark., 2014).

MAX1 hücre içinde sitoplazmada lokalize olan bir enzimdir ve kambiyal bölge ile ksilem parankimasında anlatıma uğrar (Booker ve ark., 2005). MAX1'in bu vasküler dokulardaki lokalizasyonu mobil SL öncülünün ksileme giriş veya çıkışında rol oynuyor olabileceğine işaret eder (Waldie ve ark., 2014). *A. thaliana* ve domates bitkilerinde de, SL ksilem öz suyunda tespit edilmiştir (Kohlen ve ark., 2011, 2012). Buna sonuçlara göre araştırmacılar, kök kaynaklı SL'ın sürgün dallanmasını kontrol etmek için ksilem yolu ile taşındığını belirtmişlerdir.

A. thaliana, bezelye ve çeltik bitkilerinde *max/rms/d* mutasyonları SL'ı tamamen elimine etmekten ziyade miktarlarını azaltmaktadır. Örneğin, WT bitki köklerindeki orobanchol miktarı, *max1* ve *max4* mutantlarına oranla iki katından fazla miktarda bulunmuştur (Kohlen ve ark., 2011). Bezelye *rms1/ccd8* mutantlarının kök eksüdasında fabasil asetat varlığı WT bitkiye göre 18 kat daha az bulunmuştur (Foo ve Davies, 2011).

Doğal SL şimdiye kadar birçok mono- ve dikotiledon bitkide tespit edilmiştir. Strigol

pamuk (Cook ve ark., 1966) ve mısırın (Siame ve ark., 1993) da içinde bulunduğu 8 bitkide, strigil asetat pamuk (Sato ve ark., 2005) ve kırmızı yoncada (Xie ve ark., 2008a), sorgomol sorgumun (Xie ve ark., 2008b) da içinde bulunduğu 4 bitkide, strigon *Houttuynia cordata* bitkisinde (Kisugi ve ark., 2013), 5-deoksistrigol bezelye, fasulye, bakla, yonca (Yoneyama ve ark., 2008), mısır (Awad ve ark., 2006) gibi 21 bitkide, metoksi-5-deoksistrigol 4 adet çeltik türünde (Jamil ve ark., 2011), fabasil asetat bezelyenin (Xie ve ark., 2009a) da içinde bulunduğu 6 türde, solanacol domates (Lopez-Raez ve ark., 2008) dahil olmak üzere 3 bitkide, solanasil asetat tütün bitkisinde (Xie ve ark., 2013), *Orobanchol A. thaliana* (Goldwasser ve ark., 2008), kırmızı yonca (Yokota ve ark., 1998) keten (Xie ve ark., 2009b), sorgum (Awad ve ark., 2006), domates (Lopez-Raez ve ark., 2010), bezelye, fasulye, bakla, yonca (Yoneyama ve ark., 2008), çeltik (Jamil ve ark., 2011), tütün (Xie ve ark., 2007) gibi 33 türde, orobanchyl asetat nohut, soya, yonca, fasulye, bezelye, yer fıstığı (Yoneyama ve ark., 2008) gibi 25 türde, 7-okzoorobanchol ve 7-hidroksiorobanchol keten (Xie ve ark., 2009b) bitkisinde, 7-okzoorobanchyl asetat krizantem, marul, petunya (Yoneyama ve ark., 2011) gibi 11 türde, 7-hidroksiorobanchyl asetat ise petunya, marul, salatalık (Yoneyama ve ark., 2011; Khetkam ve ark., 2014) gibi 5 türde tespit edilmiştir (Cavar ve ark., 2015).

SL bitkilerde çok düşük miktarlarda üretildiği için, SL çeşitlerinin belirlenmesi çalışmalarında genelde fosfat açlığı durumu yaratılır. Besindeki fosfatın azlığı, AMF ile etkileşimi teşvik ederek SL salınımını artırır (Yoneyama ve ark., 2001; Akiyama ve ark., 2006; Lopez-Raez ve ark., 2008). İnorganik fosfat varlığı veya yokluğu, petunyada *DAD1* (Breuillin ve ark., 2010), yoncada *MtCCD7*, *MtCCD8* ve *MtD27* (Bonneau ve ark., 2013), çeltikte *D27*, *D17/CCD7* ve *D10/CCD8* (Sun ve ark., 2014) ve krizantemde *DgD27* (Wen ve ark., 2016) gibi SL genlerinin transkript seviyelerini kontrol eder.

Doğal SL enol-eter köprüsüne bağlı bir D-halkası ve yapısı değişken olan bir grup ile karakterizedir (Bhattacharya ve ark., 2009; Al-Babili ve Bouwmeester, 2015). Bu değişken grup hidroksil grubu ise genellikle artan çimlenme aktivitesi ile (Xie ve ark., 2008a; Kim ve ark., 2010), eğer bu grup hidrofobik bir grup ise veya asetil bulunduruyorsa genellikle sürgün dallanması ile ilişkilendirilir (Boyer ve ark., 2012). SL kanonik ve kanonik olmayan SL olarak ikiye ayrılmıştır. Kanonik SL'da ABC ve D halkası mevcut iken, kanonik olmayanlarda A, B ve C halkalarından biri veya daha fazlası yoktur, ancak D-halkası mutlaka vardır (Al-Babili ve Bouwmeester, 2015; Yoneyama ve ark., 2018a). En basit kanonik SL, ilk kez *Lotus japonicus* bitkisinde keşfedilen, 5-deoksistrigol tür (Akiyama ve ark., 2005). Kanonik SL C halkasının stereokimyasına göre strigol tipi ve

orobanchol tipi olarak ikiye ayrılmıştır (Xie ve ark., 2013). En basit kanonik olmayan SL ise KL'dur (Alder ve ark., 2012).

Abe ve ark., (2014)'te yaptığı bir çalışmaya göre MAX1 KL'u substrat olarak kullanarak 3 tane oksidasyon adımı gerçekleştirir ve bunun sonucunda karlaktonik asit oluşur. Karlaktonik asitten ya 5-deoksistrigol veya 4-deoksiorobanchol oluşur, ya da metilasyona uğrayarak metil karlaktonat oluşur (Abe ve ark., 2014). Metil karlaktonatın ise Lateral Branching Oxydoreductase tarafından SL benzeri bir ürüne dönüştürüldüğü yakın zamanda belirlenmiştir (Brewer ve ark., 2016). Domates, *A. thaliana* ve kavak kök çevrelerine karlaktonik asit salgımlarken (Abe ve ark., 2014; Yoneyama ve ark., 2018b), kara yulafta (*Avena strigosa*) aveanol (Kim ve ark., 2014), ay çiçeğinde (*Helianthus annuus*) heliolactone (Ueno ve ark., 2014), mısırdaki (*Zea mays*) zealactone (Charnikhova ve ark., 2017) ve metil zealactonoate (Xie ve ark., 2017) ve *Lotus japonicus* bitkisinde lotuslactone (Xie ve ark., 2019) adı verilen kanonik olmayan SL tanımlanmıştır. Hem kanonik olan hem de olmayan SL kök çevresine salgılanmaktadır, ancak kanonik SL'in sayısının az olması ve köklerden gövdeye yapısal ve kimyasal özelliklerine özgü bir şekilde taşınmaları nedeniyle (Xie ve ark., 2016), gövde dallanmasını inhibe eden SL'in kanonik SL'dan çok kanonik olmayan SL olabileceği iddia edilmiştir (Yoneyama ve ark., 2018a).

Son zamanlarda sorgumda kanonik bir SL olan 5-deoksistrigol oluşumunda bir sulfotransferazın rol aldığı bildirilmiştir (Gobena ve ark., 2017). Bu transferazın fonksiyon kaybı üretilen SL tipini değiştirmektedir ve bu şekilde bir değişim parazit bitki türlerine karşı direnç sağlayabilir (Gobena ve ark., 2017; Jia ve ark., 2018). Ayrıca çeltikte 3-hidroksi-karlakton adlı bir metabolitin SL biyosentez yolunda D10/CCD8'den sonra oluştuğu belirtilmiştir (Baz ve ark., 2018). Bu sonuçlar, SL biyosentez yolağında hala keşfedilmeyi bekleyen çokça metabolit veya enzim olduğunu göstermektedir.

SL Algılanması ve Sinyal İletimi: Bitkilerde SL'in sinyal yolağı ile ilgili hala boşluklar olsa da yapılan birçok çalışmadan elde edilen bilgiler mevcuttur (Waldie ve ark., 2014). *A. thaliana*, bezelye ve petunyada aşılama deneyleri sonucunda SL'in köklerden sürgüne taşındığı fakat tam tersinin olmadığı gösterilmiştir (Beveridge ve ark., 1996; Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1997; Morris ve ark., 2001; Foo ve ark., 2001; Turnbull ve ark., 2002; Booker ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007). Domates ve *A.thaliana* bitkilerinde SL'ların ksilem öz suyunda tespit edilmesi bu tek yönlü hareketi doğrular niteliktedir (Kohlen ve ark., 2011). SL taşınmasında ayrıca Pleiotropic Drug Resistance 1 adlı proteinin görev yaptığı belirlenmiştir (Kretschmar ve ark., 2012). Bu protein kök

uçlarında fazlaca bulunmaktadır ve kök çevresine SL salgılanması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Kretzschmar ve ark., 2012).

D14 geni, α/β hidrolaz ailesine ait bir protein kodlamaktadır (Arite ve ark., 2009). Sentetik bir SL analogu olan GR24'ün α/β hidrolaz proteini DAD2/D14'e bağlandığı petunyada gözlenmiştir (Hamiaux ve ark., 2012). *A. thaliana*, çeltik ve petunya *d14/dad2* mutantlarında ise fazla dallanma gösteren bir fenotip görülmüştür, ancak biyosentez mutantlarının aksine bu mutantlarda dışarıdan SL uygulaması fenotipi geri çevirememiştir (Arite ve ark., 2009; Hamiaux ve ark., 2012; Waters ve ark., 2012b). Bu sonuçlara göre D14 SL biyosentezinde değil algılanmasında görev yapmaktadır. DAD2/D14 bir reseptör gibi, GR24'e bağlanarak yapısındaki enol-eter köprüsünü hidrolitik olarak kırar (Hamiaux ve ark., 2012; Kagiya ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2013). Bu katalitik işlem sonucunda D-halkası ABC halkalarından ayrılmış olur. Petunya bitkisinde DAD2/D14 enziminin hidrolize uğrattığı GR24 ürünü, *A. thaliana* bitkisine uygulandığı zaman dallanmayı inhibe etmemiştir (Hamiaux ve ark., 2012). Buna göre D-halkası tek başına aktivite gösterememektedir. Hidroliz adımını takiben D-halkası ile D14'ün ilişkisi kesilmez ve sinyal iletiminde görev yapan bir kompleks oluşur (Nakamura ve ark., 2013). Bu aşamadan sonra MAX2 devreye girmektedir.

MAX2/RMS4/D3 F-box lösince zengin tekrarları olan protein ailesinin bir üyesi olarak, D14 tarafından alınan SL sinyaline yanıtta görev alır (Stirnberg ve ark., 2002; Ishikawa ve ark., 2005; Johnson ve ark., 2006). Bu protein ailesinin üyeleri SKP1-Cullin-F-box Protein (SCF)-tipi protein-ubikitin ligaz kompleksinin substrat seçimi alt ünitesini oluştururlar (Skowry ve ark., 1997). SCF aracılı hedeflenmiş bir ubikitinasyon adımı, bitkilerde genel bir sinyal mekanizması olarak görev yapar (Thomann ve ark., 2005). Örneğin; oksin, giberellin, jasmonik asit gibi bitki hormonlarının sinyal iletimi mekanizmaları da SCF aracılı protein degradasyonunu içermektedir (Ruegger ve ark., 1998; Xie ve ark., 1998; Sasaki ve ark., 2003).

Çeltik bitkisinde, SL-duyarsız *d53* mutantları sayesinde, SL sinyal yolağını baskılayan D53 proteini karakterize edilmiştir (Jiang ve ark. 2013, Zhou ve ark. 2013). D14'ün SL'in D-halkasını hidroliz edip bu halkaya kovalent olarak bağlanması konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve oluşan bu kompleks D53 ile etkileşime girer (Zhou ve ark. 2013; Yao ve ark., 2016). Bu etkileşim sonucunda oluşan SL-D14-D53 kompleksi, SCF-MAX2/D3/RMS4 ubikitin kompleksi için bir hedef olmaktadır ve ubikitinasyon adımı ile represör D53 proteini yıkılarak SL sinyal mekanizması devreye girmektedir (Jiang ve ark. 2013, Zhou ve ark. 2013; Wang ve ark., 2015). *A. thaliana*

bitkisindeki D53 ortologu, ise SUPPRESSOR OF MAX2 1 (SMA1; Stanga ve ark., 2013)'dir. Çeltik ve petunyada GR24 uygulamasının DAD2/D14, D53 ve MAX2/RMS4/D3 etkileşimini indüklediği bildirilmiştir (Hamiaux ve ark., 2012; Jiang ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013). *d14* mutantları gibi, *max2/rms4/d3* mutantları da aşırı dallanmış fenotipe sahip olmakla birlikte, dışarıdan SL eklenmesi ile veya WT köklere aşılama ile bu fenotip geri döndürülemezdir (Beveridge ve ark., 1996; Stirnberg ve ark., 2002; Booker ve ark., 2005; Ishikawa ve ark., 2005; Johnson ve ark., 2006; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). Bununla birlikte, *d14* ve *d3/max2* mutantlarında bitkilerde aşırı SL birikimi gözlenmiştir (Umehara ve ark., 2008; Arite ve ark., 2009). Bu sonuçlar hem D14 hem de MAX2'nin SL algılanma ve sinyal iletiminde görev yaptığını göstermektedir. Ayrıca, MAX2'nin genellikle çekirdekte lokalize olması (Stirnberg ve ark., 2007; Dong ve ark., 2013), D14'ün ise çekirdek ve sitozolde lokalize olması (Nakamura ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013), SL algılanma ve sinyal iletimi süreçlerinin çekirdekte gerçekleşebileceğini gösterse de, SL sinyal iletim mekanizmasında halen çokça soru işareti bulunmaktadır (Waldie ve ark., 2014).

Yıllardır sürgün dallanmasını oksin, sitokinin ve absisik asitin kontrol ettiği düşünülmekteydi (Thimann ve Skoog, 1933; Skoog ve Tsui, 1948; El-Antably ve ark., 1967). Ancak, artık SL'nin de bu hormonlar ile bir uyum içerisinde gövde dallanmasını kontrol ettiği bilinmektedir. Oksin taşınmasından sorunlu PIN1 proteinlerinin plazma zarına birikimi, SL tarafından engellenmektedir (Bennett ve ark., 2006; Crawford ve ark., 2010; Shinohara ve ark., 2013). Bu şekilde oksinin taşınımı azalmakta ve sürgün gelişimi inhibe edilmektedir (Bennett ve ark., 2006; Ongaro ve ark., 2008; Crawford ve ark., 2010). SL mutantlarında sürgünlerin oksin tarafından inhibe edilmeye dirençli olması bu durumu desteklemektedir (Beveridge, 2000; Sorefan ve ark., 2003; Bennett ve ark., 2006). Buna teoriye göre SL sürgünleri direkt inhibe etmek yerine, oksin kanalizasyonunu azaltarak indirekt bir şekilde inhibe eder (Waldie ve ark. 2014). Ayrıca SL genlerinin transkript seviyelerinin oksin, absisik asit veya giberellin gibi hormonlara bağlı olarak düzenlenebildiği bildirilmiştir (Foo ve ark., 2005; Johnson ve ark., 2006; Zou ve ark., 2006; Arite ve ark., 2007; Hayward ve ark., 2009; Liang ve ark., 2010; López-Ráez ve ark., 2010; Liu ve ark., 2015; Wen ve ark., 2016; Guillotin ve ark., 2017; Ito ve ark., 2017). Ancak tüm bunlar hücresele seviyede kanıtlardır ve moleküler düzeyde rol oynayan mekanizmalar hala belirsizdir (Zwanenburg ve ark., 2016).

Zeytin Bitkisi: Zeytin, Akdeniz iklim kuşağında yetiştirilen çok yıllık bir bitkidir. Hem sofralık hem de yağlık olarak tüketilen zeytin, insan sağlığı açısından da oldukça

faydalıdır (Covas ve ark., 2006). Bu çalışmada kullanılan Ayvalık çeşidi Türkiye’de yüksek kaliteli yağ için üretilen en önemli çeşittir (İsfendiyaroğlu ve ark., 2009). Domat ise Türkiye’nin önde gelen sofralık yeşil zeytin çeşitlerindendir, ancak çelikle köklenmesi yetersizdir (Özkaya ve Çelik, 1994; Fabbri ve ark., 2004; Çetintaş Gerakkakis ve Özkaya, 2005; Türkoğlu ve Durmuş, 2005; İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2012; Tütüncü ve ark., 2016).

Gemlik ve Domat çeşitlerine ait çeliklerle yapılan bir araştırmada, çeliklere köklendirme hormonu olarak bilinen IBA (İndol bütirik asit) uygulaması yapıldığında, kolay köklenen Gemlik çeşidinde köklenme yüzdesi %60-90 arasında gözlenirken bu oran zor köklenen Domat çeşidinde %10-30 arasında kalmıştır (Özkaya ve Çelik, 1994). Gemlik ve Domat çeşitleri ile çalışan Özelbaykal ve Gezerel (2005) ise, bu çeşitlerin yeşil çeliklerine ilkbahar ve sonbaharda IBA uygulamışlardır. Buna göre, Gemlik çeşidinde 6000 ppm IBA varlığında köklenme yüzdesi sonbaharda %56, ilkbaharda ise %24 olmuştur. Domat çeşidinde ise 6000 ppm IBA varlığında köklenme yüzdesi sonbaharda %12, ilkbaharda ise %0 olmuştur. Bir başka çalışmada 5000 ppm IBA uygulamasında Domat çeşidinde %63,3 köklenme oranı gözlenirken, 3000 ppm NAA (Naftalen asetik asit) uygulamasında %36,6 köklenme gözlenmiş ancak hiç uygulama yapılmayan gruplarda ve tek başına salisilik asit uygulamalarında Domat çeşidinde köklenme gözlenmemiştir (İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2008). Bunun yanı sıra, Ayvalık ve Domat çeliklerinin farklı gelişme ortamlarında köklenmesi üzerine yapılan bir çalışmada, farklı ortamlar ve dönemler içinde Ayvalık çeşidinde en fazla %70 oranında kallus oluşumu gözlenirken Domat çeşidinde bu oran en fazla %36,67 olmuştur (Çetintaş Gerakkakis ve Özkaya, 2005). Aynı çalışmada Ayvalık çeşidi çeliklerinde %40’a kadar köklenme gözlenirken, Domat çeşidinde hiç köklenme gözlenmemiştir. Bununla birlikte, başka bir çalışmada Domat, Gemlik ve Sarı ulak çeşitlerinde IBA ve IAA (İndol asetik asit) uygulaması ile *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinin saçak kök oluşturma yeteneği kullanılmak istenmiştir (Tütüncü ve ark., 2016). Sonuçlara göre Gemlik çeşidinde köklenme başarısı %40’ı bulurken Sarı ulak çeşidinde %13’te kalmıştır. Ancak Domat çeşidinde hiç köklenme gözlenmemiştir. Yine bir başka çalışmada, Gemlik çeşidinde 117, Manzanilla çeşidinde 56, Hamza Çelebi çeşidinde 54 adet köklenmiş çelik gözlenirken, Domat çeşidinde yalnızca 16 tane çelikte köklenme gözlenmiştir (Türkoğlu ve Durmuş, 2005). Bu çalışmada ayrıca Şubat, Nisan ve Haziran aylarında kesilip köklenmeye bırakılan çeliklerden en çok köklenenlerin Nisan ayında alınanlar olduğu belirtilmiştir.

Zeytin bitkisinin, Akdeniz bölgesinde beslenme ve ekonomide önemli bir rolü vardır (Zamora ve ark., 2001) ve zeytin üretimi yapılan ülkelerde ekonomik anlamda önemi olan

türlerde köklenme sorunları gözlenebilmektedir (Fabbri ve ark., 2004). Çeliklerin yetiştirilme ortamı olarak perlit, coconut fiber veya vermikülitin iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Fabbri ve ark., 2004). İsfendiyoğlu ve ark. (2009) ise Ayvalık çeliklerini farklı ortamlar kullanarak köklendirmeyi denemişlerdir ve perlit:vermikülit karışımında %95 köklenme gözlemlemişlerdir (İsfendiyoğlu ve ark., 2009). Özkaya ve Çelik (1999) ise, yarı odun çelikleri zor köklenen (Domat) ve kolay köklenen (Gemlik) zeytin çeşitlerinde köklenme farklılığının nedenleri ve mekanizmasını araştıran çalışmalarında, toplam şeker ve nişasta düzeylerini belirlemişlerdir. Toplam şeker miktarının Domat çeşidinde Gemlik çeşidine göre daha yüksek bulunduğu saptanmıştır ve bunun zor köklenme ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

Zeytin bitkisinin ticari olarak çoğaltımı için doku kültürü şartlarında çoğaltım alternatif bir metot olabilir. Zeytinde *in vitro* kültürlerin avantajlarını Souza ve ark. (2013) şöyle sıralamışlardır: (i) nadir rastlanan hibritlerin kurtarılması, (ii) genetik manipülasyonların yapılabilmesi, (iii) hastalık taşımayan seçkin gen kaynaklarının çoğaltılabilmesi, (iv) fizyolojik, morfolojik ve anatomik çalışmaların yapılabilmesi.

Bu tez çalışmasında da Türkiye’de yetiştirilen Ayvalık ve Domat çeşitlerinde hem tohum hem de embriyolar eksplant olarak kullanılmış, doku kültürü şartlarında bu çeşitlerin ticari olarak üretilip üretilmeyeceği araştırılmış ve morfolojik gözlemler yapılmıştır. Bu amaçla doku kültürü şartlarında zeytin eksplantları kültüre alınmıştır. Eksplantların kültüre alınması için kullanılan besin ortamında karbon kaynağı olarak mannitol kullanılmıştır. Mannitol bitki aleminde rastlanan en yaygın şeker alkolüdür (Bialeski, 1982). Mannitol önceleri Oleaceae familyasına özgü sanılsa da diğer bitkilerde de yaygın olduğu görülmüştür (Bialeski, 1982). Zeytin bitkisinde mannitol şeker kompozisyonunun ana bileşenlerinden biridir ve yapılan bir çalışmada zeytin yapraklarında depolandığı belirtilmiştir (Flora ve Madore, 1993). Mannitol zeytin metabolizmasında ve taşıma sisteminde bulunmaktadır (Flora ve Madore, 1993), metabolik olarak aktiftir ve sükrozun yerine geçebilir (Bialeski 1982). Bir çalışmada zeytin kültürlerinde mannitol ve sükrozun etkileri araştırılmıştır. En etkili sonuçlar 34 g/L mannitol uygulamasında alınmıştır ve yüksek dozda sükrozun gelişimi inhibe ettiği, ancak yüksek dozda mannitolün gelişimi birkaç alt kültür sonrasında sadece azalttığı gözlenmiştir (Leva ve ark., 1994). Daha sonrasında mannitol zeytin doku kültürü çalışmalarında sıkça kullanılmıştır (Perri ve ark., 1994; Shibli ve ark., 2001; Chaari ve ark., 2002; Garcia ve ark., 2002; Lambardi ve ark., 2002; Zacchini ve De Agazio, 2004; Peixe ve ark., 2007; Rejskova ve ark., 2007; Lynch ve ark., 2011; Lambardi ve ark., 2012).

Doku kültürü şartlarında bitki gelişimi için sıcaklık da önemli bir faktördür. Bu nedenle zeytin çimlenmesinde sıcaklığın rolü araştırılmıştır. Chalkidikis çeşidine ait zeytin embriyoları 20°C sıcaklıkta %73 oranında çimlenmişlerdir (Voyiatzis, 1995). Ancak bunlardan, 2 ya da daha fazla 10°C soğuk uygulandıktan sonra kültüre alınanlarda çimlenme oranı %96'yı bulmuştur. 25 veya 30°C sıcaklıklarda ise çimlenme oranı oldukça düşük kalmıştır. Tohumlarda ise bu oran daha düşüktür. Soğuk uygulaması yapılmayan tohumlarda 20°C sıcaklıkta hiç çimlenme gözlenmemiştir. Bir başka çalışmada ise zeytin tohumlarının 4 hafta boyunca 10°C'de tutulması ve sonra 20°C'ye alınması önerilmiştir (Voyiatzis ve Porlingis, 1987). Bu nedenle bu tez çalışmasında embriyo ve tohumlara 4 hafta 10°C soğuk uygulaması yapıldıktan sonra 20°C'ye alınmışlardır.

Zeytin tohum ya da embriyolarının düşük sıcaklıklara maruz bırakılması çimlenmeleri için bir ön koşuldur (Voyiatzis, 1995). Zeytin tohumları sert endokarp dokusundan (Şekil 3.9) kurtulsalar dahi çimlenmek için hazır değildirler (Mitrakos ve Diamantoglou, 1984). Bu dormansiye, endosperm varlığının ve embriyoyu çevreleyen bir zarın neden olduğu düşünülmektedir (Voyiatzis, 1995'e göre, Istambouli and Neville, 1979). Endospermden embriyoya nüfuz eden inhibitörlerin olabileceği ve soğuk uygulamasının bu inhibitörleri deaktif edebileceği öne sürülmüştür (Voyiatzis, 1995). Ancak endospermden kurtulmak zeytin embriyolarının çimlenmesinde her zaman için bir çözüm olmayabilir. Embriyo dormansisinde ise endojen inhibitörlerin rol alabileceği (Voyiatzis, 1995'e göre, Istambouli and Neville 1979) belirtilmiştir. Voyiatzis ve Porlingis (1986), soğuk uygulaması yapılmayan tohumlarda, endospermdeki absisik asit miktarının embriyonun 3 katı olduğunu bildirmişlerdir. Yalnızca 1 hafta soğuk uygulaması ile bu miktar hemen düşmüştür. Embriyolarda ise soğuk uygulamasını 4 haftaya kadar uzatınca absisik asit miktarı sıfıra inmiştir (Voyiatzis ve Porlingis, 1986). Başka araştırmacılar ise bu dormansinin absisik asit tarafından gerçekleştirilen dormansiden farklı olduğunu, çünkü giberellik asit ile geri döndürülemediğini bildirmişlerdir (Mitrakos ve Diamantoglou, 1984; Sotomiyor Leon ve Duran Altisent, 1994).

Çok yıllık odunsu bitkilerde SL ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Söğüt gövde çeliklerine bazal olarak 5 µM GR24 uygulanan bir çalışmada, uygulama yapılan grupta 24 saat sonra tomurcuk gelişimi gözlenirken, kontrol grubunda 48 saat sonra gözlenmiştir (Ward ve ark., 2013). Bu çalışmaya göre GR24 tomurcuk gelişimini teşvik etmiştir. Söğüt bitkisinde tek bir noddan 3 tane tomurcuk geliştiğini bildiren araştırmacılar, GR24'ün tomurcuklar arasındaki yarışı durdurmak suretiyle bu gelişimi indüklemiş olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca, söğüt *MAX1*, *MAX2* ve *MAX4* genleri *A. thaliana*

mutantlarına aktarılmış ve *SxMAX1B*, *SxMAX2A*, *SxMAX2B*, *SxMAX4B* ve *SxMAX4G*’ün mutant fenotipi geri döndürebildiği bildirilmiştir (Ward ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, *Eucalyptus globulus* (Mavi Okaliptüs) ağacına GR24 uygulaması sonucunda kambiyum bölgesinde enine genişleme tespit edilmiştir (Agusti ve ark., 2011). Bir diğer çalışmada, *Acer palmatum* (Japon Akçaağacı) ağacında dallanma az olan kùltivarda yüksek miktarda SL tespit edilirken, normal dallanan çeşitte ise daha az SL bulunmuştur (Funnell, 2014). Aynı araştırmacı tarafından *Malus domestica* (Elma) ağacında SL miktarı az olduğu durumda dallanmanın fazla olduğu belirtilmiştir. Funnell (2014) ayrıca, elma fidanlarındaki SL miktarının, elma ıslahında istenilen dallanma miktarının ayarlanması için bir marker olarak kullanılabileceğine işaret etmiştir. Başka bir çalışmada ise *Citrus sinensis* (Portakal) ağacına spreyleme yöntemi ile 10 µM GR24 uyguladıklarında dallanma miktarının azaldığını ancak oluşan çiçek sayısının arttığını belirtmişlerdir (Zheng ve ark., 2018).

Sentetik SL analogu olan GR24’ün etkileri bazı ağaçlarda çalışılmış olsa da SL genleri şimdiye kadar çok yıllık odunsu bitkilerden yalnızca *Populus trichocarpa* (Kavak) bitkisinde karakterize edilmiştir. Czarnecki ve ark. (2014), *A.thaliana* MAX1, MAX2, MAX3 ve MAX4 protein dizilimlerini referans olarak kullanarak kavak genomunda araştırmışlardır. Biyoinformatik analizler sonucunda elde ettikleri homologlara PtrMAX1a, PtrMAX1b, PtrMAX2a, PtrMAX2b, PtrMAX3, PtrMAX4a ve PtrMAX4b isimlerini veren araştırmacılar, çeşitli dokularda bu genlerin ifadelerine Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle bakmışlardır. Fonksiyonel olan homoloğu bulmak için ise komplementasyon çalışmaları yapmışlardır. Bu genleri *A.thaliana* mutantlarına aktararak PtrMAX1a, PtrMAX1b, PtrMAX2a ve PtrMAX2b’nin fonksiyonel olduğunu, PtrMAX3, PtrMAX4a ve PtrMAX4b’nin ise kısmen fonksiyonel olduğunu bildirmişlerdir (Czarnecki ve ark., 2014). Bu araştırmacılar ayrıca biyoinformatik olarak D14 ve D27’nin protein homologlarını da kavak bitkisinde belirlemişlerdir. Aynı yöntemi kullanan Zheng ve ark. (2016) ise, kavak genomunda D14’ün 2 tane homoloğunu bulmuşlardır. PtD14a ve PtD14b isimlerini verdikleri genlerin ifadelerine Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle bakmışlar ve PtD14a’nın daha fazla anlatıma uğradığını belirlemişlerdir. *A. thaliana* mutantları ile gerçekleştirilen komplementasyon çalışmaları sonucunda ise sadece PtD14a’nın, mutant fenotipi geri döndürebildiğini belirterek, fonksiyonel olan ortologun PtD14a olduğunu bildirmişlerdir (Zheng ve ark., 2016).

SL’ın zeytin bitkisi üzerindeki etkilerinin gerek SL analogu gerekse SL inhibitörü kullanılarak belirlenmesi, bu bitki büyüme düzenleyicilerinin çok yıllık odunsu bitkiler

zerindeki etkilerinin belirlenmesi için önemli bir adımdır. Ayrıca bu çalışma ile ilk kez kavak dışında odunsu bir bitkide SL genlerinin moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. RACE Çalışmaları

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı) yöntemi, nükleotid dizisi kısmi olarak bilinen bir transkriptin, tamamının elde edilmesinde kullanılan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli bir yöntemdir. Bu yöntemle göre nükleotid dizisi kısmen bilinen bir transkriptin 3' ve 5' uçları ayrı ayrı çoğaltılarak, o transkriptin tamamı elde edilir. Transkriptin 3' ucunun dizisinin belirlenmesi için kullanılan yöntem kısaca 3'RACE, 5' ucunun dizisinin belirlenmesi için kullanılan yöntem ise kısaca 5'RACE olarak adlandırılır. Bu çalışmada zeytin Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin transkript dizilimleri RACE yöntemi ile belirlenmiştir.

3.1.1. Bitki Materyali ve RNA İzolasyonu

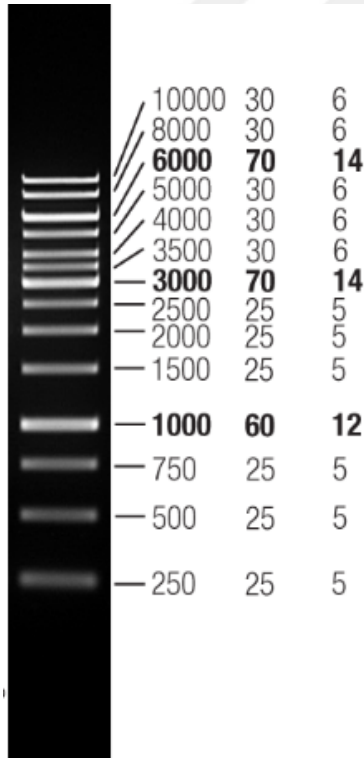
Strigolakton biyosentezi bitkilerde esas olarak kök dokusunda gerçekleşmektedir (Beveridge ve ark., 1996; Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1997; Morris ve ark., 2001; Turnbull ve ark., 2002; Booker ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007). Bu nedenle RACE çalışmalarında zeytin bitkisinin Ayvalık çeşidine ait kök dokuları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan zeytin materyalleri Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Müdürlükten zeytin Ayvalık çeşidine ait köklendirilmiş çelikler alınarak, laboratuvarında iklimlendirme kabini içerisinde 20°C'de ve %80-90 nem ortamında uzun gün koşullarında tutulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Ayvalık çeşidine ait köklendirilmiş çelikler

Kök dokularından total RNA izolasyonu Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen – 12183018A) ile ve TRIzol® Reagent (Thermo Fischer – 15596026) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için izolasyonda kullanılacak havan ve havan elleri, pensler ve spatüller, RNA degradasyonunun önlenmesi amacıyla %1’lik DEPC çözeltisi içinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün tüm malzemeler 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Aynı şekilde steril pipet uçları ve tüpler kullanılarak RNA izolasyonu yaklaşık 100 mg kök dokusu ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında RNA’ların miktarları Qubit 2.0 (Thermo Fischer) florometre cihazı ile ölçülmüştür. Daha sonra RNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek degradasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Elektroforezde 4,84 g/L tris ve 0,37 g/L EDTA ile hazırlanan TAE tamponu (pH: 8,0) ve 10 g/L etidyum bromür boyası kullanılmıştır. PZR ürünleri ve marker (GeneRuler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific, #SM0311) 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş ve elektriksel alanda yürütülmüştür. Elektroforezde kullanılan markerın haritası Şekil 3.2’de verilmiştir. PZR ürünleri UV ışık altında görüntülenmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan marker haritası

3.1.2. Zeytin Transkript Dizileri ile Primer Dizaynı

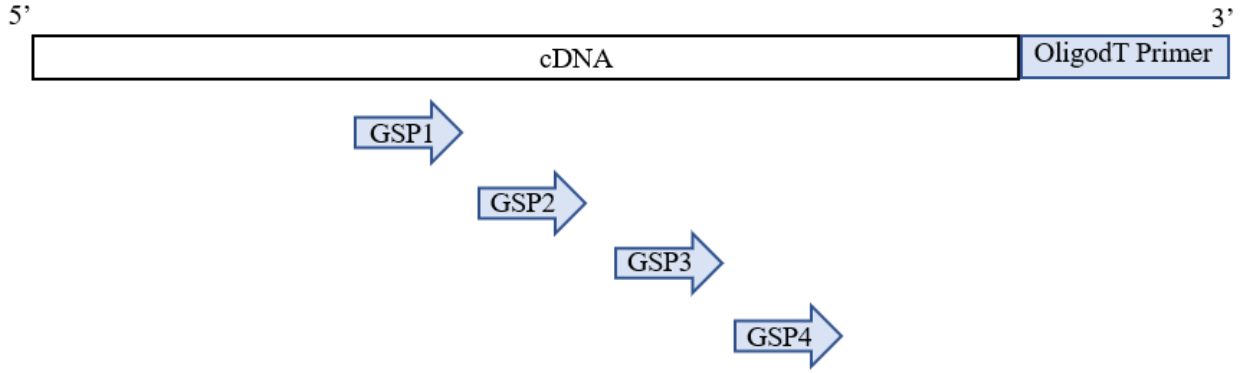
Zeytin bitkisinde SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu olan genlerin belirlenmesi amacıyla, primer seçimi için ilk önce NCBI SRA (National Center for Biotechnology Information, Sequence Read Archive) veri tabanından zeytin bitkisi Picual çeşidine ait transkript okumaları (NCBI-SAMN03784715) indirilerek laboratuvarında bulunan bilgisayarda yerel bir veri tabanı oluşturulmuştur (Mart, 2016). Sonrasında bu yerel veri tabanı, Geneious (R 8.1.7; Kears ve ark., 2012) yazılımı ile okumaların kalite skor değerlerine göre, 0,05 hata ihtimal limiti belirlenerek filtrelenmiştir. Buna ek olarak, 2016 yılında yağlık olarak kullanılan Farga zeytin çeşidi (Cruz ve ark., 2016) ve 2017’de yabanıl tip bir zeytin çeşidi olan Sylvestris’e ait (Ünver ve ark., 2017) proteom, transkriptom ve genom bilgileri yayınlanmıştır. Aynı şekilde bu iki çeşide ait transkript okumaları da indirilerek Geneious yazılımına yüklenmiştir. Böylece RACE çalışmaları için primer seçiminde 3 farklı çeşide ait transkriptom bilgileri kullanılmıştır.

RACE yöntemi ile bir transkriptin 3’ ve 5’ uçlarının belirlenerek tam transkriptin belirlenebilmesi için, o genlere ait transkriptlerin kısmi dizilerinin biliniyor olması gerekmektedir (Scotto-Lavino ve ark., 2006b). SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin zeytin bitkisindeki kısmi transkript dizilerinin elde edilebilmesi amacıyla, referans transkriptler olarak kullanılmak üzere, sekans bazında zeytine oldukça benzeyen ve hakkında en çok bilgi bulunan familyalardan biri olan Solanaceae familyası üyelerinden *Solanum lycopersicum* dizileri alınmıştır. *S. lycopersicum* bitkisine ait bu SL transkript dizileri referans olarak kullanılarak, oluşturulan 3 farklı çeşide ait yerel zeytin transkript veri tabanlarında zeytine ait SL genlerine ait diziler Geneious yazılımı ile araştırılmıştır. Bu yazılıma ait “map to references” seçeneği kullanılarak, *S. lycopersicum* SL genlerine ait transkriptleri zeytin veri tabanına karşı haritalanmış ve zeytin SL genlerinin kısmi transkript dizileri elde edilmiştir. Bu diziler RACE çalışmalarında kullanılacak zeytin bitkisine özgü primerlerin dizaynı için kullanılmıştır.

RACE çalışmalarında kullanılmak üzere primerler Geneious yazılımı ile seçilmiştir. Bunun için;

- Yazılımda bulunan “Primers” sekmesinden “Design new primers” seçeneği kullanılmıştır,
- 3’ RACE çalışmaları için yalnızca “Forward Primer” seçeneği, 5’ RACE çalışmaları için yalnızca “Reverse Primer” seçeneği, ortada kalan bölgelerin çoğaltımı için ise her iki seçenek de kullanılmıştır,

- Primer uzunluğu olarak ortalama değer 20 baz olarak seçilmiştir,
- Tm derecesi olarak ortalama 60°C belirlenmiştir,
- %GC oranı olarak ortalama değer 50 olarak belirlenmiştir,
- Diğer ayarlar varsayılan değerler ile bırakılmıştır.

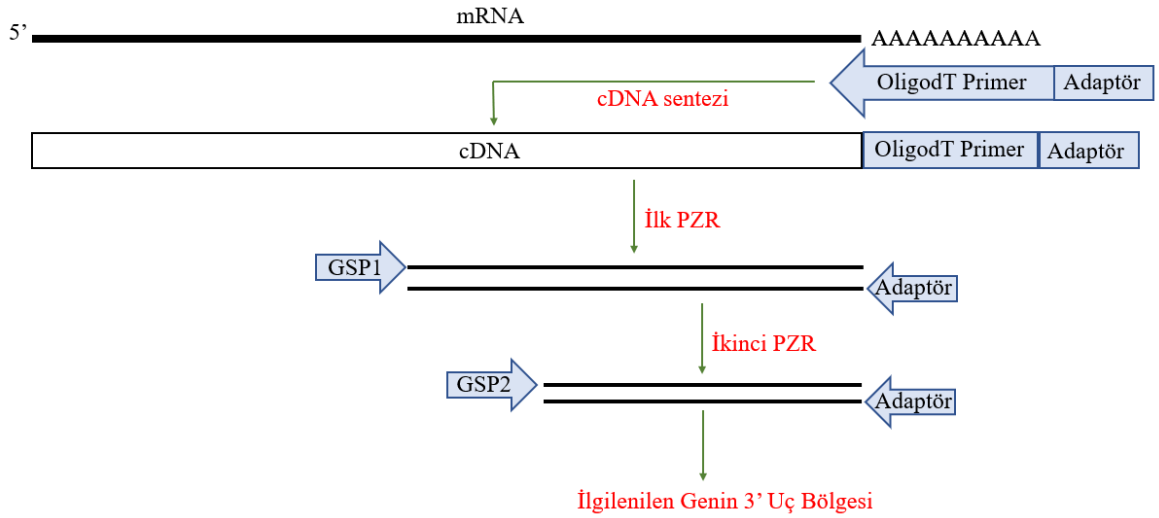


şekil 3.3. RACE alışmaları için dizayn edilen primerlerin yerleşimi (şekil üzerinde 3' RACE alışmaları için seçilen primerlerin yerleşimi gösterilmektedir)

Zeytine özgü dizilerden her gen için 3' ve 5' RACE alışmaları için 4'er adet primer seçilmiştir (şekil 3.3). Orta bölgelerin çoğaltımı için ise her gen için birer çift primer belirlenmiştir. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda beklenen bant büyüklükleri her gen için ayrı ayrı kaydedilmiştir

3.1.3. 3' RACE alışmaları

Zeytin Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu gen transkriptlerinin 3' uçlarının belirlenebilmesi için 3'RACE alışmaları Scotto-Lavino ve ark. (2006a)'nın önerdiği protokole göre yapılmıştır. Bunun için, ucunda adaptör bir dizi içeren OligodT primerleri ile cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra da OligodT primerine bağlanan adaptör bir primer ve gen spesifik primerler (GSP) ile ilgili transkriptin 3' uçları PZR ile elde edilmiştir (şekil 3.4).



Şekil 3.4. 3' RACE yöntemi

Scotto-Lavino ve ark. (2006a)'nın önerdiği protokole göre 3'RACE çalışmaları için gen spesifik iki adet primer yeterlidir. Ancak çalışmada, RACE ürünlerinin çoğaltımı esnasında özgünlüğü sağlamak amacı ile, ürünlere daha iç bir bölgeden bağlanabilecek iki primer daha seçilmiş ve her gen için toplamda dörder primer dizayn edilmiştir.

3' RACE için cDNA Sentezi: Köklerden elde edilen total RNA (5 µg) cDNA sentezi için kullanılmıştır. RNA'larda genomik DNA kontaminasyonu, DNaz (DNase I, RNase free-Thermo Fischer Scientific-EN0525) uygulanarak engellenmiştir. Bunun için öncelikle RNA'lara 37°C' de 30 dakika DNaz (1u/µL) ile muamele edilmiş ve sonra bu enzim, reaksiyona 1 µL EDTA (50 mM) eklenerek 65°C' de 10 dakika süreyle inaktive edilmiştir. Bu reaksiyon için toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 10 µL'ye tamamlanmıştır.

Bu aşamayı takiben sekonder yapılarının açılması için RNA 80°C'de 3 dakika inkübe edilmiş, ardından buz üzerinde soğutulup 5 saniye süreyle mikrosantrifüjde çöktürülmüştür. Ardından, tüm cDNA bileşenleri (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, 4368814) buz üzerinde eklenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. 3'RACE için cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
10X reaksiyon tamponu	2 µL	1X
100mM dNTP	0,8 µL	4 mM
10µM Oligo-dT adaptör primeri	1 µL	0,5 µM
RNaz inhibitörü	1 µL	-
0.1M DTT	2 µL	10mM
Nükleaz içermeyen su	2,2 µL	
Toplam	9 µL	

Reaksiyon kurulurken steril pipet uçları ve ince cidarlı (200 µL) PZR tüpleri kullanılmıştır. Primer olarak, poliA kuyruğuna bağlanan olan ve ucunda adaptör dizi içeren OligodT primerleri (5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') eklenmiştir. Revers transkriptaz enzimi (50u /µL) de son bileşen olarak eklendikten sonra toplam hacim 20 µL olmuş ve tüpler cDNA sentezi için termal döngü cihazına (BIORAD, PTC200) yerleştirilmiştir. Bu cihazda uygulanan program Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. 3' RACE çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	25	5
2	42	60
3	50	10
4	70	15

Reaksiyon sonrasında tüplerdeki RNA kalıbı 20 dakika 37 °C'de 0,75 µl (1.5 u) RNaz enzimi (Thermo Scientific, EN0531) ile parçalanmıştır. Son olarak elde edilen cDNA kalıpları Tris-EDTA tamponu ile 1 mL'ye tamamlanmış ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3' RACE için RT-PZR Çalışmaları: Elde edilen cDNA'lar kalıp kullanılarak RT-PZR (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmaları yapılmıştır. Bu RT-PZR çalışmaları ile zeytin bitkisi Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4*, *D14* ve *D27*)

transkriptlerinin 3' uçları elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk RT-PZR çalışmalarında her gene özgü 1 numaralı primerler (GSP1) ve OligodT primerin adaptör dizisine bağlanacak primerler (5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3' ve 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3') kullanılmıştır. Bu PZR çalışmalarında yüksek verimlilik ile çalışan Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F530L) enzimi kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. RACE çalışmaları için PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
5X High Fidelity PZR Tamponu	5	1X
10mM dNTP mix	0,5	200 µM
10µM Forward Primer (GSP)	1	0,4 µM
10µM Reverse Primer (Adaptör)	1	0,4 µM
Kalıp cDNA	1	-
Nükleaz içermeyen su	16,25	-
High Fidelity PZR Enzyme Mix	0,25	0,02 u/µl
Toplam hacim	25	

Primerlerin bağlanma sıcaklığının test edilmesi ve ürün veriminin artırılması amacı ile gradiyent RT-PZR gerçekleştirilmiş ve farklı bağlanma sıcaklıkları test edilmiştir. GSP1 ile yapılan ilk RT-PZR programında döngüler başlamadan önce 72°C'de 40 dakikalık bir uzama eklenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. RACE çalışmaları için ilk RT-PZR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
98	5	1
98	30	
54-62	2	1
72	40	
98	30	
54-62	30	35
72	2	
72	10	1
4	30	1

3' RACE çalışmalarında kurulan bu ilk RT-PZR sonucu elde edilen ürünler etidyum bromür ile %1'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. Daha sonra, ilk PZR sonucunda elde edilen bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, bu kez de daha iç kısma bağlanan 2 numaralı gen spesifik primerler (GSP2) ve yine OligodT primer adaptör dizisine bağlanan primer ile ikinci RT-PZR kurulmuştur (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. RACE çalışmaları için nested RT-PZR koşulları

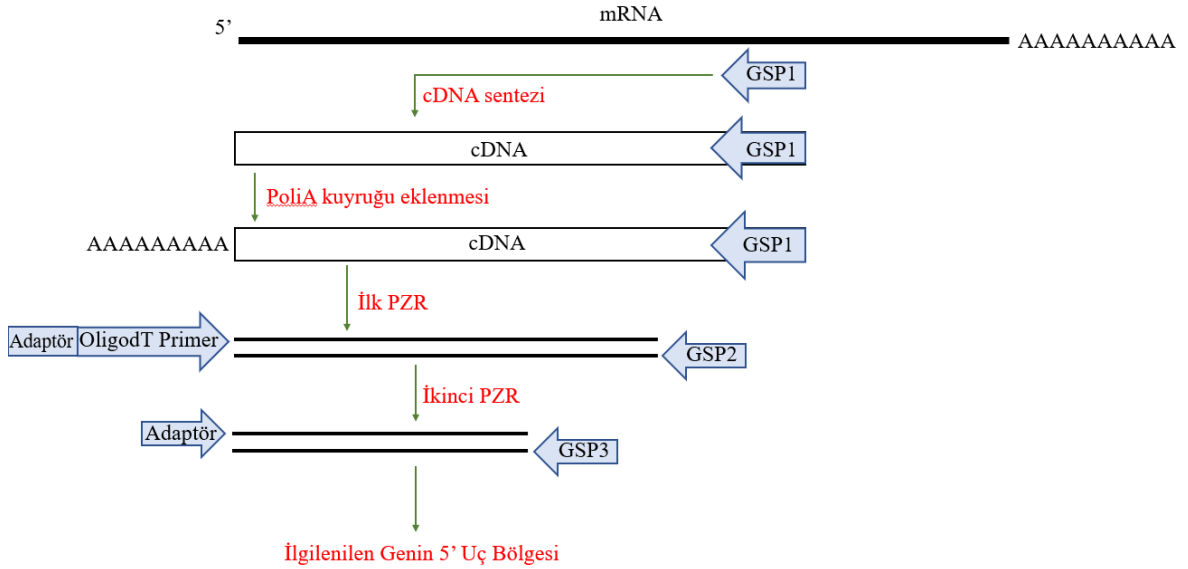
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
98	3	1
98	30	
54-62	30	36
72	2	
72	10	1
4	30	1

Bant boyutları beklenen büyüklüğe yakın olan PZR ürünleri jel ekstraksiyon kiti (PureLink® Quick Gel Extraction Kit, K210012) ile izole edilmiştir. Bu aşamada beklenen ürünler elde edilemediğinde, ikinci PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 primerleri ile ve üçüncü PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP4 primerleri ile daha iç bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. GSP3 ve GSP4 primerleri ile yapılan PZR çalışmalarında da Çizelge 3.5'teki program kullanılmıştır. Daha sonra bu ürünlerin dizilenmesi Sanger metodu ile (Sanger ve ark., 1977) ve hizmet alımı yolu ile yapılmıştır (MacroGen, Hollanda). Dizi analizi sonuçları ise biyoinformatik araçlar kullanılarak hem transkript hem de protein düzeyinde analiz edilmiştir.

3.1.4. 5' RACE Çalışmaları

Zeytin Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu gen transkriptlerinin 5' uçlarının belirlenebilmesi için 5'RACE çalışmaları Scotto-Lavino ve ark. (2006b)'nın önerdiği protokole göre yapılmıştır. Bu nedenle, 3' RACE yönteminden farklı olarak cDNA sentezi her gen için ayrı ayrı gen spesifik primer 1 (GSP1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise sentezlenen bu cDNA'nın uç kısmına protokolde önerildiği gibi terminal transferaz enzimiyle poliA kuyruğu bağlanmıştır. Sonrasında da bu poliA kuyruğuna bağlanacak olan OligodT

adaptör primeri ve gen spesifik bir primerler (GSP) ile PZR yapılarak, ilgili transkriptin 5' ucu elde edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 5' RACE yöntemi

Scotto-Lavino ve ark. (2006b)'nın önerdiği protokole göre 5'RACE çalışmaları için gen spesifik üç adet primer gereklidir. Bu primerlerden ilki ile cDNA sentezi gerçekleştirilir, ikinci ve üçüncü ile de PZR çalışmaları yapılır. Ancak RACE ürünlerinin çoğaltımı esnasında özgünlüğü sağlamak amacı ile, ürünlere daha iç bir bölgeden bağlanabilecek bir primer daha seçilerek, her gen için toplamda dörder primer dizayn edilmiştir.

5' RACE için cDNA Sentezi: Kök dokularından elde edilen total RNA'lar (5 µg) cDNA sentezi için kullanılmıştır. Öncelikle RNA'lar DNaz (DNase I, RNase free-Thermo Fischer Scientific-EN0525) ile muamele edilmiş ve DNA kontaminasyonu engellenmiştir. Bu aşamayı takiben reaksiyona GSP1 eklenmiş ve karışım 80°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler buz üzerinde soğutulmuş ve 5 saniye süreyle mikrosantrifüjde çöktürülmüştür. Ardından, tüplere tüm cDNA bileşenleri (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, 4368814) buz üzerinde eklenmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. 5' RACE için cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
10X reaksiyon tamponu	2 µL	1X
100mM dNTP	0,8 µL	4 mM
RNaz inhibitörü	1 µL	-
Gen Spesifik Primer 1	1 µL	0,5 µM
0.1M DTT	2 µL	10mM
Nükleaz içermeyen su	2,2 µL	
Toplam	9 µL	

Primer olarak, 5' RACE çalışmaları için her gene özgün olarak seçilen GSP1 kullanılmıştır. Revers transkriptaz enzimi (50u /µL) de son bileşen olarak eklendikten sonra tüpler cDNA sentezi için termal döngü cihazına (BIORAD, PTC200) yerleştirilmiştir. Bu cihazda uygulanan program Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. 5' RACE çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	42	60
2	50	10
3	70	15

Reaksiyon sonrasında RNA kalıbını elimine etmek için 20 dakika 37 °C'de 0,75 µl (1,5u) RNaz enzimi (Thermo Scientific, EN0531) uygulanmıştır. Son olarak elde edilen cDNA kalıpları Tris-EDTA tamponu ile 400 µL'ye tamamlanmıştır. Literatürde önerildiği gibi, elde edilen bu cDNA ürünü PZR Saflaştırma Kiti (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fischer, K0701) ile saflaştırılmıştır. Daha sonra bu cDNA'lara terminal transferaz enzimi (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Thermo Fischer, EP0161) ile poliA kuyruğu eklenmiştir. Bunun için cDNA'nın bulunduğu tüpe 4 µl tailing tamponu, 1,2 µl CoCl₂, 0,4 µl dATP ve 10u terminal transferaz enzimi eklenmiştir. Bu reaksiyon 37°C'de 15 dk ve 70°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra son hacim Tris-EDTA tamponu ile 500 µL'ye tamamlanmıştır ve örnekler kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

5' RACE için RT-PZR Çalışmaları: GSP1 ile elde edilen ve ucuna poliA kuyruğu takılan cDNA'lar kalıp kullanılarak RT-PZR çalışmaları yapılmıştır. Bu RT-PZR

çalışmaları ile zeytin bitkisi Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4*, *D14* ve *D27*) transkriptlerinin 5' uçlarının elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk RT-PZR çalışmalarında, GSP1 cDNA sentezinde kullanıldığı için, her gene özgü 2 numaralı primerler (GSP2) ve OligodT primer kullanılmıştır. Bu PZR çalışmalarında yüksek verimlilik ile çalışan Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F530L) enzimi kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Primerlerin bağlanma sıcaklığının test edilmesi ve yüksek verimlilikte ürünlerin elde edilmesi amacı ile RT-PZR çalışmaları gradiyent olarak gerçekleştirilmiş ve farklı bağlanma sıcaklıkları denenmiştir. GSP1 ile yapılan ilk RT-PZR'nda döngüsel aşamaya geçmeden önce 72°C'de 40 dakikalık bir uzama aşaması vardır (Çizelge 3.4).

5' RACE çalışmalarında kurulan bu ilk RT-PZR sonucu elde edilen ürünler etidyum bromür ile %1'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. Daha sonra, ilk PZR sonucunda elde edilen bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, bu kez de daha iç kısma bağlanan 3 numaralı gen spesifik primerler (GSP3) ve yine OligodT primerin adaptör dizisine bağlanan primer ile ikinci RT-PZR kurulmuştur (Çizelge 3.5).

Bant boyutları beklenen büyüklüğe yakın olan PZR ürünlerinin jelden izolasyonları jel ekstraksiyon kiti ile (PureLink® Quick Gel Extraction Kit, K210012) yapılmıştır. Bu aşamada beklenen boyutta ürünler elde edilemediğinde, ikinci PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP4 primerleri ile daha iç bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. GSP4 primerleri ile yapılan PZR çalışmalarında da Çizelge 3.5'teki program kullanılmıştır. Daha sonra bu ürünlerin dizilenmesi Sanger metodu ile (Sanger ve ark., 1977) ve hizmet alımı yolu ile yapılmıştır (MacroGen, Hollanda). Dizi analizi sonuçları ise biyoinformatik araçlar kullanılarak hem transkript hem de protein düzeyinde analiz edilmiştir.

3.1.5. Transkriptlerin Orta Bölgelerinin Çoğaltımı

RACE yönteminde ilgili transkriptin 3' ve 5' uç kısımlarının dizilerinin elde edilmesinden sonra, ortada kalan bölgenin de dizilenmesi gerekmektedir. Bu amaçla zeytine özgü transkript dizilerinden her bir gen için orta bölgelerini çoğaltacak primerler seçilmiştir. Bu primerlerin seçiminde, RACE primerleri için göz önünde bulundurulmuş kriterler kullanılmış ve Geneious yazılımı ile seçimler yapılmıştır.

Transkriptlerin orta bölgelerinin çoğaltılabilmesi için cDNA sentezinde random primerler kullanılmıştır. Bu reaksiyon için kullanılan bileşenler Çizelge 3.8'de, sentez için kullanılan program ise Çizelge 3.9'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
10X reaksiyon tamponu	2 µL	1X
100mM dNTP	0,8 µL	4 mM
10µM Random primer	1 µL	0,5 µM
RNaz inhibitörü	1 µL	-
Nükleaz içermeyen su	4,2	
Toplam	9 µL	

Çizelge 3.9. cDNA sentezi programı

İşlem sırası	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, her gen için seçilen primerler ve yüksek verimlilikle çalışan Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F530L) enzimi ile Çizelge 3.3'teki bileşenler ve Çizelge 3.5'teki program kullanılmış ve PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda adaptör primerler yerine, her bir gene özgü seçilen bir çift primer kullanılmıştır ve gradiyent PZR ile farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Bu PZR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde elektroforez ile analiz edilmiş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Bant boyutları beklenen büyüklükte olan PZR ürünlerinin jelden izolasyonları jel ekstraksiyon kiti ile (PureLink® Quick Gel Extraction Kit, K210012) yapılmıştır ve bu ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.

3.1.6. RACE Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada RACE ürünlerinin nükleotid dizilişleri hizmet alımı yolu ile ortaya çıkarılmıştır. Bu ürünler GSP3 ve GSP4 primerleri ile uç bölgelerinden az iki kez okutulmuştur. Ayrıca orta bölgelerden elde edilen ürünler de kendi primerleri ile çift taraflı dizilenmiştir.

Elde edilen okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile değerlendirilmiştir. Çalışmada Ayvalık çeşidine ait transkript dizileri 0,05 hata limiti belirlenerek "Trim and Filter"

seçeneği ile kalite skor değerlerine göre filtrelenmiş ve okuma kalitesi düşük olan uç kısımlar kırılmıştır. Bu işlem sonrasında transkript dizileri her gen için ayrı ayrı bir şekilde birleştirilmiştir. Bu birleştirme işlemi Geneious yazılımında “Map to References” seçeneği ile yapılmıştır. Referans dizi olarak biyoinformatik analizler sonucu elde edilen Sylvestris çeşidine ait transkriptom okumaları kullanılmıştır. Birleştirme işlemi sonucunda elde edilen Ayvalık çeşidine özgü konsensüs transkript dizisi NCBI veri tabanında diğer bitki türlerine karşı BLASTn ile araştırılmıştır. Böylece Ayvalık çeşidine ait transkript okumalarının, dizisi bilinen diğer bitki türleri ile olan benzerlikleri belirlenmiştir.

RACE çalışmaları sonucunda elde edilen konsensüs dizinin kodladığı aminoasit dizilimi ayrıca belirlenmiştir. Böylece Ayvalık SL genlerinden kodlanan proteinlerin dizilimi, aminoasit sayısı ve korunmuş domain bölgeleri gibi protein karakteristikleri biyoinformatik araçlar ile tahmin edilmiştir.

3.2. Biyoinformatik Analizler

2017 yılında yabancı tip bir zeytin çeşidi olan Sylvestris’e ait annotate edilmiş transkriptom verisinin yayınlanması ile SL biyosentezi, algılanması ve sinyal iletiminde rol alan genlere ait genomik, transkript ve protein dizileri biyoinformatik olarak belirlenmiştir (Ünver ve ark., 2017). Bu analizler mevcut veri tabanlarındaki Sylvestris dizileri ile yapılmış olup bu adımlar basamaklar halinde aşağıda belirtilmiştir;

-Çalışmada ilk olarak Sylvestris çeşidine ait genom, transkriptom ve proteom okumaları NCBI veri tabanından bilgisayara indirilmiş ve yerel bir veri tabanı oluşturulmuştur.

-Daha sonra benzer şekilde, zeytin Farga çeşidi (Cruz ve ark., 2016) ve domatese (*Solanum lycopersicum*) ait proteom verileri de indirilmiş ve Geneious programı içerisine kaydedilmiştir.

-Oluşturulan yerel veri tabanlarında SL biyosentezi, algılanması ve sinyal iletiminde rol alan genlere ait dizilerin araştırılabilmesi için öncelikle *Arabidopsis thaliana* bitkisi SL protein dizileri referans dizi olarak kullanılmıştır. Referans proteinlerin amino asit dizilişleri TAIR (The Arabidopsis Information Resource; <https://www.arabidopsis.org>) web sayfasından elde edilmiştir.

-Daha sonra, Geneious yazılımında Blastp algoritması “Full sequence with annotations” parametresi çalıştırılmış ve yerel veri tabanındaki Sylvestris, Farga ve domatese ait ilgili protein dizileri belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda Sylvestris ve Farga çeşitleri ile domates bitkisine ait varsa ilk 20 eşleşme kaydedilmiştir. Bu eşleşmeler ve A.

thaliana protein dizileri filogenetik ağaç çiziminde kullanılmıştır.

-Filogenetik ağaçlar için ilgili genlere ait protein dizileri Geneious programında bulunan “Muscle” algoritması (Edgar, 2004) ile varsayılan parametreler eşliğinde hizalanmıştır. Daha sonra Geneious programında “Geneious Tree Builder” seçeneği kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritması ile filogenetik ağaçlar çizilmiştir. Uzaklık tabanlı bir metot olan UPGMA, hızlı ve kolay bir yöntem olarak başlangıç analizleri için elverişli olması nedeniyle tercih edilmiştir (Sarıçam ve Müştak, 2015).

-Sylvestris çeşidine ait bu protein dizilerine ait olabilecek transkriptlerin belirlenmesi için tblastn algoritması kullanılmıştır. Sylvestris transkriptom veri tabanında tblastn algoritması “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak çalıştırılmıştır.

-Belirlenen transkript dizileri ise daha sonra, Sylvestris genom veri tabanında blastn seçeneği kullanılarak tek tek araştırılmıştır. Bu seçenek kullanılırken sonuçlar 20.000 baz upstream ve 20.000 baz downstream bölgelerini de içerecek şekilde elde edilmiştir. Böylece hem transkript dizilerine karşılık gelen genom dizileri elde edilmiş, hem de genomik bölgenin baş veya uç kısmında olabilecek komşu genlerin yerleşimlerine göz gezdirme imkanı olmuştur.

-Ayrıca bu genomik bölgelerde ilgilenilen genin baş kısmından, ilk ekzondan önceki 1500 bazlık bölge seçilerek ayrı bir dosya olarak kaydedilmiş ve bu diziler promotor analizi için kullanılmıştır. Genomik bölgelerde genden önce gelen -1500 bp promotor bölgeleri düzenleyici motifler için PlantCARE (Plant Cis-Actin Regulatory Element; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>; Lescot ve ark., 2002) aracı ile analiz edilmiştir.

-Belirlenen proteinlerin, protein karakteristiklerinin belirlenmesi için çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılmıştır. Bu amaçla her gen için bulunan protein dizilerinin moleküler ağırlıkları, izoelektrik noktaları, hücre içi lokalizasyonları ve korunmuş domainleri teorik olarak belirlenmiştir.

-Proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları ExPASy portalındaki ProtParam aracı ile (<https://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger ve ark., 2005) tahmin edilmiştir.

-Hücre içi lokalizasyonları ise CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>; Yu ve ark., 2006) ile tahmin edilmiştir.

-Proteinlerin korunmuş domain analizleri ise Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü’nün Interpro aracı ile (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Mitchell ve ark., 2019)

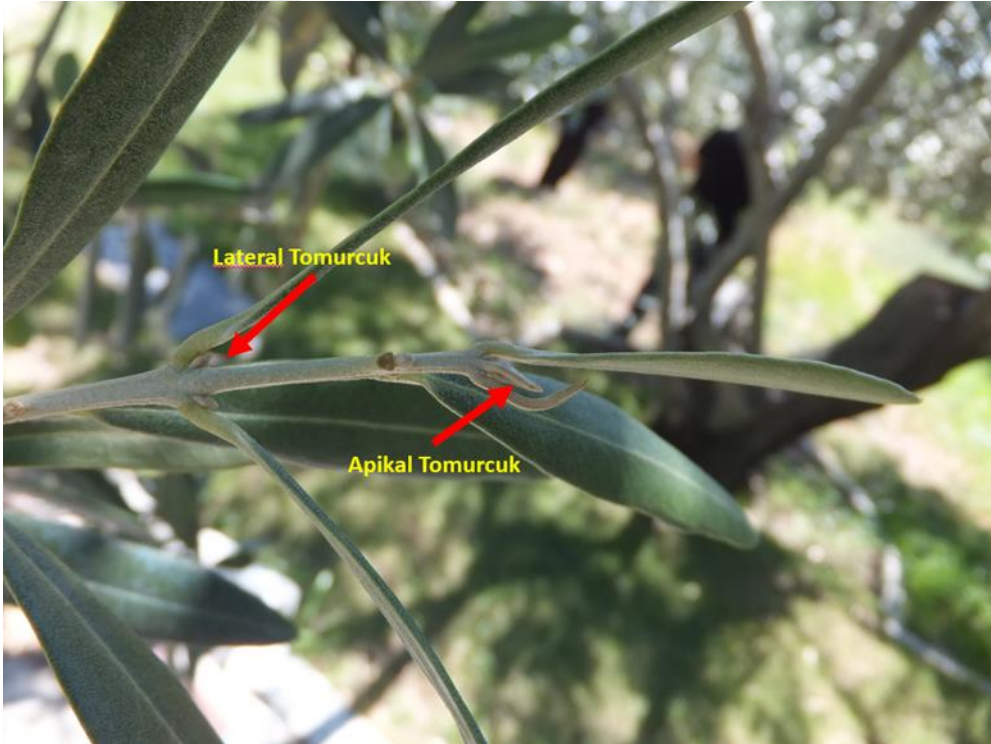
gerçekleştirilmiştir.

3.3. Gen Anlatım Çalışmaları

Bu tez çalışmasında zeytin Ayvalık çeşidine ait çeşitli dokularda SL biyosentez, algılama ve sinyal iletiminde görev alan genlerin anlatım düzeyleri belirlenmiştir. Bunun için SYBR Green I metodu ile Gerçek-Zamanlı PZR (qPZR) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Bitki Materyali

Zeytin bitkisi Ayvalık çeşidi SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin (*OeMAX1*, *OeMAX2*, *OeMAX3*, *OeMAX4*, *OeD14* ve *OeD27*) anlatım miktarlarının belirlenmesi için, SL biyosentezinin gerçekleştiği kök dokusu, algılanma ve sinyal iletiminin gerçekleşebileceği apikal ve lateral tomurcuk dokuları ile yaprak dokusu kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. qPZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere toplanan Ayvalık dokuları

Bu dokular Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü'nde yetiştirilen ağaç ve fidelerden temin edilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilecek biyolojik deney tekrarları için her bir doku 3 farklı bitkiden toplanmıştır. Eldiven ve steril edilmiş pensler ile toplanan

dokular mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve bekletilmeden sıvı azot içerisinde dondurulmuştur.

3.3.2. RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi

Laboratuvara getirilen dokulardan bekletilmeden total RNA izolasyonu, Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen – 12183018A) ile ve TRIzol® Reagent (Ambion – 15596026) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyonda kullanılan havan ve havan elleri, pensler ve spatüller, pipet uçları ve diğer plastik malzemeler RNA degradasyonunun önlenmesi amacıyla %1’lik DEPC çözeltisi içinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün tüm malzemeler 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. RNA izolasyonu yaklaşık 100 mg doku ile gerçekleştirilmiştir. RNA’ların miktarları Qubit 2.0 (Thermo Fischer) florometre cihazı ile ölçülmüştür. Sonrasında RNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek herhangi bir degradasyon olup olmadığı da belirlenmiştir.

Dokularından total RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için toplamda 1 µg total RNA kullanılmıştır. RNA’lara DNaz (DNase I, RNase free-Thermo Fischer Scientific-EN0525) uygulanarak DNA kontaminasyonu engellenmiştir. Bunun için öncelikle RNA’lara 37°C’ de 30 dakika DNaz (1u/µL) uygulanmış ve sonra bu enzim 1 µL EDTA (50 mM) ile 65°C’ de 10 dakika süreyle inaktive edilmiştir.

qPZR çalışmaları için cDNA sentezinde random primerler kullanılmıştır. Bu reaksiyon için kullanılan bileşenler (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, 4368814) Çizelge 3.8’de, sentez için kullanılan program ise Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Elde edilen cDNA’lar önce primerlerin verimliliklerinin belirlenmesinde daha sonra da gen anlatım çalışmalarında kullanılmıştır.

3.3.3. qPZR için Primer Dizaynı ve Verimlilik Çalışmaları

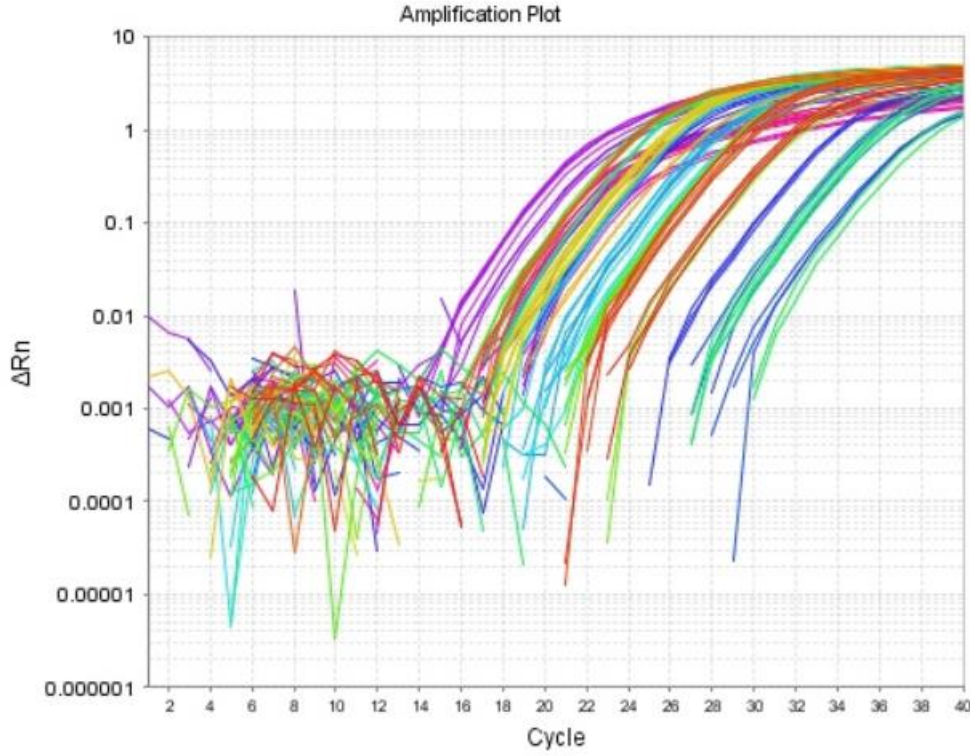
Kantitatif PZR çalışmaları için primerler, GC oranının %30-80 arasında olması, Tm değerinin 55°C’den yüksek olması, primer çiftleri arasındaki Tm farkının 2°C’den fazla olmaması, uzunluklarının 15-30 bp arasında olması, ürün boyutunun 50-150 bp arasında olması, dimer ya da sekonder yapı oluşturmayacak şekilde olması ve çoğaltılacak bölge ile tam eşleşme göstermesi gibi kriterlere göre seçilmiştir (Rodríguez ve ark., 2015; Bustin ve Huggett, 2017). qPZR çalışmaları için primerler Geneious yazılımı ile belirlenmiştir. Bunun için biyoinformatik analizler ile elde edilen zeytine özgü transkript dizileri

kullanılmıştır. qPZR çalışmalarında her bir döngünün sonunda PZR ürün miktarı 2 katına çıkar (Dorak, 2006). Bunun olabilmesi için ise qPZR primerlerinin %100 verimlilikte çalışması gerekmektedir. Bu nedenle seçilen primerlerin qPZR çalışmalarında kullanılmadan önce verimliliklerinin test edilmesi gerekir. Bunun için kök RNA'larından random primerler ile sentezlenen cDNA kalıpları ile 6 seri dilüsyon hazırlanmıştır. Her biri diğerinin 10 katı olacak şekilde 6 kez seri sulandırılan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak qPZR reaksiyonu kurulmuştur. Çalışma reaksiyonuna 5 µL SYBR Green Master Mix (Power SYBR Green PCR Master Mix, 1604522), 0.3 µL her bir primerden (toplam konsantrasyon 0.3 pmol) ve 0,4 µL su eklenmiştir. Bu çalışmalar 3 teknik tekrar ile yapılmış ve sonuçlar $\Delta\Delta C_T$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Eşik değeri döngüleri (Threshold cycle; C_T) 7500 Software V2.0.6 (Applied Biosystems, Amerika) yazılımı ile belirlenmiştir.

Sonuçlara göre her gene özgü C_T değerlerinin ortalamalarına karşı, tahmini kopya sayılarının logaritması ile standart eğriler çizilmiştir. Bu eğrinin eğimi ve korelasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır. Bu değer 1'e yakın olması gerekmektedir. Eğim değeri kullanılarak da primerlerin verimlilik yüzdeleri hesaplanmıştır. Verim için kullanılan formül $\text{Verim} = (10^{(-1/\text{eğim değeri})} - 1) \times 100$ 'dür (Dorak, 2006). Bu formüle göre verimlilik aralığı %90-110 olan ve R^2 değeri 0,98'den yüksek olan primerler bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Ayrıca, SYBR Green I metodunda ürün özgünlüğü için yapılan erime eğrisi analizinde tek bir pik görmek gereklidir. Bu durum ilgilenilen bölge dışında bir bölge çoğalmadığını göstermektedir. Bu nedenle primer seçiminde bu kriter de göz önüne alınmıştır.

3.3.4. SYBR Green Methodu ile Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Zeytin bitkisinde SL biyosentezi, algılanması ve iletiminden sorumlu olan genlerin ifadelerinin belirlenebilmesi amacı ile SYBR Green I yöntemi ile kantitatif Gerçek Zamanlı PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SYBR Green çift iplikli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. PZR ürünleri belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra, yani genel olarak 3 ila 15. döngüden sonra bu boyanın yaydığı floresan miktarı her döngüde iki katına çıkar (Dorak, 2006). Bu PZR'nun exponential fazıdır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Gerçek Zamanlı PZR için örnek bir çoğalma düzlemi

Genel olarak 30 ila 35. döngülerden sonra ise PZR plato fazına geçer. Exponential fazda Gerçek Zamanlı PZR cihazı tarafından otomatik olarak bir eşik değeri belirlenir. qPZR çalışmalarında her bir kuyucuktaki örneğin bu eşiği geçtiği döngüye “Threshold cycle (C_T)” denir. Bu C_T değerine göre sonraki analizler yapılmaktadır.

Ayvalık çeşidine ait apikal tomurcuk, lateral tomurcuk, yaprak ve kök dokularından elde edilen cDNA'lar kullanılarak kantitatif RT-PZR reaksiyonları kurulmuştur (Çizelge 3.10). qPZR çalışmaları 3 biyolojik 3 teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar için *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 4367659) kullanılmıştır.

Çizelge 3.10. qPZR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	5 µL	-
Forward primer	0,3 µL	0,15 µM
Reverse primer	0,3 µL	0,15 µM
Kalıp cDNA	1 µL	-
Nükleaz içermeyen su	3,4 µL	-
Toplam	10 µL	

Her bir tüp içerisinde son hacim 10µL olacak şekilde reaksiyonlar 96 kuyucuklu plate'ler ile kurulmuştur. Sonrasında bu plate'ler 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fischer, 4351105) cihazına yerleştirilerek Çizelge 3.11'deki PZR koşulları uygulanmıştır.

Çizelge 3.11. qPZR için kullanılan PZR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	10 dk	1
95	15 sn	
60	60 sn	40
72	60 dk	

SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanan ve bağlanma sonrası ışıma yapan floresan bir boyadır. Bu nedenler SYBR Green I istenilen PZR ürünlerinin yanı sıra, eğer var ise spesifik olmayan ürünlere veya primer dimerlerine de bağlanabilir. Bu yüzden PZR çalışmalarının sonunda, spesifik olmayan ürünlerin olup olmadığı melt curve analizi ile belirlenmiştir. Ürün özgünlüğünün kontrol edilebilmesi için erime eğrisi analizi 60-95°C arasında gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla ürünlerin çift iplikli yapıları açılmaya başlar. Böylece ürünler Tm derecelerine ulaştıkları anda, SYBR Green I boyasının salınmasına bağlı olarak, floresan miktarında ani bir düşüş meydana gelir. Erime eğrisi analizinde eğer tek bir pik var ise, bu qPZR'nun tek bir ürün oluşturduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca kontrol amaçlı revers transkriptaz enziminin bulunmadığı -RT kontrol

ve kalıp kullanılmayan negatif kontrol reaksiyonları da kurulmuştur. Normalizasyon için ise *UBC1* ve *CLATHRIN* primerleri tercih edilmiştir (Hürkan ve ark., 2018).

Gen anlatımlarının değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu (Livak ve Schmittgen, 2001) kullanılmıştır. Veriler ExpressionSuite Software.v1.1 (Thermo Fischer) ile analiz edilmiştir.

3.4. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Doku Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, zeytin eksplantlarına in vitro şartlarda bir SL analogu olan *rac-GR24* (Johnson ve ark., 1976; Johnson ve ark., 1981; Strigolab, Torino, İtalya) ve bir SL inhibitörü olan TIS108 (Ito ve ark., 2011; Strigolab, Torino, İtalya) uygulanarak etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalar için zeytin Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar 2017 yılı Ekim-Kasım aylarında Edremit Zeytincilik Üretim İstasyon Müdürlüğü'nde yetişen ağaçlardaki zeytin meyvelerinden (Edremit/Balıkesir) elde edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Edremit Zeytincilik Üretim İstasyon Müdürlüğü'nden temin edilen meyve örnekleri

Zeytin Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohum ya da embriyoların çeşitli konsantrasyonlardaki *rac-GR24* veya TIS108 varlığında (i) çimlenme oranları ve hızları, (ii) çimlenme sonrası kök boyları ve (iii) internod uzaklıkları ve (iv) yan dal sayıları

belirlenmiş, bu verilerle ilgili istatistiksel analizler yapılmış ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır.

3.4.1. Tohumların Hazırlanması

Ayvalık ve Domat meyveleri önce birkaç gün boyunca su içinde bekletilmiş ve en dış kabuk ekzokarp ve etli kısım mezokarp çekirdekten kolayca ayrılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Zeytin meyvesinin kısımları

Ekzokarp ve mezokarp uzaklaştırıldıktan sonra zeytin çekirdekleri çeşme suyu ile yıkanmış, etli kısımlarından tamamen arındırılmış ve birkaç gün süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait meyve çekirdekleri

Sonrasında, sert bir kabuk olan endokarp, tohuma zarar verilmeden kırılarak

uzaklaştırılmış ve tohumlar ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.11). Her bir çeşit için yaklaşık 1000'er adet meyve toplanmış ve her uygulama grubu ortalama 50 eksplant ile kurulmuştur.



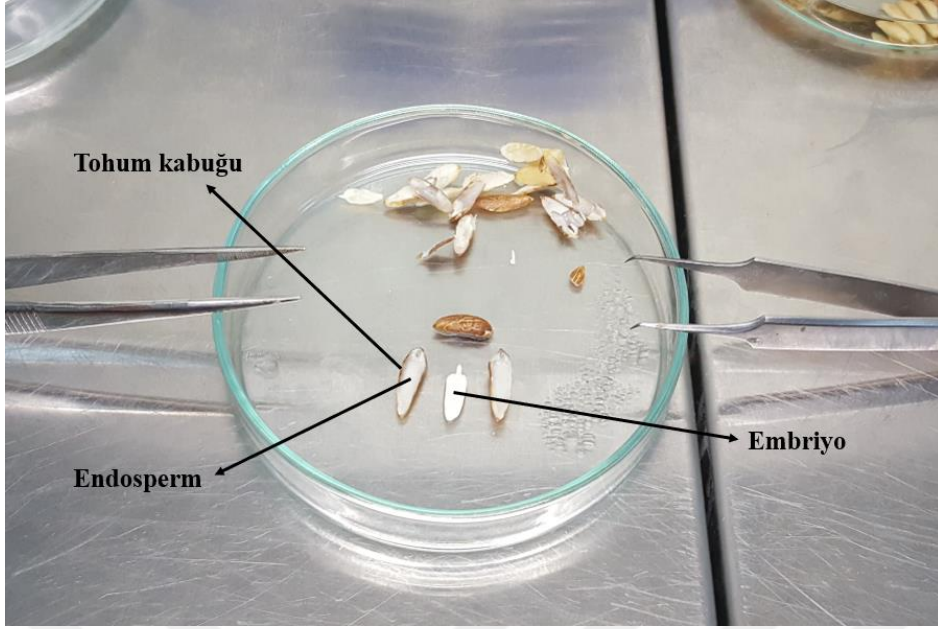
Şekil 3.11. Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohumlar

Doku kültürü çalışmaları için tohumların sterilizasyonunda aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

- Tohumlar %70'lik etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- Sonrasında %20'lik çamaşır suyunda 20 dk bekletilmiştir.
- Tohumlar steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır.
- Daha sonra steril saf su içinde 1 gece karanlıkta bekletilmiştir (Voyiatzis, 1995; Shibli ve ark., 2001; Cerezo ve ark., 2011). Böylece tohumların şişmesi ve embriyo ekstraksiyonunun kolaylaşması sağlanmıştır (Sarmiento ve ark., 1994).
- Ertesi gün tohumlar yeniden %70'lik etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- Sonrasında tekrar %20'lik çamaşır suyunda 20 dk bekletilmiştir.
- Tohumlar steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır.

Sterilizasyon laminar flow içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra tohumların bir kısmı direkt olarak besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan bu embriyoların çimlenmesinin kolaylaştırmak için tohum kabukları steril bir bistüri yardımı ile dikey bir şekilde embriyo dokusuna kadar çizilmiştir.

Geriye kalan embriyolar ise tohum kabuğu (testa) ve endosperm dokusu uzaklaştırıldıktan sonra besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Zeytin tohumlarında embriyonun tohum kabuğu ile endosperm dokusundan ayrılması

3.4.2. *rac*-GR24 ve TIS108 Uygulamaları

Doku kültürü şartlarında SL veya SL inhibitörü varlığında Ayvalık ve Domat çeşitlerinin çimlenme oranları ve hızlarının belirlenmesi, çimlenme sonrası kök boylarının ölçülmesi, nodların birbirlerine olan uzaklıklarının ve yan dal sayılarının belirlenmesi için *rac*-GR24 ve TIS108 uygulamaları yapılmıştır. Uygulamalarda, *rac*-GR24 SL analogu olarak TIS108 de SL inhibitörü olarak kullanılmıştır. *rac*-GR24 ve TIS108 Strigolab, Torino, İtalya'dan satın alınmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Uygulamalarda kullanılan *rac*-GR24 ve TIS108

Stok Hormon Çözeltilerinin Hazırlanması: *rac*-GR24 ve TIS108 uygulamaları için öncelikle hormonların stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla, her bir hormondan 20 mg tartılarak 20 mL DMSO içerisinde çözündürülmüştür. Böylece stok çözeltinin konsantrasyonu 1mg/mL olmuştur. *rac*-GR24'ün molekül ağırlığı 298,29 g olduğu için stok çözeltinin molaritesi 3352,5 μ M olmuştur. *rac*-GR24 uygulamaları için son hacimde 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M *rac*-GR24 konsantrasyonu olacak şekilde hesaplanarak besin ortamlarına eklenmiştir. Ayrıca, TIS108'in molekül ağırlığı 335,4 g olduğu için stok çözeltinin molaritesi 2981,5 μ M olmuştur. TIS108 uygulamaları için son hacimde 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M TIS108 konsantrasyonu olacak şekilde hesaplanarak besin ortamlarına eklenmiştir. Bu dozlar, diğer bitkiler ile önceden yapılan çalışmalar baz alınarak belirlenmiştir (Umehara ve ark., 2008; Mashiguchi ve ark., 2009; Ruyter-Spira ve ark., 2011; Hamiaux ve ark., 2012; Jiang ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013). Ayrıca hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grupları da kurulmuştur.

Hazırlanan bu stok çözeltiler besin ortamlarına eklenmeden önce steril kabin içerisinde, por çapı 0,20 μ m olan filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Bu stok çözeltiler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Besin Ortamı Hazırlanması: Tohum çimlenmesi deneylerinde MS besin ortamı (Murashige & Skoog medium, Duchefa, M0221) (Murashige and Skoog, 1962) kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak zeytin için literatürde önerildiği gibi mannitol (D-Mannitol, Duchefa, M0803) kullanılmıştır (Leva ve ark., 1994; Garcia ve ark., 2002). Besin ortamı hazırlanırken 1 litre ortam için 4,4 g MS tartılmıştır. Bunun üzerine 30 g/L mannitol eklenmiştir. MS ve mannitol bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra çözeltinin pH'ı, 1M NaOH ile 5,7-5,8'e ayarlanmıştır. Sonrasında 8 g/L agar (Plant agar, Duchefa, P1001) eklenmiş ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Besin ortamları 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda (Sanyo, MLS-2420U) steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında besin ortamları steril kabin (Telstar, V-100) içerisine alınarak uygun sıcaklığa kadar soğutulmuştur. Sonrasında besin ortamlarına steril *rac*-GR24 ya da TIS108 eklenmiştir. Ayrıca kontrol grupları için hiçbir bitki büyüme düzenleyicisinin eklenmediği besin ortamları hazırlanmıştır. Sonrasında besin ortamları steril petri kaplarına dökülmüş ve soğuyarak katılaşmaları beklenmiştir. Katılaştıran besin ortamları üzerine steril edilmiş tohum ya da embriyolar aktararak kültüre alınmıştır.

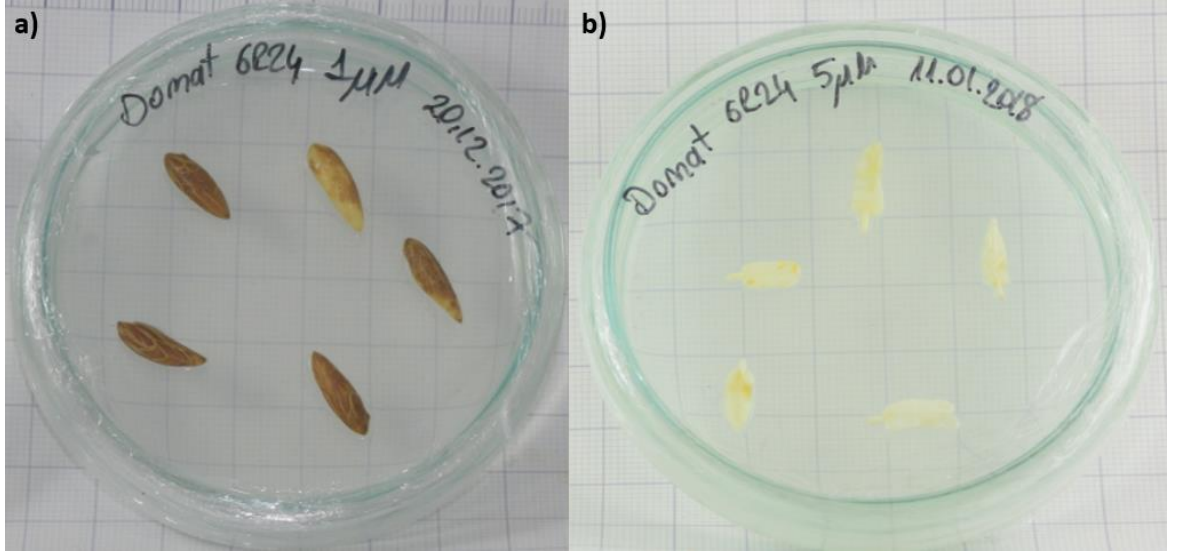
3.4.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar direkt ya da endosperm dokusu uzaklaştırıldıktan sonra, steril kabin içerisinde, farklı konsantrasyonlarda *rac*-GR24 veya TIS108 eklenmiş besin ortamlarına steril pensler yardımı ile aktararak kültüre alınmıştır. Çalışmada herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi eklenmemiş besin ortamları kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.14. Doku kültürü uygulamalarının gerçekleştirildiği steril kabin

Besin ortamlarına aktarım yapılırken, penslerin uç kısımları sıklıkla etil alkole daldırılıp steril kabin içinde yanan ispiro ocağı ateşine tutularak yüzey sterilizasyonlarının devamı sağlanmıştır (Şekil 3.14). Her bir petri içerisine 5'er adet tohum ya da embriyo konulmuştur (Şekil 3.15).



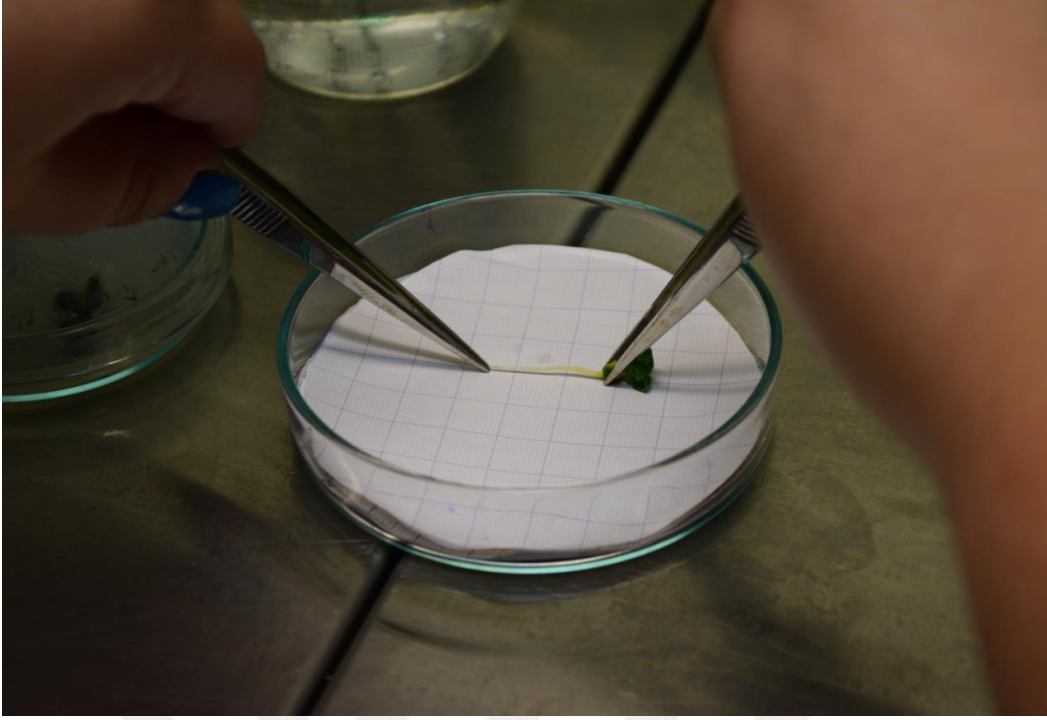
Şekil 3.15. Kültüre alınan tohum (a) ve embriyolar (b)

Sonrasında petri kaplarının kapakları kapatılarak kontaminasyonun önlenmesi amacıyla etrafları streç film ile sarılmıştır. Daha sonra bütün petriler dormansiyi kırmak amacı ile 4 hafta süre ile karanlıkta 10°C’de bekletilmiştir (Voyiatzis, 1995). Bu sürenin sonunda petriler doğrudan 20°C sıcaklıkta ve 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyodunda iklim kabininde (Panasonic, MLR-352H-PE) kültüre alınmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Bitki yetiştirme kabinine alınan petri kapları

Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohum ve embriyolar, vernalizasyon sürecinden sonra 4 hafta boyunca bitki yetiştirme kabininde çimlendirilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda çimlenmiş olan bitkiler sayılarak her bir grup için çimlenme oranı ve hızları belirlenmiştir. Bu aşamada kök oluşturan tüm bitkiler çimlenmiş olarak kabul edilmiş ve tüm bitkilerin kök uzunlukları steril kabin içerisinde steril petri kaplarında milimetrik kağıt yardımı ile ölçülmüştür (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Bitkilerin kök uzunluklarının steril kabin içerisinde ölçümü

Petri kaplarında büyüyen bitkiler daha sonra magenta kaplarında alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınmanın ardından 4 hafta daha sonra bitkiler toprağa alınarak dış ortama alıştırmıştır.

3.4.4. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon)

Doku kültürü ortamında yetiştirilen bitkiler, aşırı su kaybını önlemek amacıyla kademeli olarak dış ortama alıştırmıştır. Bu çalışmada Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohumlardan üretilen zeytin bitkileri Fabbri ve ark. (2004)'nın önerdiği yöntemine göre dış ortama alıştırmıştır. Bunun için kullanılan plastik saksı ve bitkiler carbendazim etken maddesine sahip sistemik bir fungusit olan KEMDAZIN® 50WP (0,75g/L) ile spreyleneştir. Bitkilerin dış ortama alıştırmaları şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Bitkilerin aktarılacağı viyol kapları ticari çamaşır suyu ve deterjanla iyice yıkandıktan sonra fungusit ile spreyleneştir
- Bitkilerin aktarılacağı torf:perlite (3:1) karışımı 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir
- Torf:perlite karışımı viyollere doldurulduktan sonra steril kabin içerisine alınarak sulanmıştır
- Bitkiler steril kabin içerisinde magenta kaplarından çıkarılarak, steril pensler yardımıyla

steril saf su içersine daldırılarak kökleri agardan tamamen arındırılmıştır (Böylece agarın içindeki organik maddelerden tamamen kurtularak kontaminasyonun engellenmesi amaçlanmıştır)

-Bitkilerin kökleri sonrasında fungusit solüsyonuna daldırılmış ve steril pensler yardımıyla torf:perlit karışımına aktarılmıştır (Şekil 3.18)

- Aktarılan bitkilere can suyu verildikten sonra fungusit ile spreyleneştir

- Yaklaşık %85-90 nem oranının korunması amacıyla viyollerin üzeri şeffaf poşet geçirilerek kapatılmıştır (Şekil 3.19)

- Oluşturulan bu mini seralar 20°C sıcaklıkta ve 16 saat gündüz 8 saat gece fotoperiyodunda olan iklimlendirme kabineine alınmıştır.



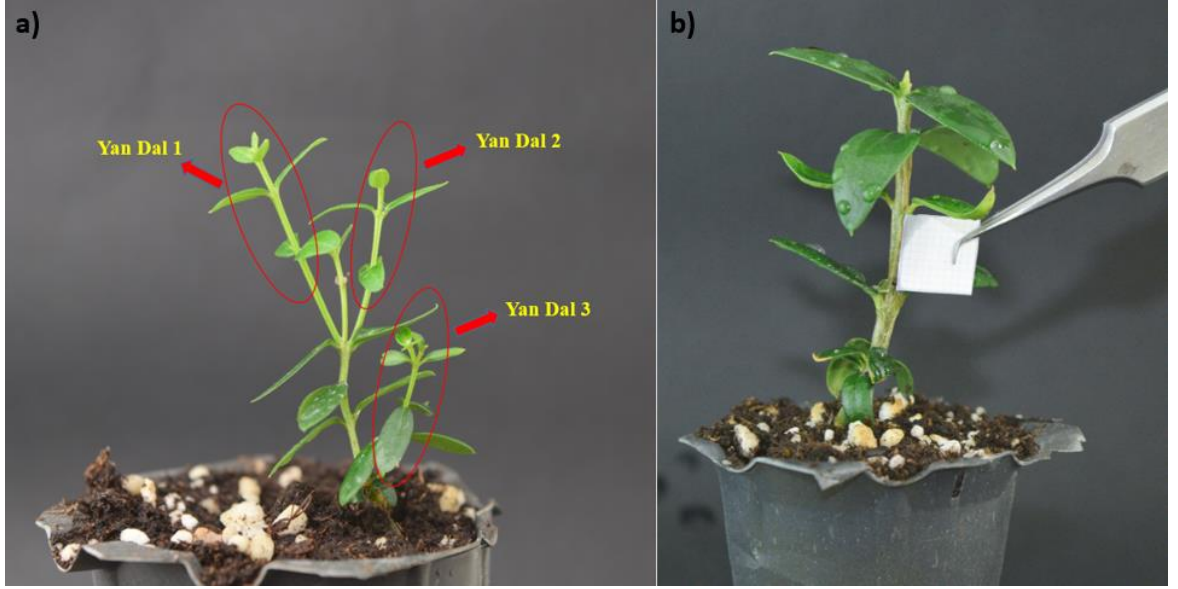
Şekil 3.18. Bitkilerin doku kültürü ortamından dış ortama aktarımı



Şekil 3.19. Dış ortama aktarılan ve nem miktarının korunması amacıyla üzeri kapatılan bitkiler

Kabine alınmasının ardından bitkiler haftada en az bir kez sulanmıştır. Bitkilerin üzerindeki poşetler iki haftada bir değiştirilmiş ve fungus kontaminasyonuna karşı fungusit ile spreyleneştir. Bitkilerin ortamındaki nem kademeli olarak azaltılmış ve dördüncü ayın içinde poşetler tamamen çıkarılarak iklimlendirme kabini içerisine direkt olarak koyularak %70 nem oranında 20°C sıcaklıkta ve 16 saat gündüz 8 saat gece fotoperiyodunda bakımlarına devam edilmiştir.

Dış ortama alınan Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait bitkilerde kültürün toplamda altıncı ayı sonunda *rac*-GR24 ve TIS108'in dallanma ve bitki boyu uzamasına etkilerinin belirlenmesi amacıyla, yan dal sayıları ve internod mesafeleri ölçülmüştür (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde doku kültüründe yetiştirilen bitkilerde a) yan dal sayımı ve b) internod uzaklıkları ölçümü

3.4.5. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Bu tez çalışmasında SL'in doku kültürü şartlarında, zeytin Ayvalık ve Domat çeşitlerinde çimlenme oranlarına, kök boylarına, yan dal sayıları ve internod mesafeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen verilerin değerlendirilmesi Excel veya SPSS (23.0) programları ile yapılmıştır.

Vernalizasyon sonrasında iklimlendirme kabinine aktarımı takiben 4. hafta sonunda her çeşit ve her uygulama grubu için çimlenme sayıları kaydedilmiştir. Sonrasında her grup için ayrı ayrı olmak üzere, çimlenen eksplant sayısı toplam eksplant sayısına bölündükten sonra 100 ile çarpılarak bir grup için çimlenme oranı yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Bu çimlenme yüzdeleri ile Excel programında grafikler çizilmiştir. Ayrıca 4. haftanın sonunda çimlenen bitkilerin kök boyları da ölçülmüş ve cm cinsinden kaydedilmiştir. Bu veri seti ilk olarak tanımlayıcı istatistik yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle kök boyu ölçümlerinin aritmetik ortalaması alınmıştır. SPSS programı ile bu verilere ait standart sapma ve standart hata değerleri belirlenmiştir. Her bir grup için hesaplanan ortalama değerler ile Excel programında grafikler çizilmiş ve standart hata değerleri kullanılarak hata çubukları bu grafiklere yerleştirilmiştir. Uygulama grupları arasında kök boyları açısından anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesi için SPSS programında ANOVA (Analysis of Variance) testi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle SPSS programı içerisindeki Levene testi ile verilerin homojen olarak dağılıp dağılmadıkları tespit edilmiştir. Eğer veriler homojen bir şekilde dağılıyorsa ($\text{Sig} > 0,05$)

ANOVA testine geçilmiştir. Verilerin homojen dağılmaması durumunda ANOVA testi uygulanamayacağı için, homojen olmayan verilerde “log, ln, sin cos” gibi algoritmalar kullanılarak veri seti transforme edilmiş ve homojen hale getirilmiştir. Sonrasında ANOVA testi ile gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arasında eğer anlamlı bir fark var ise (Sig. < 0,05) bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Sonraki aşamada Post-Hoc testi olarak Tukey testi uygulanmıştır. Tukey testi ile ANOVA analizi sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu belirlenen grupların kaç alt gruba bölündüğü belirlenmektedir. Bu alt gruplara göre, hangi uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir.

Vernalizasyon sonrasında iklimlendirme kabinine aktarımı takiben toplamda 6. ayın sonunda ise bitkilerin yan dal sayıları her çeşit ve her uygulama grubu için kaydedilmiştir. Sonrasında her grupta sayılan yan dal sayısı, grupta bulunan bitki sayısına bölünerek, bitki başına düşen yan dal sayısı belirlenmiştir. Bu sayılar kullanılarak Excel programında grafikler çizilmiştir. Ayrıca 6. ayın sonunda bitkilerin nodları arasındaki mesafeler de cm cinsinden ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Bu veri seti yukarıda anlatılan istatistiksel yöntem izlenerek değerlendirilmiştir ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olup olmadığı belirlenmiştir.

3.5. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Çelik Köklendirme Çalışmaları

Çelikle çoğaltma, ana bitkinin belirli bir bölgesinden kesilen bir parçanın köklendirilmesi ve böylece ana bitki ile aynı özelliklere sahip yeni bitkilerin üretilmesidir. Zeytin genellikle çelikle üretim yolu ile çoğaltılan bir bitkidir (Fabbri ve ark., 2004). Bu nedenle *rac*-GR24 ve TIS108’in kolay köklenen Ayvalık çeşidi ve zor köklenen Domat çeşitlerinde (Özkaya ve Çelik, 1994; Çetintaş Gerakkakis ve Özkaya, 2005) çelik köklenmesi açısından etkilerinin belirlenebilmesi amaçlanmıştır. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde çelik köklendirmesi çalışmaları Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü’nde gerçekleştirilmiştir. Müdürlüğün Gömeç’teki zeytinliklerinden temin edilen Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait ağaç dallarından yaklaşık 20-25’er cm uzunluğunda çelikler hazırlanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Köklendirme denemelerinde kullanılan zeytin çelikleri

Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü'nde standart çelikle üretimde çeliklerin kesik yüzeyleri 5 sn süre ile IBA (indol bütirik asit) hormonu içeren solüsyona daldırılmaktadır. Çalışmada, Ayvalık çeşidi için 700 adet çelik 7 gruba bölünerek; Kontrol, 1, 5 ve 10 μM *rac*-GR24 ve TIS108 olmak üzere uygulama ve kontrol grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar için doku kültürü çalışmasında hazırlanan hormon stokları kullanılmış olup, çeşitli dozdaki hormonlar beher kaplarına alınmıştır. Hazırlanan çeliklerin kesik taraflarının yaklaşık 2 cm'lik kısımları, hormon içerisine batırılarak 5 sn kadar beklenmiştir. Daha sonra bu çeliklerin her biri ayrı ayrı Kokos içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 3.22). Kokos (Jiffy Grow Blocks), hindistan cevizi kabuğu liflerinden imal edilen, yüksek su tutma kapasitesine sahip, çeliklerin köklenmesi için uygun bir ortamdır. Aynı işlemler 700 adet çelik ile Domat çeşidi için de tekrar edilmiştir.



Şekil 3.22. Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü'nde Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait çeliklere hormon uygulaması (1. gün)

Uygulamalar, Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü'nde sera koşullarında yüksek nemli ortamda yapılmıştır. Çelikler düzenli olarak sulanarak 10 hafta boyunca (Nisan-Haziran aylarında) köklenmeleri için beklenmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü'nde Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait çeliklere hormon uygulaması (10. hafta)

10 hafta sonrasında çalışma sonlandırılmış, her bir uygulamaya ait çelikler hem kallus oluşturma hem de kök oluşturma kapasiteleri açısından değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

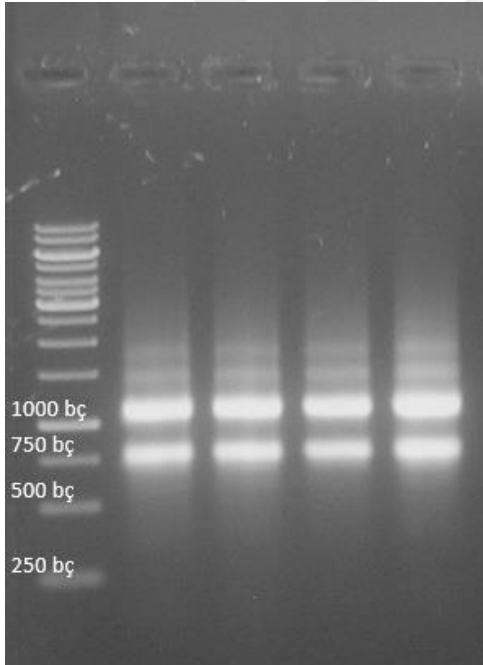
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. RACE Çalışmaları

RACE yöntemi ile kısmi dizisi bilinen bir transkriptin, 3' ve 5' uçları ayrı ayrı çoğaltılarak, ilgili genin tam uzunluktaki mRNA dizisi elde edilir.

4.1.1. Bitki Materyali ve RNA İzolasyonu

Bu çalışmada zeytin Ayvalık çeşidine ait SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin transkript dizileri ilk kez RACE yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Bu amaçla SL'in esas olarak biyosentezinin gerçekleştiği kök dokularından total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında köklerden elde edilen total RNA miktarlarının 423 ve 1078 ng/μL arasında (en düşük ve en yüksek) değiştiği bulunmuştur. Ayrıca %1'lik agaroz jel elektroforezinde izole edilen RNA'ların sağlam olduğu rRNA bantlarının varlığından anlaşılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. RACE çalışmalarında kullanılan total kök RNA'ları

4.1.2. RACE Çalışmaları İçin Seçilen Primerler

Bu tez çalışması başladığında henüz zeytin genomu gen bankasında yer almadığı için, RACE çalışmaları için primer seçiminde 3 farklı zeytin çeşidine ait mevcut

transkriptom okumaları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Picual, Farga ve Sylvestris çeşitlerine ait okumalardan faydalanılmıştır. Bu okumalar filtrelendikten sonra *S. lycopersicum* bitkisine ait SL gen dizileri referans olarak kullanılarak her gene ait kısmi transkriptler elde edilmiştir. Bunlar D27 için 896 bç, MAX3 için 1773 bç, MAX4 için 1995 bç, MAX1 için 1583 bç, D14 için 1228 bç, MAX2 için 1681 bç uzunluğundaki mRNA dizileridir. Bu 3 çeşide ait diziler, RACE çalışmalarında kullanılacak zeytin bitkisine özgü primerlerin dizaynı için kullanılmıştır (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve 4.1)

Çizelge 4.2. 3' RACE çalışmalarında kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Ürün Boyutu
D27	D27_GSP1	5' CGATGCTTGTTCCAGTGC 3'	881 bç
	D27_GSP2	5' CGTGGAAGCTGCAACAATGG 3'	631 bç
	D27_GSP3	5' TTGTTGGTCCCTGTGAGGTG 3'	449 bç
	D27_GSP4	5' AAAAACTCGAGCAAGAGTCCCTGGGTATGCC 3'	300 bç
MAX3	M3_GSP1	5' GGAGCGGAAAGTTAGATCCT 3'	1052 bç
	M3_GSP2	5' ATGCAGCAACTACTTCTGGT 3'	847 bç
	M3_GSP3	5' TGTTGCAAGATTTGAAGTTCCA 3'	588 bç
	M3_GSP4	5' AGTGATCACAACCACCAACT 3'	484 bç
MAX4	M4_GSP1	5' GCAAGATTGTGGCAAGTGTA 3'	1006 bç
	M4_GSP2	5' GGGTCTCCATATGGAACGTT 3'	776 bç
	M4_GSP3	5' GAGGGCTCTATACCCTCAGA 3'	575 bç
	M4_GSP4	5' ATGGACTCCATGGATGTTGG 3'	400 bç
MAX1	M1_GSP1	5' AGGTCATTGCCCTTGCTTG 3'	1513 bç
	M1_GSP2	5' GCCGGCTAGATGGGATAGTG 3'	1034 bç
	M1_GSP3	5' TGAGCATCTGTTAGCTGGATCAG 3'	743 bç
	M1_GSP4	5' AAAAACTCGAGATCTCCCAAAGGGCACATGG 3'	271 bç
D14	D14_GSP1	5' GTGAAGTCACAACAGCCACTC 3'	1154 bç
	D14_GSP2	5' CTATGACCTCGTCTGTGCCG 3'	951 bç
	D14_GSP3	5' AAGACTACCACGGCGGATTC 3'	712 bç
	D14_GSP4	5' AAAAACTCGAGGCATTTGCCACACCTGAGTG 3'	363 bç
MAX2	M2_GSP1	5' CGAACCCATTAGTTTCGTCG 3'	1667 bç
	M2_GSP2	5' GGTGTTGTAGATTGGCCAAG 3'	1085 bç
	M2_GSP3	5' AGCATTGGAGCCAATACAGA 3'	937 bç
	M2_GSP4	5' CATTTGGATTGCGGGGAAAT 3'	399 bç

Çizelge 4.3. 5' RACE çalışmalarında kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Ürün Boyutu
D27	D27_GSP1	5' TGCTGACCAAATATCATCTCAC 3'	845 bç
	D27_GSP2	5' TCTCCTCCAAAAACCTGCAT 3'	712 bç
	D27_GSP3	5' TTGCTGCTCCTAAATCCTGT 3'	419 bç
	D27_GSP4	5' TGGCAAGAAGATCAAACCAG 3'	367 bç
MAX3	M3_GSP1	5' TAACCTACCACCCACCTTA 3'	1262 bç
	M3_GSP2	5' GTACCTAGCCGTGAACTTGA 3'	1097 bç
	M3_GSP3	5' CTTCTGCACGTTGTGAAACA 3'	900 bç
	M3_GSP4	5' GTACCTAGCCGTGAACTTGA 3'	423 bç
MAX4	M4_GSP1	5' GCCACCTAATGAGTCACTGT 3'	800 bç
	M4_GSP2	5' CGAGTTTAACGACTCCGGTA 3'	690 bç
	M4_GSP3	5' TTCTTCTTGGCTGCCTTGTA 3'	556 bç
	M4_GSP4	5' ACAATAAGCTCTCCTTGCCA 3'	361 bç
MAX1	M1_GSP1	5' TGAGGCTGTAGGCATTTGAT 3'	1156 bç
	M1_GSP2	5' ATGATTGAAATGGAGCCCGA 3'	758 bç
	M1_GSP3	5' AGCCTGAAATCCACTCCAAA 3'	617 bç
	M1_GSP4	5' CCCTTTTGATGAAGAGGGGA 3'	395 bç
D14	D14_GSP1	5' CAACAAAGTTGGTGCCTCA 3'	812 bç
	D14_GSP2	5' TATTGAACAAAGTGCGGCTG 3'	585 bç
	D14_GSP3	5' TTTAATGGCGGCAAGAATCC 3'	368 bç
	D14_GSP4	5' ATGTTGAGGAGGTCATCGAC 3'	286 bç
MAX2	M2_GSP1	5' TCTGTATTGGCTCCAATGCT 3'	1304 bç
	M2_GSP2	5' TTGAAGCAGATGCACGAAAG 3'	1222 bç
	M2_GSP3	5' CCAACTCAATGTACCTCGGA 3'	716 bç
	M2_GSP4	5' CAAGTGAGGTTTCGACGAAAC 3'	585 bç

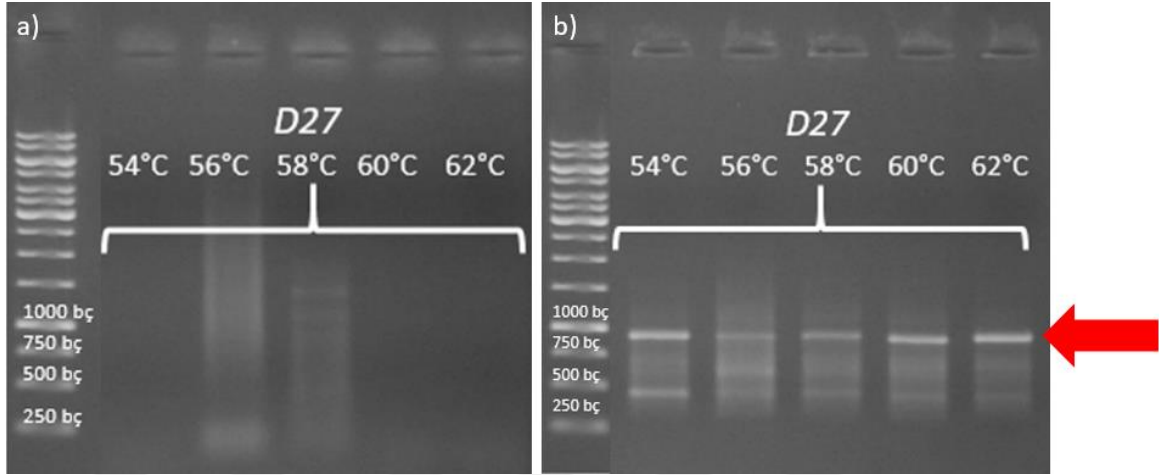
Çizelge 4.4. Orta bölgelerin çoğaltımı çalışmalarında kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Ürün Boyutu
D27	D27_F	5' AGGCCTATACTTAACATGATTAGGACC 3'	515 bç
	D27_R	5' AATTGCCTTCCTCTTATACTCTCTGAG 3'	
MAX3	M3_F	5' GGTTGGGTGCATTCTTTCCC 3'	860 bç
	M3_R	5' TCCATGAAAGCCAAGAGGAA 3'	
MAX4	M4_F	5' CGCGGCATGGAGTAGTATAA 3'	1450 bç
	M4_R	5' AGCTTTTGGAACCCAACATC 3'	
MAX1	M1_F	5' CCTTGCCTTCAAGTTGGTGG 3'	1571 bç
	M1_R	5' TGCTAAGTAACTTTCAAGCTTTGCC 3'	
D14	D14_F	5' CCCGCAAACATTATTTAGTGCAAAC 3'	997 bç
	D14_R	5' CCCAAACGCTAGATATGATTCATGTC 3'	
MAX2	M2_F	5' CATCCTCTCCAACATAATCGCCTCC 3'	2179 bç
	M2_R	5' TCAATCAGGAAGTTGGCGCCTATTC 3'	

4.1.3. 3'RACE Çalışmaları

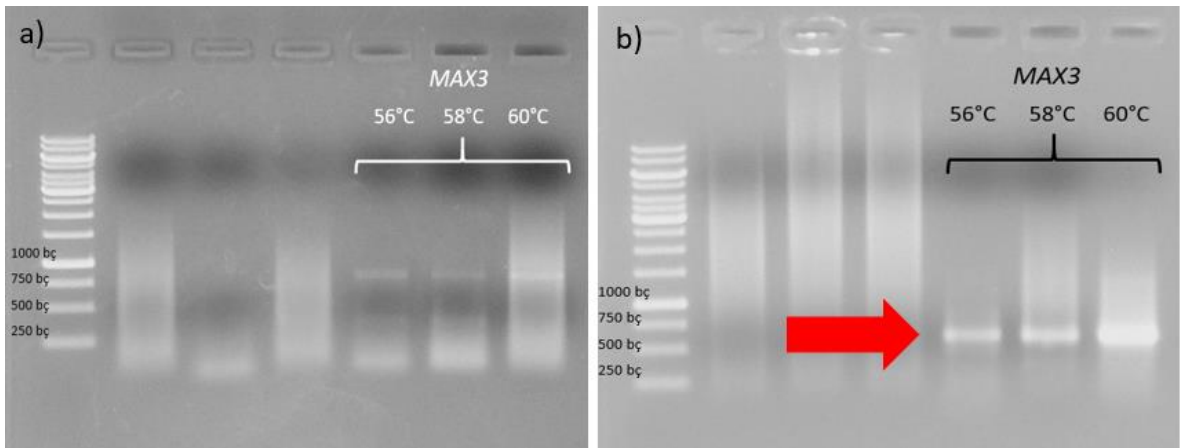
Zeytin Ayvalık çeşidinde SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu gen transkriptlerinin 3' uçlarının belirlenebilmesi için seçilen primerler ile arka arkaya bir seri PZR gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda kalıp olarak OligodT primerleri ile sentezlenen cDNA kullanılmıştır. İlk PZR OligodT primerine bağlanan adaptör bir primer ve gen spesifik primerler (GSP1) ile kurulmuştur. RACE çalışmalarında gen spesifik primerler ile birlikte universal primerler kullanıldığı için, ilk PZR sonunda spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasına sebebiyet verebilir, bu nedenle GSP2 ile ikinci bir çoğaltma adımı uygulanır (Scotto-Lavino ve ark., 2006a). Bu ikinci PZR birçok spesifik olmayan ürünün elimine olmasını sağlar. Bunun için, daha sonra ilk PZR ürünü kalıp olarak kullanılmış ve OligodT primerine bağlanan adaptör primer ve daha iç kısma bağlanan GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Gerekli durumlarda aynı işlem GSP3 veya GSP4 ile de yapılmıştır. Bu çalışmalarda, seçilen primerlerin kalıba bağlanma sıcaklıkları, 54-62 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda gradient PZR ile test edilmiştir. Böylece SL genlerine ait transkriptlerin 3' uçları birçok adımda çoğaltılmıştır. Bu ürünler etidyum bromür ile UV ışık altında elektroforez ile analiz edilmiştir. Şekil üzerinde

beklenen boyuta yakın olarak elde edilen ürünler kırmızı renkli oklar ile gösterilmiştir. Jelden kazanılan PZR ürünleri hizmet alımı yolu ile GSP2, GSP3 ve GSP4 primerleri ile dizilenmiştir.



Şekil 4.2. D27 geni için 3'RACE sonuçları

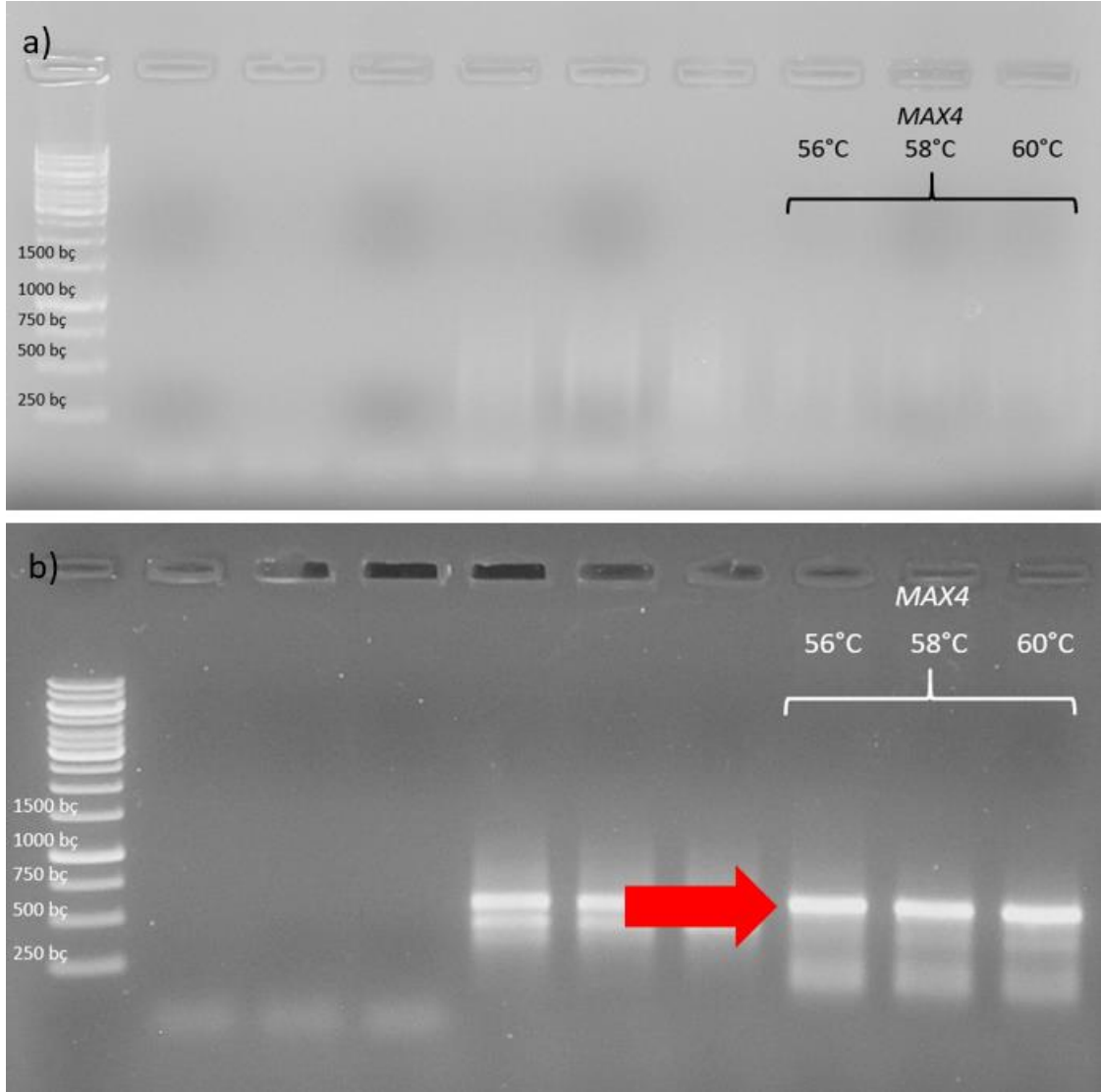
D27 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 881 bç uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.2a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen boyuta yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.2b), bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Jelden kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



Şekil 4.3. MAX3 geni için 3'RACE sonuçları

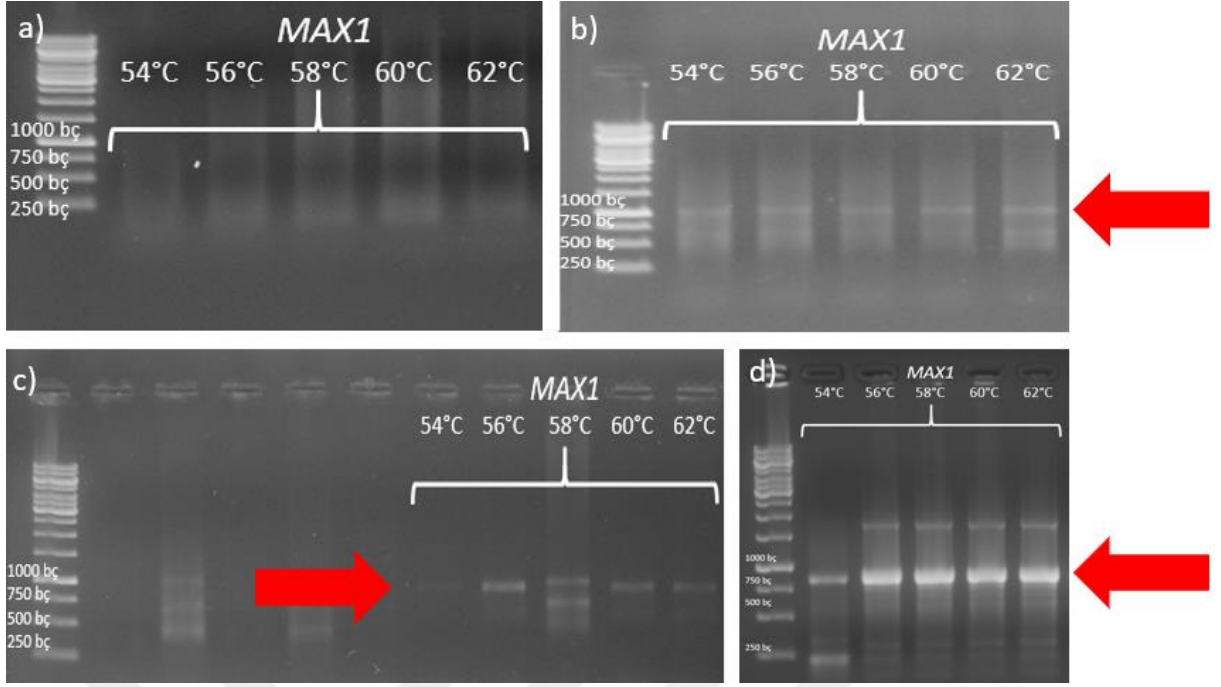
MAX3 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1052 bç

uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.3a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen boyuta yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.3b), bu ürünler jelden geri kazanılmış ve dizilenmiştir.



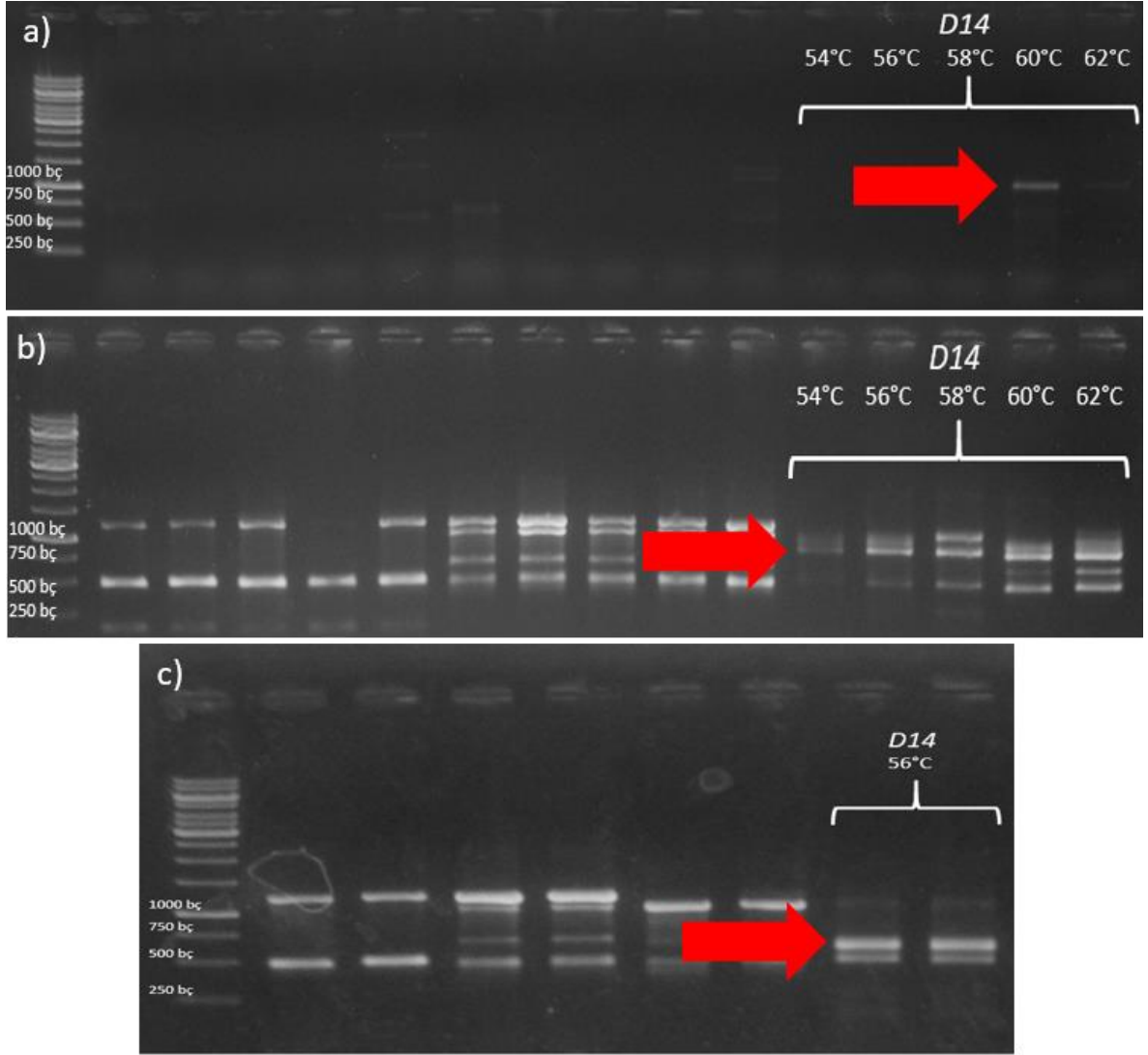
Şekil 4.4. *MAX4* geni için 3'RACE sonuçları

MAX4 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1006 bp uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.4a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen boyuta yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.4b), bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Jelden kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



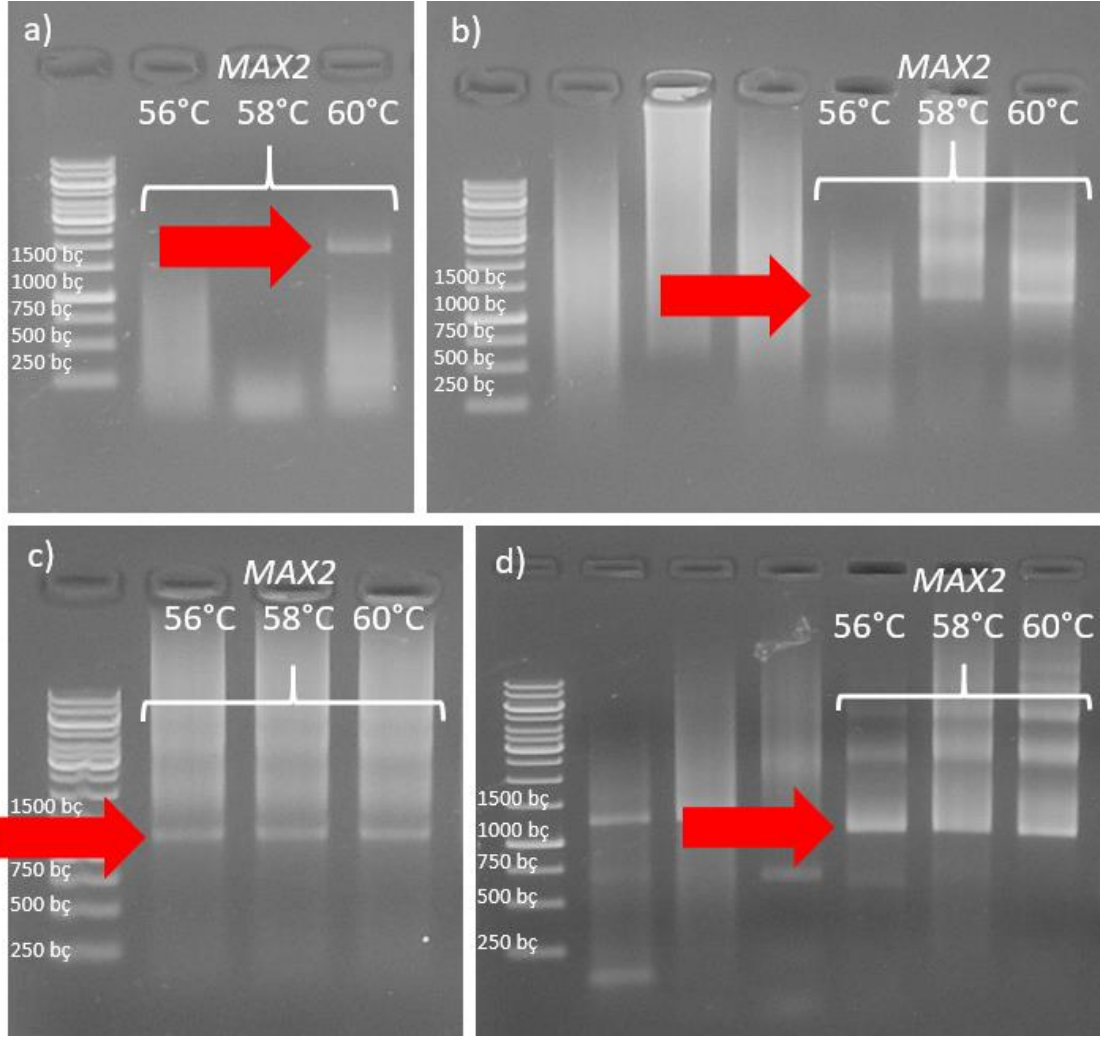
Şekil 4.5. *MAX1* geni için 3'RACE sonuçları

MAX1 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1513 bp uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.5a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.5b) bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Ancak bu ürünlerin miktarının dizileme için yeterli olamayacağı göz önünde bulundurulmuş ve ürün miktarının artırılması amacı ile yeniden PZR yapılmıştır. Jelden kazanılan bu ürünler kalıp olarak kullanılarak bu kez GSP3 ile PZR kurulmuştur. Bu PZR sonucunda ise yine beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5c). Bu ürünlerin miktarının da artırılması amacı ile bu ürünler kalıp olarak kullanılarak yeniden GSP3 ile PZR yapılmıştır. Bu PZR sonucunda beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünler jelden geri kazanılmıştır (Şekil 4.5d). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



Şekil 4.6. *D14* geni için 3'RACE sonuçları

D14 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1154 bç uzunluğunda yalnızca bir tane bant elde edilebilmiştir (Şekil 4.6a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.6b) bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Bu ürünlerin miktarının artırılması amacı ile yeniden PZR yapılmıştır. Jelden kazanılan bu ürünler kalıp olarak kullanılarak bu kez GSP3 ile PZR kurulmuştur. Bu PZR iki tekrarlı olarak kurulmuştur ve primer bağlanma sıcaklığı 56°C olarak seçilmiştir. Bu PZR sonucunda ise yine beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6c). Jelden kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.

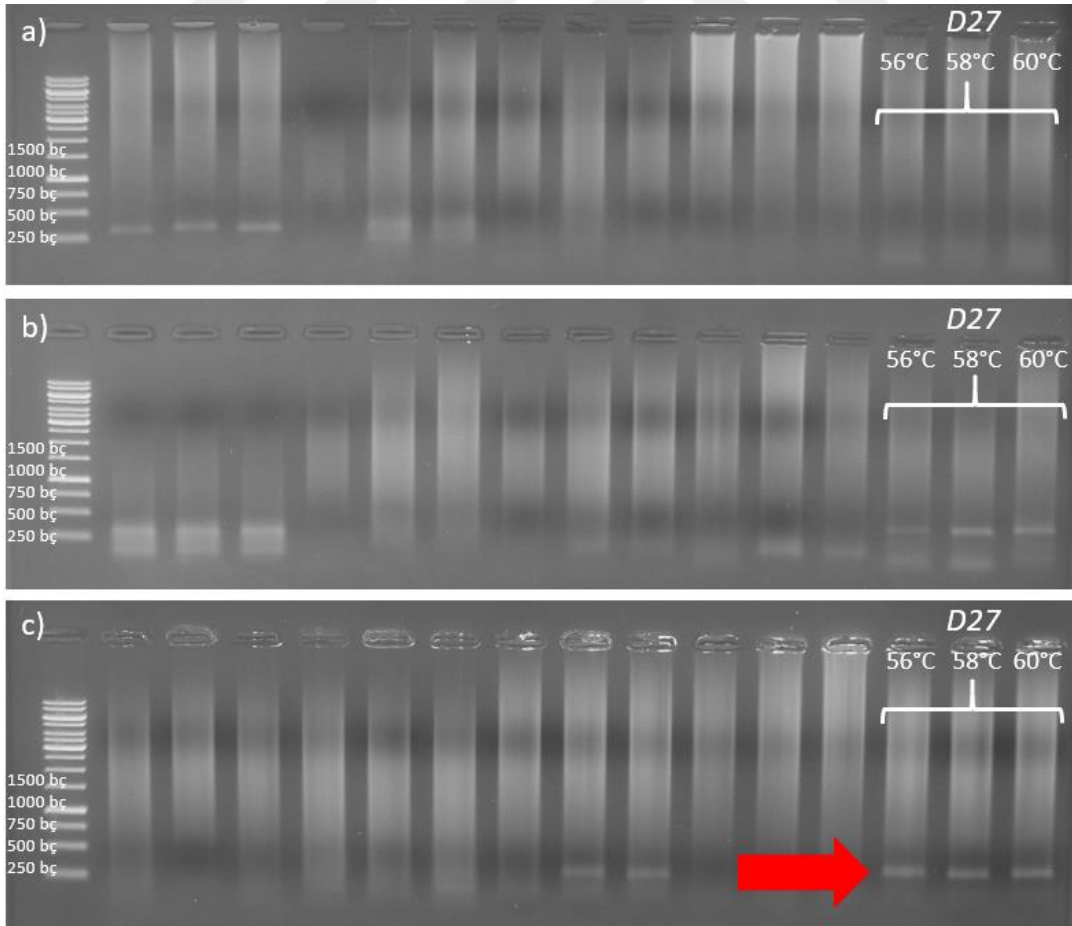


Şekil 4.7. MAX2 geni için 3'RACE sonuçları

MAX2 geni için seçilmiş GSP1 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1667 bp uzunluğunda yalnızca bir tane bant elde edilebilmiştir (Şekil 4.7a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP2 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.7b) bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Ancak bu ürünlerin miktarının dizileme için yeterli olamayacağı göz önünde bulundurulmuş ve ürün miktarının artırılması amacı ile yeniden PZR yapılmıştır. İkinci PZR ürünleri jelden izole edilmeden kalıp olarak kullanılarak bu kez GSP3 ile PZR kurulmuştur. Bu PZR sonucunda ise yine beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7c). Bu ürünlerin miktarının da artırılması amacı ile bu ürünler kalıp olarak kullanılarak yeniden GSP3 ile PZR yapılmıştır. Bu PZR sonucunda beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünler jelden geri kazanılmıştır (Şekil d). Jelden kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.

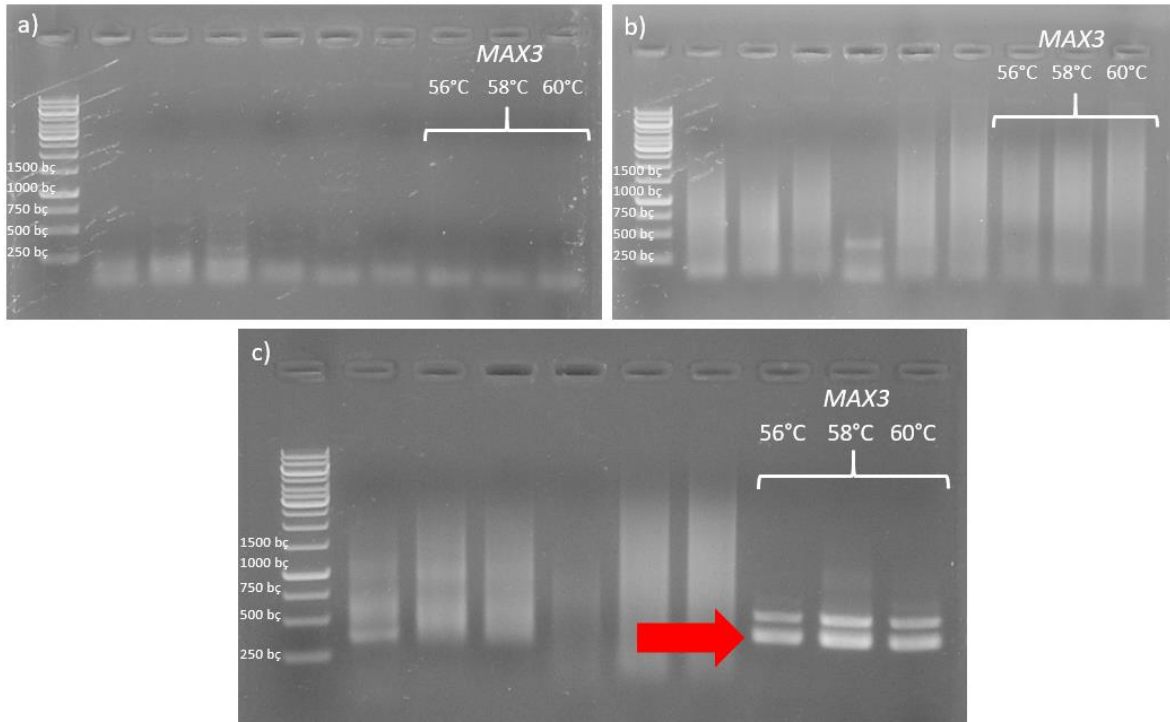
4.1.4. 5'RACE Çalışmaları

Zeytin Ayvalık çeşidinde SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu gen transkriptlerinin 5' uçlarının belirlenebilmesi için seçilen primerler ile bir seri PZR gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda kalıp olarak her gene özgü GSP1 ile sentezlenen cDNA'lar kullanılmıştır. Bu cDNA'ların uçlarına terminal transferaz enzimi ile poliA kuyruğu takılmıştır. Sonrasında bu poliA kuyruğuna bağlanacak olan OligodT adaptör primeri ve gen spesifik primerler (GSP2) ile birinci PZR kurulmuştur. Daha sonra buradan elde edilen PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak yine adaptör primer ve daha iç kısma bağlanan GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Gerekli durumlarda aynı işlem GSP4 ile de yapılmıştır. Bu çalışmalarda, seçilen primerlerin kalıba bağlanma sıcaklıkları, 54-62 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda gradiyent PZR ile test edilmiştir. Böylece SL genlerine ait transkriptlerin 5' uçları birçok adımda çoğaltılmıştır. Bu ürünler etidyum bromür ile UV ışık altında elektroforez ile analiz edilmiştir. Şekil üzerinde beklenen boyuta yakın olarak elde edilen ürünler kırmızı renkli oklar ile gösterilmiştir. Jelden kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



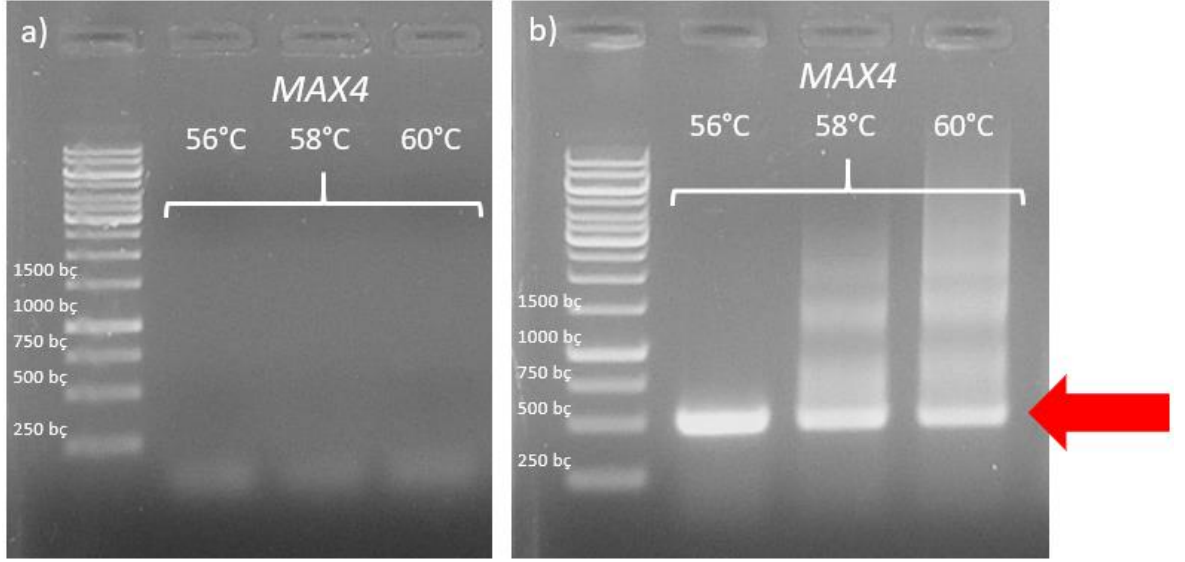
Şekil 4.8. D27 geni için 5'RACE sonuçları

D27 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 712 bç uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.8a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.8b), bu ürünlerin miktarının artırılması amacı ile GSP4 kullanılarak yeniden PZR yapılmıştır. Bu PZR sonucunda ise yine beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8c). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



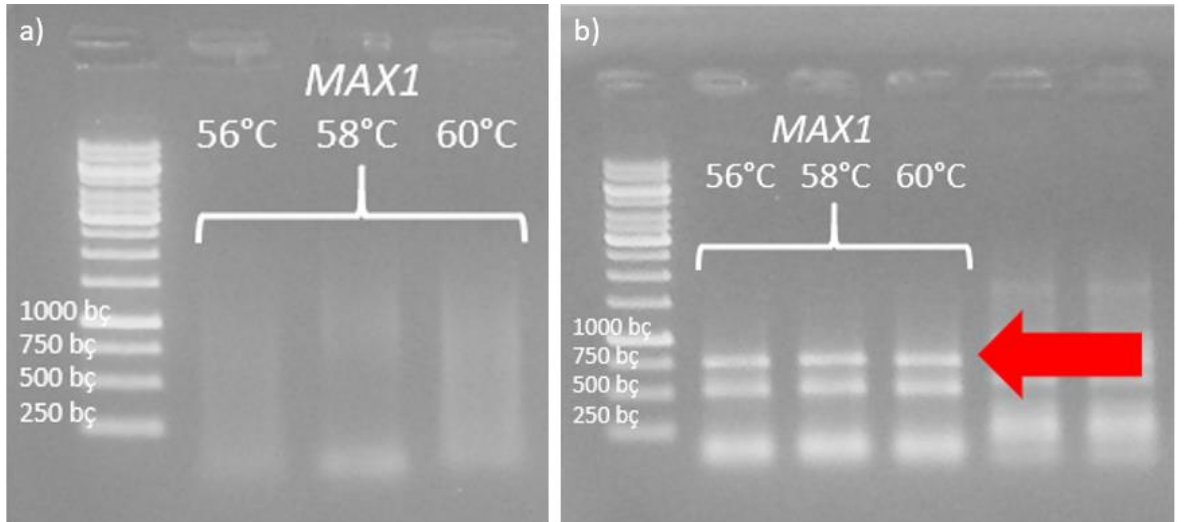
Şekil 4.9. MAX3 geni için 5'RACE sonuçları

MAX3 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1097 bç uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.9a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda da beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.9b). Bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, bu kez GSP4 ile yeniden PZR yapılmıştır. Bu PZR sonucunda ise beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9c). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



Şekil 4.10. *MAX4* geni için 5'RACE sonuçları

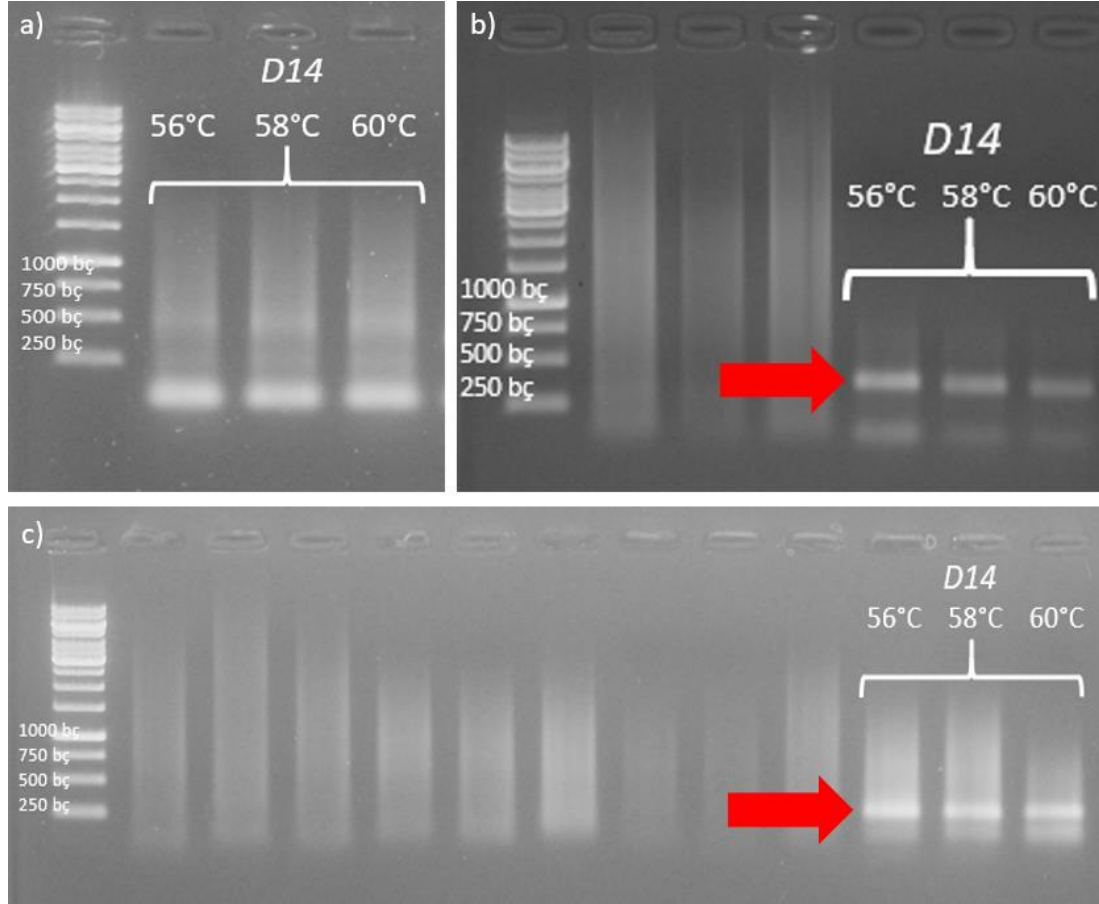
MAX4 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 690 bç uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.10a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10b). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



Şekil 4.11. *MAX1* geni için 5'RACE sonuçları

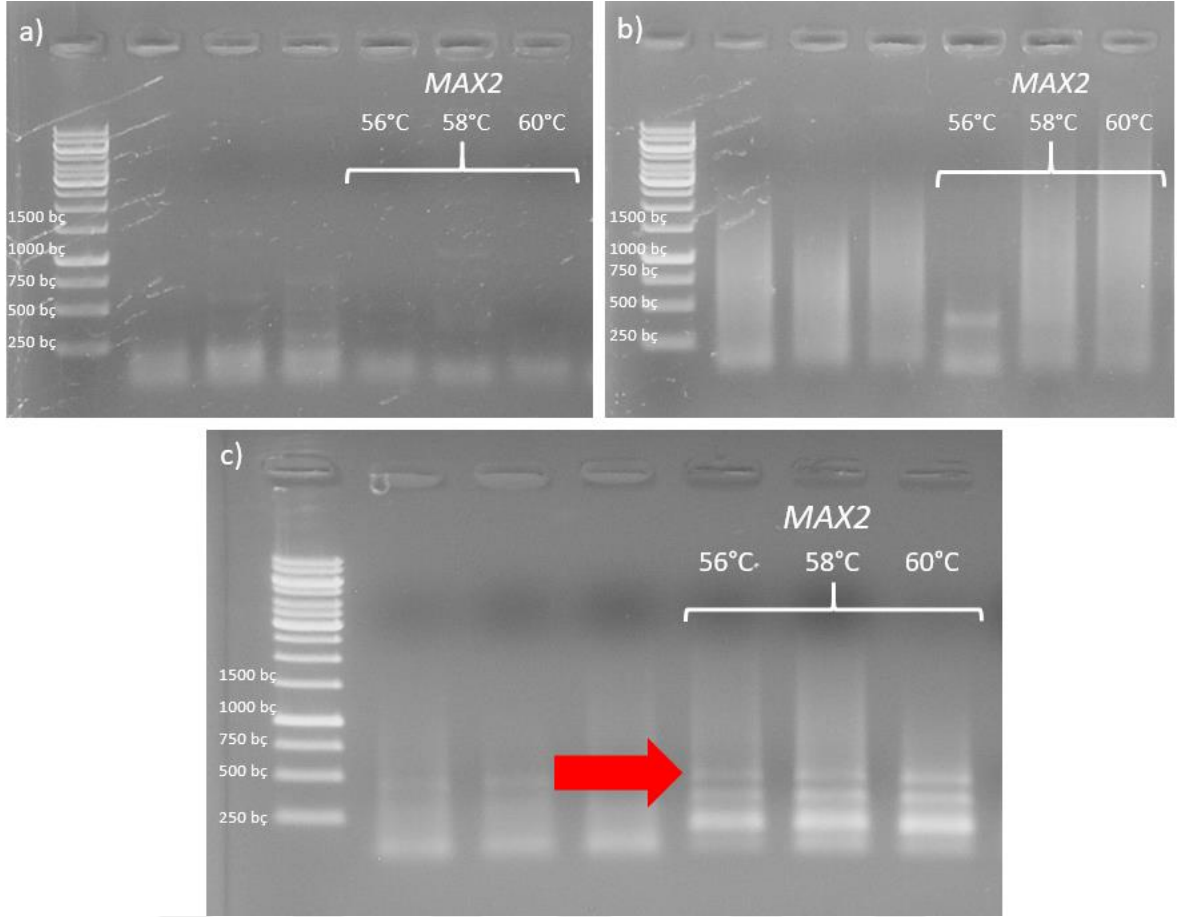
MAX1 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 758 bç uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir

(Şekil 4.11a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11b). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



Şekil 4.12. *D14* geni için 5'RACE sonuçları

D14 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 585 bp uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.12a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda beklenen bant boyutuna yakın PZR ürünleri elde edilmiş olup (Şekil 4.12b) bu ürünler jelden geri kazanılmıştır. Bu ürünlerin miktarının artırılması amacı ile yeniden PZR yapılmıştır. Jelden kazanılan bu ürünler kalıp olarak kullanılarak bu kez GSP4 ile PZR kurulmuştur. Bu PZR sonucunda ise yine beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12c). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.



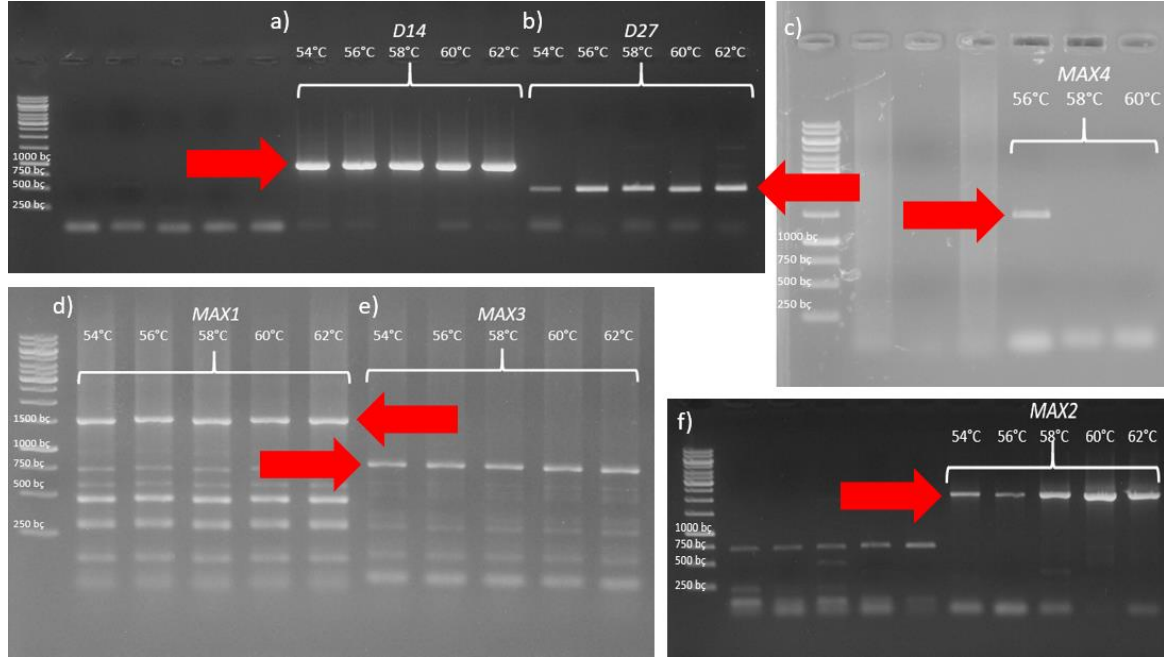
Şekil 4.13. MAX2 geni için 5'RACE sonuçları

MAX2 geni için seçilmiş GSP2 ile kurulan 1. PZR'nda yaklaşık 1222 bp uzunluğunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın, jelde beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.13a). Bu nedenle bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSP3 ile ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda da beklenen boyutta bir PZR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.13b). Bu PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, bu kez GSP4 ile yeniden PZR yapılmıştır. Bu PZR sonucunda ise beklenen bant boyutuna yakın ürünler elde edilmiş ve bu ürünlerin jelden izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13c). Jelden geri kazanılan ürünler hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.

4.1.5. Transkriptlerin Orta Bölgelerinin Çoğaltımı

Zeytinde SL biyosentez, algılanma ve sinyal iletiminde görevli genlere ait transkriptlerin 3' ve 5' uç kısımlarının belirlendikten sonra, uçlar arasında kalan bölge de çoğaltılmış ve dizi analizi yapılarak transkriptlerin tamamı elde edilmiştir. Uçlar arasında kalan bölge seçilen primerler ile farklı sıcaklıklarda gradiyent PZR aracılığı ile çoğaltılmıştır. Bu reaksiyonlarda kalıp olarak random primerler ile köklerden izole edilen

RNA’lardan sentezlenen cDNA kullanılmıştır. Bu PCR reaksiyonlarında *D27* geni için kullanılan primerlerden yaklaşık 515 bç uzunluğunda (Şekil 4.14b), *MAX3* geni için yaklaşık 860 bç uzunluğunda (Şekil 4.14e), *MAX4* geni için yaklaşık 1450 bç uzunluğunda (Şekil 4.14c), *MAX1* geni için yaklaşık 1571 bç uzunluğunda (Şekil 4.14d), *D14* geni için yaklaşık 997 bç uzunluğunda (Şekil 4.14a), *MAX2* geni için yaklaşık 2179 bç uzunluğunda (Şekil 4.14f) beklenen boyutlarda PCR ürünleri elde edilmiştir.



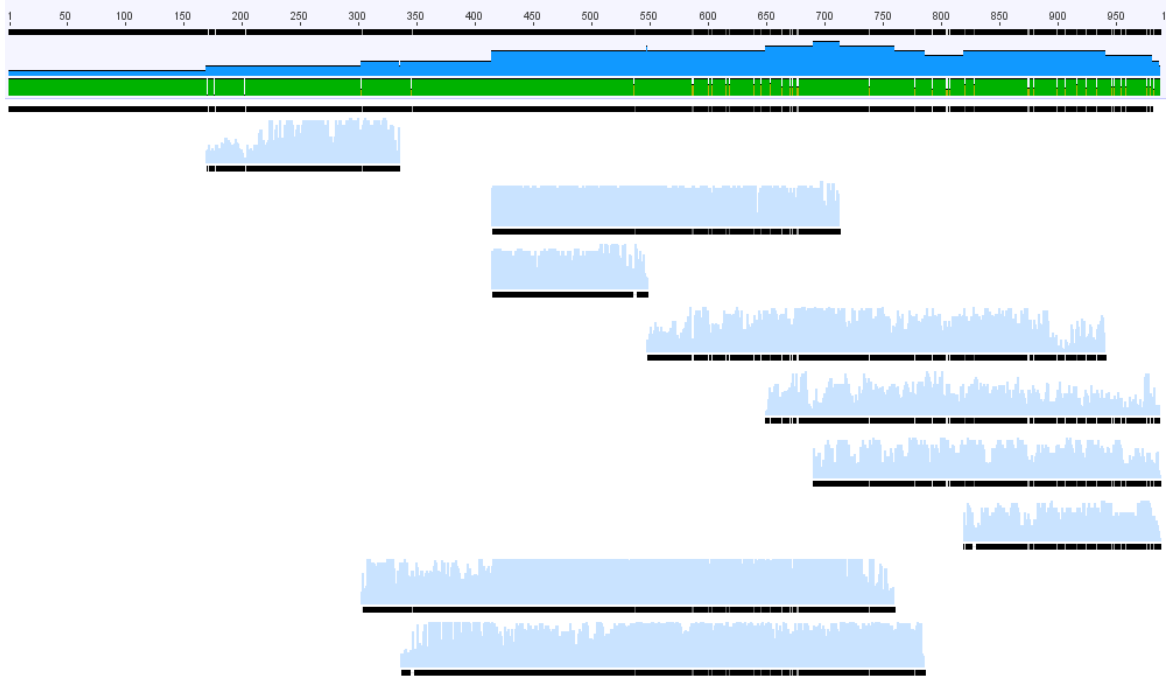
Şekil 4.14. *MAX2*, *D14* ve *D27* genleri için orta bölgelerin çoğaltımı PZR sonuçları

Bu PZR ürünlerin jelden izole edilmiş ve nükleotid dizilişleri hizmet alımı yolu ile belirlenmiştir.

4.1.6. RACE Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Zeytin Ayvalık çeşidinde SL biyosentez, algılanma ve sinyal iletiminden sorumlu genlere ait transkriptlerin belirlenmesi amacı ile RACE yapılmıştır. Bu çalışmalar ile ilgili transkriptlerin 3’ ve 5’ uçlarının dizi bilgileri elde edilmiş ve orta bölgeleri de dizilenmiştir. Nükleotid okumaları Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile değerlendirilmiş olup bu ham okumalar kırpma ve filtreleme işlemlerinden geçirildikten sonra birleştirilmiştir. Birleştirme işleminde referans dizi olarak *Sylvestris* çeşidine ait transkriptom okumaları kullanılmıştır. Elde edilen Ayvalık çeşidine özgü konsensüs transkript dizisi NCBI veri tabanında diğer bitki türlerine karşı BLASTn ile araştırılmıştır.

D27: Çalışmada, *D27* geni için toplamda 9 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 801 bç uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *D27* genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında BLASTn algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden *D27* olarak belirlenmiş 52 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.16). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_022998964.1) ile %99, *Sesamum indicum* bitkisine ait bir mRNA (XM_011081629.2) ile %77 ve *Erythranthe guttatus* bitkisine ait bir mRNA (XM_012981705.1) ile ise %75 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC111376038), transcript variant X2, mRNA	1426	1426	100%	0.0	99.13%	XM_022998964.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC111376038), transcript variant X1, mRNA	1326	1430	100%	0.0	98.93%	XM_022998963.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC111411827), transcript variant X1, mRNA	1097	1097	97%	0.0	90.80%	XM_023042453.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC111411827), transcript variant X2, mRNA	876	953	86%	0.0	90.36%	XM_023042454.1
☐	PREDICTED: Sesamum indicum beta-carotene isomerase D27, chloroplast (LOC105163321), mRNA	469	469	73%	2e-127	77.53%	XM_011081629.2
☐	PREDICTED: Erythraea guttatus beta-carotene isomerase D27, chloroplast (LOC105957742), mRNA	436	436	78%	1e-117	75.83%	XM_012981705.1
☐	PREDICTED: Lupinus angustifolius beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC109354828), transcript variant X4, mRNA	424	424	72%	6e-114	76.26%	XM_019597580.1
☐	PREDICTED: Lupinus angustifolius beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC109354828), transcript variant X3, misc. RNA	424	424	72%	6e-114	76.26%	XR_002108809.1
☐	PREDICTED: Lupinus angustifolius beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC109354828), transcript variant X2, mRNA	424	424	72%	6e-114	76.26%	XM_019597579.1
☐	PREDICTED: Lupinus angustifolius beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC109354828), transcript variant X1, mRNA	424	424	72%	6e-114	76.26%	XM_019597578.1
☐	PREDICTED: Arachis hypogaea beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC112737455), mRNA	407	407	72%	5e-109	75.68%	XM_025787370.1
☐	PREDICTED: Arachis hypogaea beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC112726949), transcript variant X1, mRNA	398	398	72%	2e-106	75.34%	XM_025776524.1
☐	PREDICTED: Solanum tuberosum beta-carotene isomerase D27, chloroplast (LOC102588363), mRNA	396	396	71%	9e-106	75.26%	XM_015309678.1
☐	PREDICTED: Nicotiana sylvestris beta-carotene isomerase D27, chloroplast (LOC104217305), transcript variant X1, mRNA	395	395	72%	3e-105	75.22%	XM_009767512.1
☐	PREDICTED: Nicotiana glauca beta-carotene isomerase D27, chloroplast (LOC104096483), mRNA	384	384	72%	5e-102	74.96%	XM_009602859.2
☐	PREDICTED: Nicotiana glauca beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC107760986), transcript variant X1, mRNA	384	384	72%	5e-102	74.96%	XM_016679138.1
☐	PREDICTED: Malus domestica beta-carotene isomerase D27, chloroplast-like (LOC103432377), mRNA	381	381	73%	2e-101	74.66%	XM_029100536.1

Şekil 4.16. Konsensüs D27 dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı ile konsensüsün kodladığı 253 amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “sitokrom β -karoten izomeraz D-27 like” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

MAX3: Çalışmada, MAX3 geni için toplamda 13 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 1881 bç uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. MAX3 genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında BLASTn algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden MAX3 olarak belirlenmiş 74 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.18). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_023043217.1) ile %99, *Nicotiana tomentosiformis* bitkisine ait bir mRNA (XM_009594354.2) ile %77 ve *Nicotiana tabacum* bitkisine ait bir mRNA (JQ034523.1) ile ise %77 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

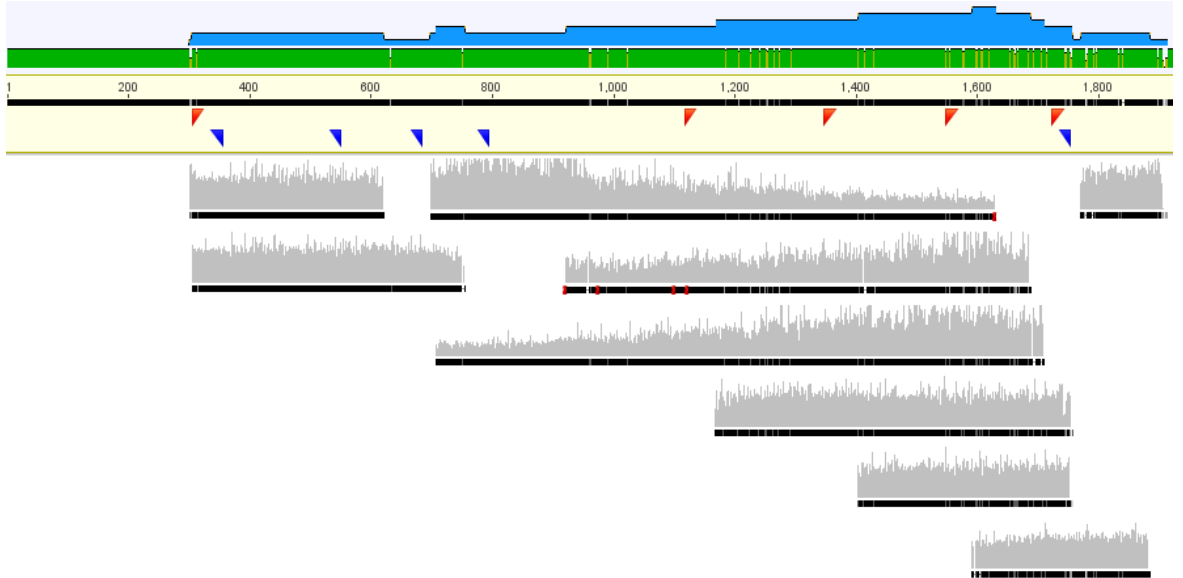
Select: All None Selected 0

Alignments	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC111412327), transcript variant X1, mRNA	3381	3381	100%	0.0	99.89%	XM_023043217.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC111412327), transcript variant X2, mRNA	3359	3359	100%	0.0	99.63%	XM_023043218.1
☐	PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC104089452), mRNA	1339	1339	87%	0.0	77.80%	XM_009594354.2
☐	Nicotiana tabacum carotenoid cleavage dioxygenase 7 (CCD7) mRNA, complete cds	1339	1339	87%	0.0	77.80%	JQ034523.1
☐	Nicotiana tabacum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC107767822), mRNA	1324	1324	87%	0.0	77.61%	NM_001324957.1
☐	Nicotiana tabacum cultivar K326 more axillary branches 3 mRNA, complete cds	1324	1324	87%	0.0	77.61%	KF272803.2
☐	PREDICTED: Nicotiana tabacum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC107771847), mRNA	1315	1315	87%	0.0	77.40%	XM_016591298.1
☐	PREDICTED: Nicotiana sylvestris carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC104225588), mRNA	1315	1315	87%	0.0	77.40%	XM_009771427.1
☐	PREDICTED: Solanum tuberosum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC102587589), mRNA	1258	1258	87%	0.0	76.91%	XM_006347863.2
☐	PREDICTED: Coffea arabica carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC113728842), mRNA	1221	1221	87%	0.0	76.42%	XM_027253204.1
☐	PREDICTED: Coffea arabica carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic-like (LOC113728835), mRNA	1221	1221	87%	0.0	76.42%	XM_027250717.1
☐	PREDICTED: Capsicum annuum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC107844820), transcript variant X2, mRNA	1213	1213	87%	0.0	76.21%	XM_016689169.1
☐	PREDICTED: Capsicum annuum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC107844820), transcript variant X1, mRNA	1213	1213	87%	0.0	76.21%	XM_016689163.1
☐	PREDICTED: Coffea eugenioides carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC113759338), mRNA	1207	1207	87%	0.0	76.24%	XM_027301904.1
☐	Solanum lycopersicum carotenoid cleavage dioxygenase 7 (CCD7), mRNA	1189	1189	87%	0.0	76.07%	NM_001247504.1
☐	PREDICTED: Solanum pennellii carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC107030630), mRNA	1180	1180	87%	0.0	75.95%	XM_015231903.2
☐	PREDICTED: Sesamum indicum carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic (LOC105174164), mRNA	1148	1148	87%	0.0	75.30%	XM_011096174.2
☐	Actinidia chinensis carotenoid cleavage dioxygenase 7 (CCD7) mRNA, complete cds	1135	1135	87%	0.0	75.33%	GU206813.1

Şekil 4.18. Konsensüs MAX3 dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı ile konsensüsün kodladığı 437 amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “sitokrom karotenoid oksijenaz” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

MAX4: Çalışmada, MAX4 geni için toplamda 9 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 1603 bç uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. MAX4 genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında BLASTn algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden MAX4 olarak

belirlenmiş 69 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.20). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_023006754.1) ile %99, *Nicotiana attenuata* bitkisine ait bir mRNA (XM_019372342.1) ile %80 ve *Nicotiana tomentosiformis* bitkisine ait bir mRNA (XM_009628066.2) ile ise %80 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

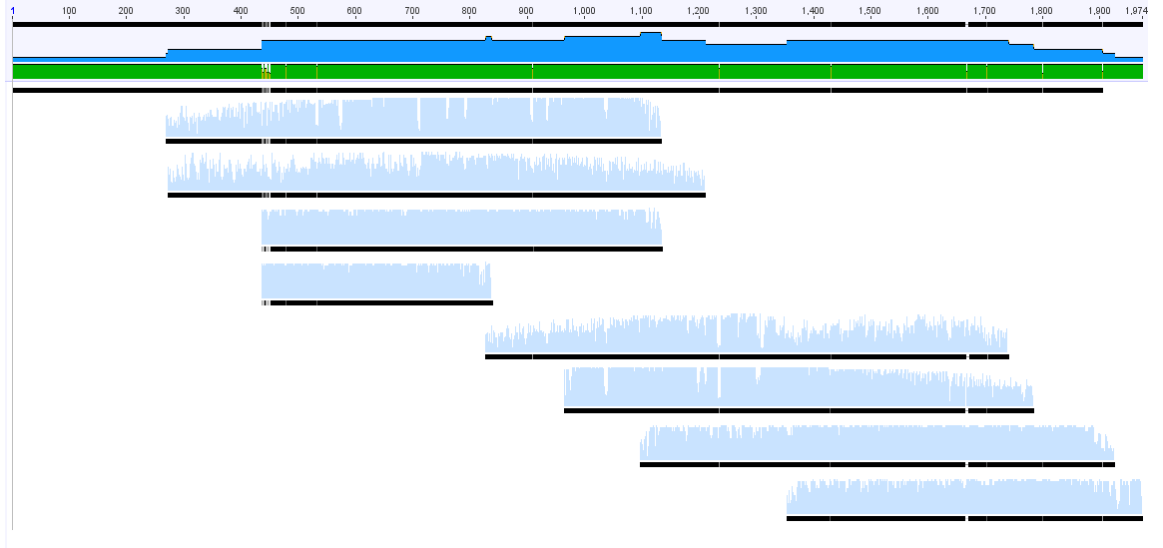
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☐ PREDICTED: <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC11382711). mRNA	2809	2809	99%	0.0	99.00%	XM_023006754.1
☐ PREDICTED: <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC11368646). mRNA	2114	2114	94%	0.0	90.91%	XM_022990012.1
☐ PREDICTED: <i>Nicotiana attenuata</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC109209147). mRNA	1330	1330	90%	0.0	80.37%	XM_019372342.1
☐ PREDICTED: <i>Nicotiana tomentosiformis</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC104117083). mRNA	1325	1325	90%	0.0	80.30%	XM_009628066.2
☐ <i>Petunia x hybrida</i> Dad1/CCD8 mRNA, complete cds	1324	1324	90%	0.0	80.33%	AY746877.1
☐ <i>Nicotiana tabacum</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC107812793). mRNA	1307	1307	90%	0.0	80.03%	NM_001325897.1
☐ PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC107821949). mRNA	1307	1307	90%	0.0	80.03%	XM_016648428.1
☐ <i>Nicotiana tabacum</i> cultivar K326 more axillary branches 4 protein (IMAX4) mRNA, complete cds	1307	1307	90%	0.0	80.03%	KC795555.1
☐ PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC7462922). mRNA	1303	1303	89%	0.0	80.03%	XM_002324761.2
☐ PREDICTED: <i>Nicotiana sylvestris</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC104228402). mRNA	1303	1303	90%	0.0	79.96%	XM_009780861.1
☐ PREDICTED: <i>Coffea arabica</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC113707432). mRNA	1288	1288	89%	0.0	79.90%	XM_027229764.1
☐ PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC105115287). mRNA	1271	1271	89%	0.0	79.54%	XM_011012127.1
☐ PREDICTED: <i>Coffea eugenioides</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC113781727). mRNA	1270	1270	89%	0.0	79.63%	XM_027327708.1
☐ PREDICTED: <i>Coffea arabica</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC113703585). mRNA	1270	1270	89%	0.0	79.63%	XM_027224992.1
☐ PREDICTED: <i>Capiscum annuum</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC107839011). mRNA	1252	1252	90%	0.0	79.17%	XM_016682338.1
☐ PREDICTED: <i>Camellia sinensis</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC114275767). mRNA	1246	1246	90%	0.0	78.88%	XM_028217767.1
☐ PREDICTED: <i>Sesamum indicum</i> carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic-like (LOC105156117). mRNA	1240	1240	89%	0.0	79.06%	XM_011072167.2

Şekil 4.20. Konsensüs MAX4 dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı ile konsensüsün kodladığı 418 amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “sitokrom karotenoid oksijenaz” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

MAX1: Çalışmada, MAX1 geni için toplamda 8 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 1688 bç uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. MAX1 genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında BLASTn algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden MAX1 olarak belirlenmiş 55 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.22). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_022999669.1) ile %99, *Sesamum indicum* bitkisine ait bir mRNA (XM_011083921.2) ile %81 ve *Nicotiana tomentosiformis* bitkisine ait bir mRNA (XM_009594869.2) ile ise %79 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

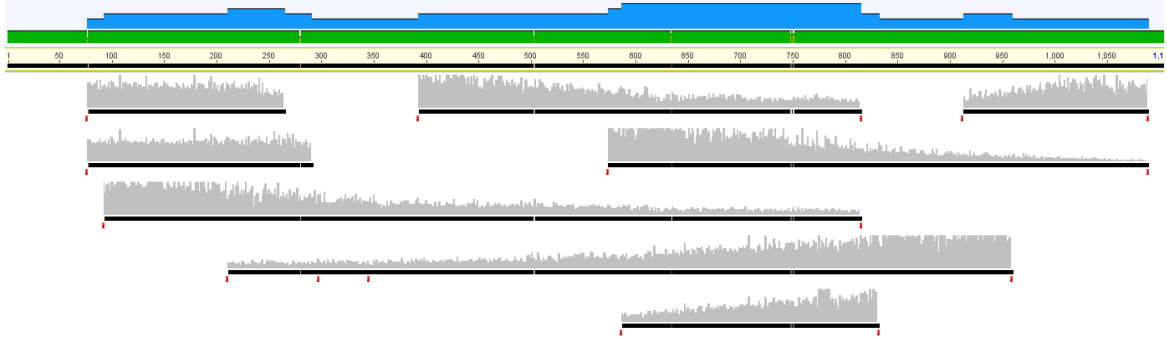
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111376697). mRNA	2922	2922	96%	0.0	99.63%	XM_022999669.1
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111385269). transcript variant X1. mRNA	1872	1872	94%	0.0	85.83%	XM_023009645.1
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111385269). transcript variant X5. mRNA	1815	1815	92%	0.0	85.59%	XM_023009650.1
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111385269). transcript variant X4. mRNA	1815	1815	92%	0.0	85.59%	XM_023009649.1
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111385269). transcript variant X3. mRNA	1815	1815	92%	0.0	85.59%	XM_023009647.1
☐ PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cytochrome P450 711A1-like (LOC111385269). transcript variant X2. mRNA	1815	1815	92%	0.0	85.59%	XM_023009646.1
☐ PREDICTED: Sesamum indicum cytochrome P450 711A1 (LOC105165045). transcript variant X2. mRNA	1366	1366	82%	0.0	81.66%	XM_011083921.2
☐ PREDICTED: Sesamum indicum cytochrome P450 711A1 (LOC105165045). transcript variant X1. mRNA	1313	1313	82%	0.0	80.11%	XM_020694933.1
☐ PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis cytochrome P450 711A1 (LOC104089805). mRNA	1228	1228	82%	0.0	79.54%	XM_009594869.2
☐ PREDICTED: Nicotiana attenuata cytochrome P450 711A1 (LOC109229259). mRNA	1187	1187	82%	0.0	78.84%	XM_019394643.1
☐ PREDICTED: Nicotiana sylvestris cytochrome P450 711A1 (LOC104245421). mRNA	1187	1187	82%	0.0	78.84%	XM_009801023.1
☐ PREDICTED: Nicotiana tabacum cytochrome P450 711A1 (LOC107781156). mRNA	1177	1177	82%	0.0	78.69%	XM_016601804.1
☐ PREDICTED: Capsicum annuum cytochrome P450 711A1 (LOC107839975). mRNA	1152	1152	81%	0.0	78.45%	XM_016682287.1
☐ PREDICTED: Coffea eugenioides cytochrome P450 711A1-like (LOC113780974). mRNA	1150	1150	82%	0.0	78.30%	XM_027326774.1
☐ PREDICTED: Coffea eugenioides cytochrome P450 711A1-like (LOC113762468). mRNA	1150	1150	82%	0.0	78.30%	XM_027305830.1
☐ PREDICTED: Coffea arabica cytochrome P450 711A1-like (LOC113704035). transcript variant X1. mRNA	1150	1150	82%	0.0	78.30%	XM_027225659.1
☐ PREDICTED: Erythraea quitatus cytochrome P450 711A1-like (LOC105949216). mRNA	1143	1143	82%	0.0	78.13%	XM_012972510.1

Şekil 4.22. Konsensüs MAX1 dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı ile konsensüsün kodladığı 449 amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “sitokrom P450 süper

ailesi” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

D14: Çalışmada, *D14* geni için toplamda 8 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 1013 bp uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *D14* genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında BLASTn algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden *D14* olarak belirlenmiş 62 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.24). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_023015112.1) ile %100, *Coffea eugenioides* bitkisine ait bir mRNA (XM_27292605.1) ile %79 ve *Coffea arabica* bitkisine ait bir mRNA (XM_027236689.1) ile ise %79 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

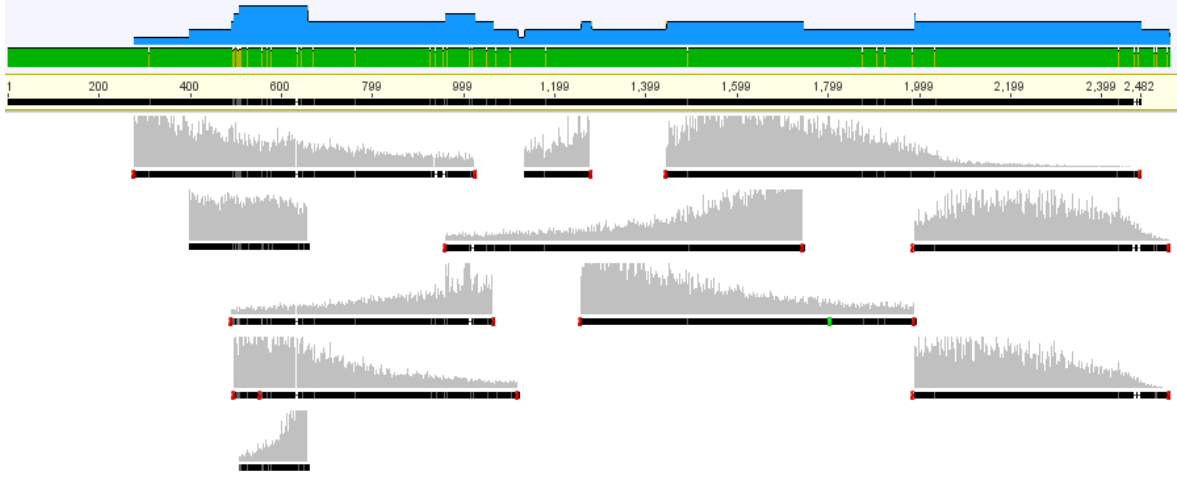
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC11380114), mRNA	1826	1826	99%	0.0	100.00%	XM_023015112.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC11379347), mRNA	1042	1042	99%	0.0	82.27%	XM_023002707.1
☐	PREDICTED: Coffea eugenioides probable strigolactone esterase DAD2 (LOC113748989), mRNA	680	680	76%	0.0	79.33%	XM_27292605.1
☐	PREDICTED: Coffea arabica probable strigolactone esterase DAD2 (LOC113713001), mRNA	680	680	76%	0.0	79.33%	XM_027236689.1
☐	PREDICTED: Coffea arabica probable strigolactone esterase DAD2 (LOC113713282), mRNA	680	680	76%	0.0	79.33%	XM_027236689.1
☐	PREDICTED: Sesamum indicum probable strigolactone esterase DAD2 (LOC105159105), mRNA	644	644	79%	5e-180	77.74%	XM_011076056.2
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC11367410), mRNA	634	634	77%	2e-177	77.98%	XM_022988263.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC11367411), mRNA	625	625	77%	1e-174	77.72%	XM_022988264.1
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC11367408), mRNA	620	620	77%	5e-173	77.59%	XM_022988262.1
☐	PREDICTED: Nicotiana attenuata probable strigolactone esterase DAD2 (LOC109236727), mRNA	605	605	76%	1e-168	77.40%	XM_019402933.1
☐	PREDICTED: Nicotiana tabacum probable strigolactone esterase DAD2 (LOC107816490), mRNA	600	600	76%	5e-167	77.27%	XM_016642211.1
☐	PREDICTED: Nicotiana sylvestris probable strigolactone esterase DAD2 (LOC104223737), mRNA	600	600	76%	5e-167	77.27%	XM_009775236.1
☐	PREDICTED: Erythranthe guttatus probable strigolactone esterase DAD2 (LOC105964817), mRNA	598	598	79%	2e-166	76.43%	XM_012989321.1
☐	PREDICTED: Erythranthe guttatus probable strigolactone esterase DAD2 (LOC10596268), mRNA	589	589	79%	9e-164	76.18%	XM_012989329.1
☐	PREDICTED: Camellia sinensis probable strigolactone esterase DAD2 (LOC114301778), mRNA	588	588	78%	3e-163	76.60%	XM_028246743.1
☐	PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis probable strigolactone esterase DAD2 (LOC104093742), mRNA	586	586	76%	1e-162	76.84%	XM_009599547.2
☐	PREDICTED: Nicotiana tabacum probable strigolactone esterase DAD2 (LOC107819832), mRNA	586	586	76%	1e-162	76.84%	XM_016645982.1

Şekil 4.24. Konsensüs *D14* dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı algoritması ile konsensüsün kodladığı 266

amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “ α/β hidrolaz_1 süper family” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

MAX2: Çalışmada, MAX2 geni için toplamda 11 okuma yaptırılmış ve bu okumalar Geneious (R 8.1.7) yazılımı ile birleştirilerek 2265 bp uzunluğunda bir konsensüs elde edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. MAX2 genine ait birleştirilmiş okumalar

Konsensüs dizinin kimliği NCBI web sayfasında algoritması ile Nucleotide collection (nr/nt) veri tabanına karşı araştırılmış ve daha önceden MAX2 olarak belirlenmiş 56 farklı bitki türüne ait transkript ile yüksek oranlarda eşleşme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4. 26). Bu sonuca göre Ayvalık çeşidinden elde edilen konsensüs *Olea europaea* var. *sylvestris* bitkisine ait bir mRNA (XM_023016743.1) ile %99, *Sesamum indicum* bitkisine ait bir mRNA (XM_011084705) ile %74 ve *Nicotiana tabacum* bitkisine ait bir mRNA (XM_016635601.1) ile ise %72 oranında eşleşmektedir.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☐	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris F-box/RR-repeat MAX2 homolog A-like (LOC111391510). mRNA	3946	4083	97%	0.0	99.68%	XM_023016743.1
☐	PREDICTED: Sesamum indicum F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC105165629). mRNA	770	1358	82%	0.0	74.64%	XM_011084705.2
☐	PREDICTED: Nicotiana tabacum F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC107810779). mRNA	687	1086	81%	0.0	72.84%	XM_018635601.1
☐	PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC104115030). mRNA	682	1072	81%	0.0	72.76%	XM_009625596.2
☐	PREDICTED: Nicotiana tabacum F-box/RR-repeat MAX2 homolog A-like (LOC107797530). mRNA	663	1078	79%	0.0	73.05%	XM_016620433.1
☐	PREDICTED: Nicotiana sylvestris F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC104218387). mRNA	663	1078	79%	0.0	73.05%	XM_009768866.1
☐	Petunia x hybrida MAX2A (MAX2A) gene, complete cds	616	952	79%	1e-171	71.90%	HM117629.1
☐	PREDICTED: Solanum tuberosum F-box/RR-repeat MAX2 homolog A-like (LOC102601824). mRNA	609	1008	80%	2e-169	71.68%	XM_006348812.2
☐	PREDICTED: Ipomoea nil F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC109187329). mRNA	601	978	82%	3e-167	71.65%	XM_019338342.1
☐	PREDICTED: Nicotiana attenuata F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC109241701). mRNA	591	982	81%	6e-164	70.79%	XM_019408465.1
☐	PREDICTED: Erythraea guttatus F-box/RR-repeat MAX2 homolog A (LOC105953800). mRNA	590	1006	79%	2e-163	71.18%	XM_012977479.1
☐	Petunia x hybrida MAX2B (MAX2B) gene, complete cds	589	995	80%	2e-163	71.56%	HM117630.1
☐	PREDICTED: Solanum lycopersicum F-box/RR-repeat MAX2 homolog A-like (LOC101246942). mRNA	580	979	79%	1e-160	71.38%	XM_004243236.4
☐	Solanum lycopersicum chromosome ch07, complete genome	575	975	79%	5e-159	71.29%	H0975519.1
☐	PREDICTED: Solanum pennellii F-box/RR-repeat MAX2 homolog A-like (LOC107026050). mRNA	566	983	78%	2e-156	71.04%	XM_015226886.2
☐	Solanum lycopersicum cultivar I-3 chromosome 7	566	979	78%	2e-156	71.04%	CP023763.1
☐	Solanum pennellii chromosome ch07, complete genome	566	983	78%	2e-156	71.04%	H0975446.1

Şekil 4. 26. Konsensüs MAX2 dizisi için BLAST sonucu

Çalışmada daha sonra Geneious yazılımı ile konsensüsün kodladığı 677 amino asitten oluşan muhtemel bir polipeptid elde edilmiş ve bu dizinin bir “leucine-rich repeat domain superfamily” korunmuş domain bölgesini içerdiği görülmüştür.

4.2. Biyoinformatik Analizler

Gen bankasına Farga ve Sylvestris zeytin çeşitlerine ait transkriptomlar yakın bir zaman öncesinde eklenmiştir (Cruz ve ark., 2016; Ünver ve ark., 2017). Bunlardan yabancı tip bir zeytin çeşidi olan Sylvestris transkriptomunda bulunan mRNA’ların kimlikleri ve protein dizileri açıklanmıştır (annotation). Bu nedenle, SL biyosentez, algılanma ve sinyal iletiminde rol alan genlerin kimlik ve yapıları, Sylvestris çeşidine ait genom, transkriptom ve proteom bilgileri kullanılarak biyoinformatik olarak analiz edilmiştir.

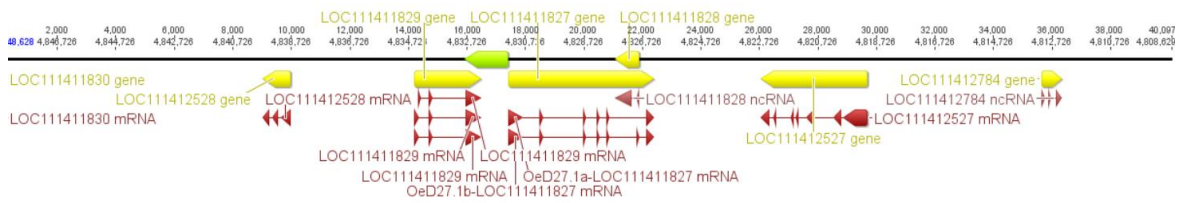
4.2.1. D27

Çalışmada *A. thaliana* D27 proteinine ait amino asit dizisi (AT1G03055) TAIR web sayfasından indirilmiş ve referans olarak kullanılmıştır. Referans dizinin benzerleri Geneious yazılımında Sylvestris, Farga ve domates proteinlerinden oluşturulan veri bankasında, Blastp seçeneği “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmıştır. Blastp analizi sonucunda domates ve Farga çeşidi protein dizileri ile yüksek oranlarda eşleşme gösteren Sylvestris proteinleri belirlenmiş ve ayrı bir dosyaya kaydedilmiştir. Bu proteinlere *A. thaliana* D27 protein dizisi de eklenerek toplamda 26 adet protein dizisi ile, Geneious programında varsayılan parametreler ile “Muscle” algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır (multiple alignment) (Şekil 4.27).

Bu ağaç üzerinde XP_022898221.1, XP_022898222.1, XP_022854731.1 ve XP_022854732.1 no'lu Sylvestris çeşidi proteinleri *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup, muhtemel D27 proteini olarak değerlendirilmek üzere ele alınmıştır.

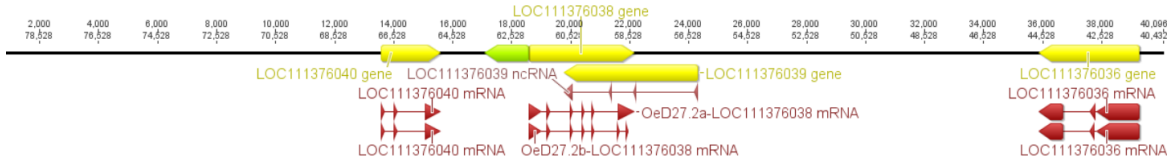
Çalışmada daha sonra, filogenetik ağaç kullanılarak belirlenen 4 muhtemel protein dizisini kodlayan D27 transkriptleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun için ilk olarak, XP_022898221.1 no'lu Sylvestris proteini transkriptom veri bankasında tblastn seçeneğindeki “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmış ve %100 benzerlik gösteren XM_023042453.1 no'lu transkript bulunmuştur. Aynı yöntem ile XP_022898222.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023042454.1 no'lu transkript, XP_022854731.1 no'lu protein araştırıldığında %100 benzerlik gösteren XM_022998963.1 no'lu transkript ve son olarak XP_022854732.1 no'lu protein araştırıldığında ise, %100 benzerlik gösteren XM_022998964.1 no'lu transkriptler elde edilmiştir. Böylece toplamda Sylvestris çeşidinde D27'ye ait 4 adet muhtemel transkript dizisi bulunmuştur.

Çalışmada daha sonra, bu transkript dizilerini zeytin genomunda kodlayan bölgeler, Sylvestris genom veri tabanında Geneious yazılımındaki blastn seçeneğindeki “Extended Regions with annotations” komutu ile parametre değeri 20 000 olacak şekilde tek tek sorgulanmıştır böylece genomik bölgelere komşu promotor bölgeleri de elde edilmiştir. Bu sorgulama sonrasında, XM_023042453.1 ve XM_023042454.1 no'lu transkriptlerin 16. Zeytin kromozomu üzerindeki NC_036252 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği bulunmuştur (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036252 no'lu genomik bölge

XM_022998963.1 ve XM_022998964.1 no'lu transkriptlerin ise NW_019231930 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.30).

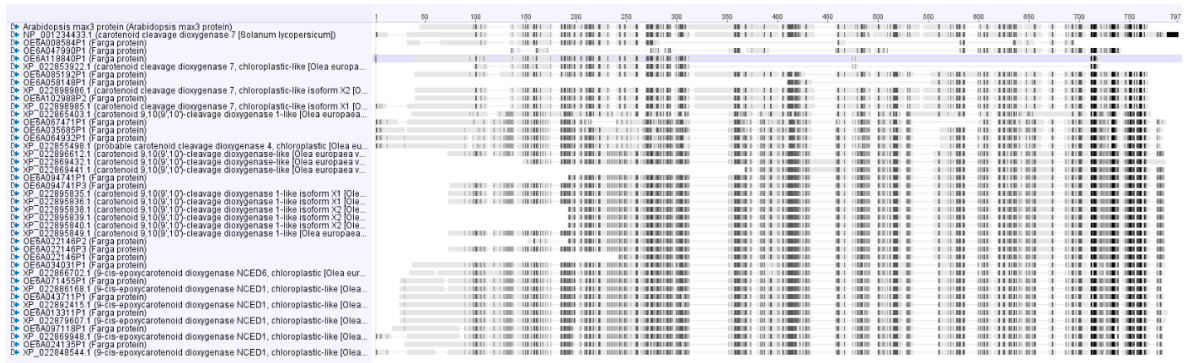


Şekil 4.30. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019231930 no’lu genomik bölge

Çalışmada, *D27* transkriptlerini kodlayan genomik dizilerin 5’ uçları ilk ekzondan önceki 1500 bp uzunluğundaki gen bölgesi, bilgisayara ayrı bir dosya halinde kaydedilmiş (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30, yeşil renkli bölgeler) ve promotor analizleri için kullanılmıştır. Böylece *D27* için Sylvestris çeşidinde toplamda 2 genomik dizi, 4 transkript dizisi ve 4 protein dizisi elde edilmiştir. Bulunan genomik diziler *Oe27.1* ve *OeD27.2* olarak, *Oe27.1* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizileri *OeD27.1a* ve *OeD27.1b* olarak; *OeD27.2* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizileri ise *OeD27.2a* ve *OeD27.2b* olarak adlandırılmıştır.

4.2.2. MAX3

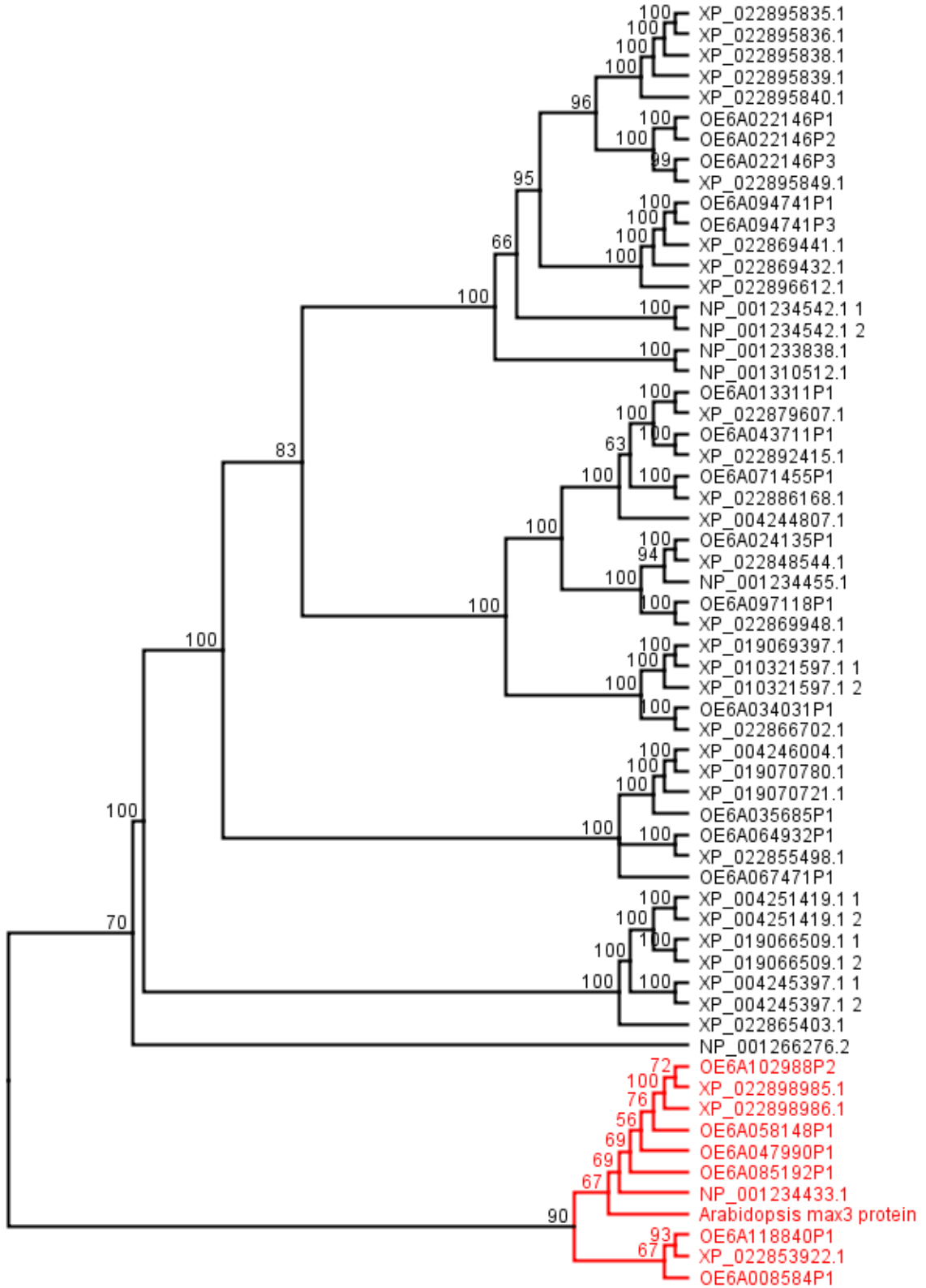
Çalışmada *A. thaliana* MAX3 proteinine ait amino asit dizisi (AT2G44990) TAIR web sayfasından indirilmiş ve referans olarak kullanılmıştır. Referans dizinin benzerleri Geneious yazılımında Sylvestris, Farga ve domates proteinlerinden oluşturulan veri bankasında, Blastp seçeneği “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmıştır. Blastp analizi sonucunda domates ve Farga çeşidi protein dizileri ile yüksek oranlarda eşleşme gösteren Sylvestris proteinleri belirlenmiş ve ayrı bir dosyaya kaydedilmiştir. Bu proteinlere *A. thaliana* MAX3 protein dizisi de eklenerek toplamda 61 adet protein dizisi ile, Geneious programında varsayılan parametreler ile “Muscle” algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır (multiple alignment) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. MAX3 protein dizilerinin hizalanması

Çalışmada daha sonra, Geneious yazılımında “Geneious Tree Builder” komutu kullanılarak UPGMA algoritması ile filogenetik bir ağaç çizilmiştir (Şekil 4.32).

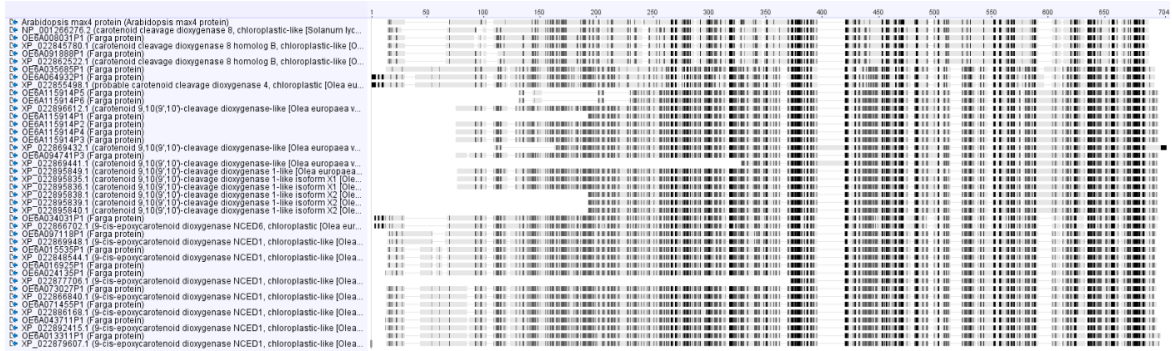




Şekil 4.32. Hizalanan MAX3 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX3 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir

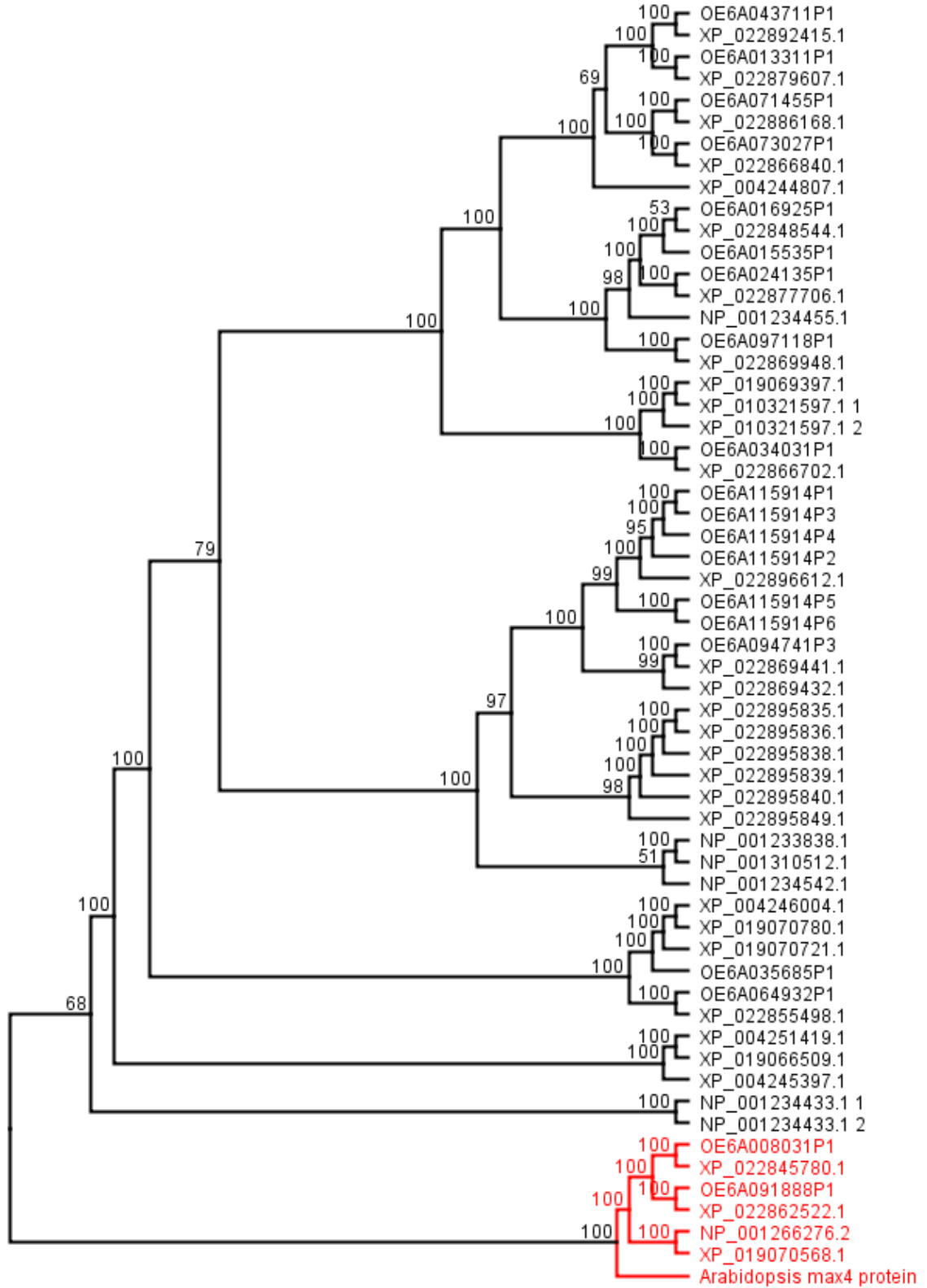
Bu ağaç üzerinde XP_022898985.1 ve XP_022898986.1 no'lu *Sylvestris* çeşidi proteinleri *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup,

bankasında, Blastp seçeneği “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmıştır. Blastp analizi sonucunda domates ve Farga çeşidi protein dizileri ile yüksek oranlarda eşleşme gösteren Sylvestris proteinleri belirlenmiş ve ayrı bir dosyaya kaydedilmiştir. Bu proteinlere *A. thaliana* MAX4 protein dizisi de eklenerek toplamda 61 adet protein dizisi ile, Geneious programında varsayılan parametreler ile “Muscle” algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır (multiple alignment) (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. MAX4 protein dizilerinin hizalanması

Çalışmada daha sonra, Geneious yazılımında “Geneious Tree Builder” komutu kullanılarak UPGMA algoritması ile filogenetik bir ağaç çizilmiştir (Şekil 4.35).

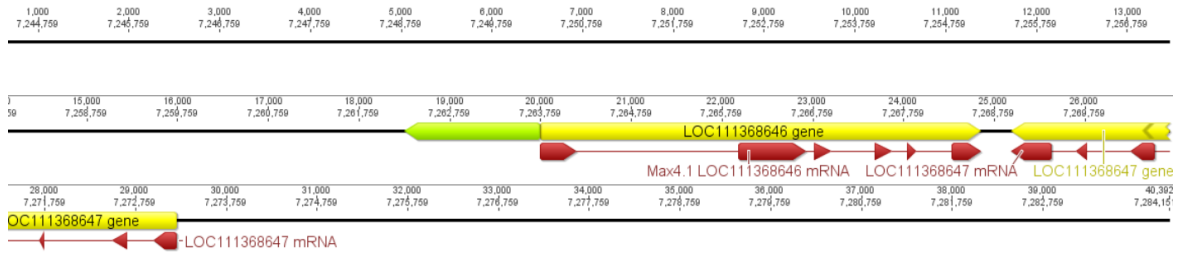


Şekil 4.35. Hizalanan MAX4 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX4 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir

Bu ağaç üzerinde XP_022845780.1 ve XP_022862522.1 no'lu *Sylvestris* çeşidi proteinleri *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup, muhtemel MAX4 proteini olarak değerlendirilmek üzere ele alınmıştır. Bununla beraber, XP_019070568.1 no'lu protein dizisi kısmi olduğu için çalışma dışında bırakılmıştır.

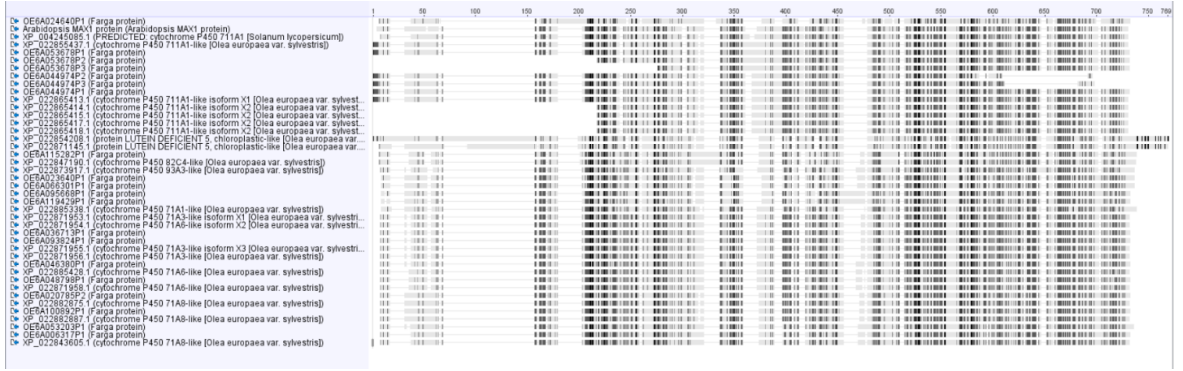
Çalışmada daha sonra, filogenetik ağaç kullanılarak belirlenen 2 muhtemel protein dizisini kodlayan MAX4 transkriptleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun için ilk olarak, XP_022845780.1 no'lu *Sylvestris* proteini transkriptom veri bankasında tblastn seçeneğindeki “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmış ve %100 benzerlik gösteren XM_022990012.1 no'lu transkript bulunmuştur. Aynı yöntem ile XP_022862522.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023006754.1 no'lu transkript elde edilmiştir. Böylece toplamda *Sylvestris* çeşidinde MAX4'e ait 2 adet muhtemel transkript dizisi bulunmuştur.

Çalışmada daha sonra, bu transkript dizilerini zeytin genomunda kodlayan bölgeler, *Sylvestris* genom veri tabanında Geneious yazılımındaki blastn seçeneğindeki “Extended Regions with annotations” komutu ile parametre değeri 20 000 olacak şekilde tek tek sorgulanmıştır. Bu sorgulama sonrasında, XM_022990012.1 no'lu transkriptin 19. zeytin kromozomu üzerindeki NC_036255 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği bulunmuştur (Şekil 4.36).



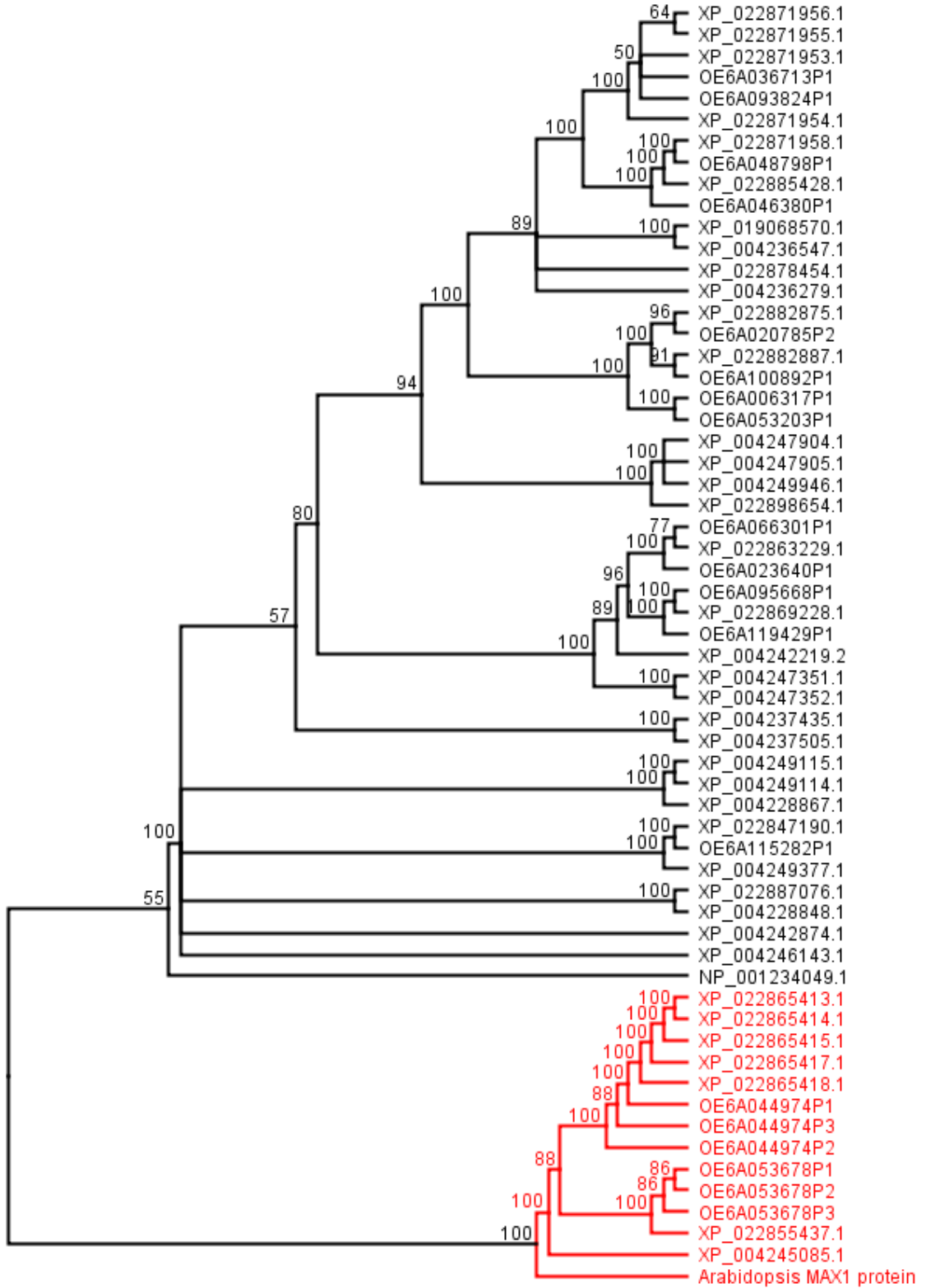
Şekil 4.36. *Sylvestris* çeşidi genomunda bulunan NC_036255 no'lu genomik bölge

XM_023006754.1 no'lu transkriptin ise NW_019243807 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.38. MAX1 protein dizilerinin hizalanması

Çalışmada daha sonra, Geneious yazılımında “Geneious Tree Builder” komutu kullanılarak UPGMA algoritması ile filogenetik bir ağaç çizilmiştir (Şekil 4.39).

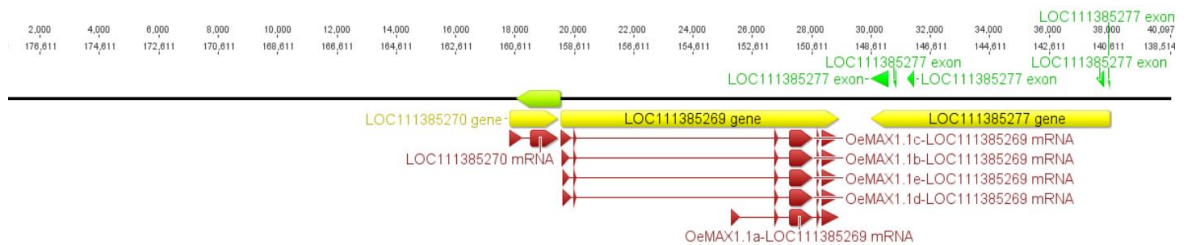


Şekil 4.39. Hizalanan MAX1 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX1 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir

Bu ağaç üzerinde XP_022865413.1, XP_022865414.1, XP_022865415.1, XP_022865417.1, XP_022865418.1 ve XP_022855437.1 no'lu *Sylvestris* çeşidi proteinleri *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup, muhtemel MAX1 proteini olarak değerlendirilmek üzere ele alınmıştır. Bunlardan XP_022865414.1, XP_022865415.1, XP_022865417.1 ve XP_022865418.1 no'lu proteinlerin amino asit dizileri birbiri ile tamamen aynıdır. Bu nedenle sonraki aşamalarda yalnızca XP_022865414.1 ile devam edilmiştir.

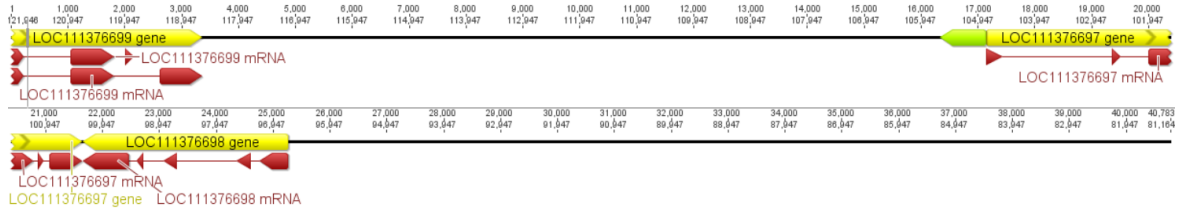
Çalışmada daha sonra, filogenetik ağaç kullanılarak belirlenen 3 muhtemel protein dizisini kodlayan MAX1 transkriptleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun için ilk olarak, XP_022865413.1 no'lu *Sylvestris* proteini transkriptom veri bankasında tblastn seçeneğindeki “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmış ve %100 benzerlik gösteren XM_023009645.1 no'lu transkript bulunmuştur. Aynı yöntem ile XP_022865414.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023009646.1, XM_023009647.1, XM_023009649.1 ve XM_023009650.1 no'lu transkriptler, XP_022855437.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_022999669.1 no'lu transkript elde edilmiştir. Böylece toplamda *Sylvestris* çeşidinde MAX1'e ait 6 adet muhtemel transkript dizisi bulunmuştur.

Çalışmada daha sonra, bu transkript dizilerini zeytin genomunda kodlayan bölgeler, *Sylvestris* genom veri tabanında Geneious yazılımındaki blastn seçeneğindeki “Extended Regions with annotations” komutu ile parametre değeri 20 000 olacak şekilde tek tek sorgulanmıştır. Bu sorgulama sonrasında, XM_023009645.1, XM_023009646.1, XM_023009647.1, XM_023009649.1 ve XM_023009650.1 no'lu transkriptlerin NW_019249854 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği bulunmuştur (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. *Sylvestris* çeşidi genomunda bulunan NW_019249854 no'lu genomik bölge

XM_022999669.1 no'lu transkriptin ise NW_019233108 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.41).

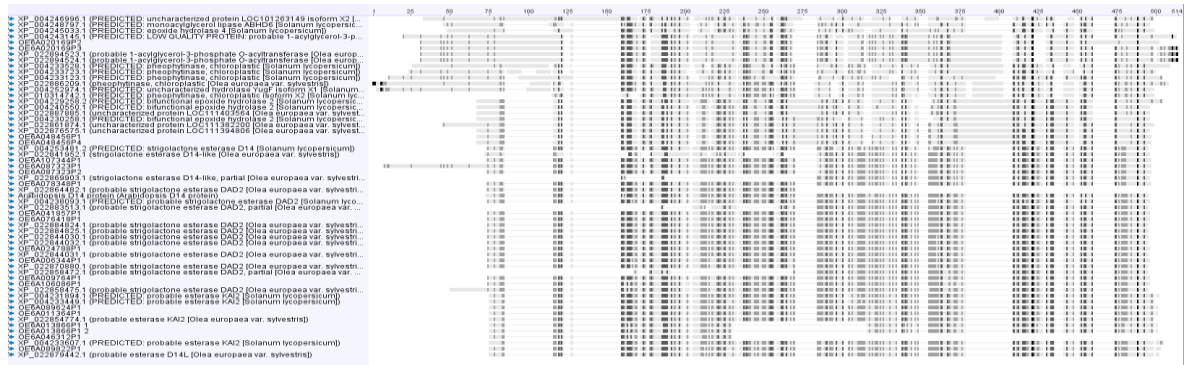


Şekil 4.41. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019233108 no'lu genomik bölge

Çalışmada, *MAX1* transkriptlerini kodlayan genomik dizilerin 5' uçları ilk ekzondan önceki 1500 bp uzunluğundaki gen bölgesi, bilgisayara ayrı bir dosya halinde kaydedilmiş (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41, yeşil renkli bölgeler) ve promotor analizleri için kullanılmıştır. Böylece *MAX1* için Sylvestris çeşidinde toplamda 2 genomik dizi, 6 transkript dizisi ve 3 protein dizisi elde edilmiştir. Bulunan genomik diziler *OeMAX1.1* ve *OeMAX1.2* olarak, *OeMAX1.1* no'lu genomik diziden ifade olan transkript dizileri *OeMAX1.1a*, *OeMAX1.1b*, *OeMAX1.1c*, *OeMAX1.1d* ve *OeMAX1.1e* olarak, *OeMAX1.2* no'lu genomik diziden ifade olan transkript dizisi ise *OeMAX1.2* olarak adlandırılmıştır.

4.2.5. D14

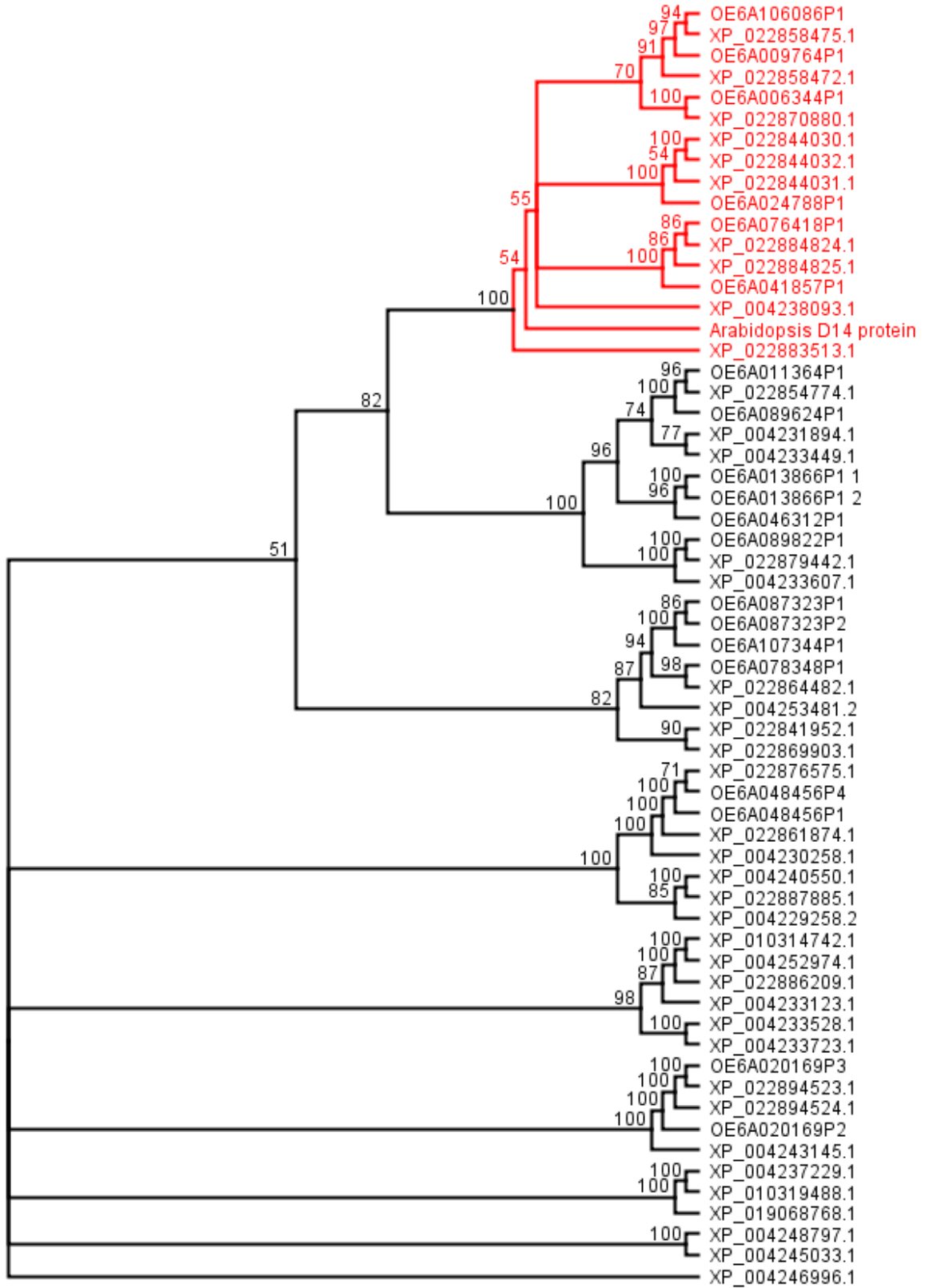
Çalışmada *A. thaliana* D14 proteinine ait amino asit dizisi (AT3G03990) TAIR web sayfasından indirilmiş ve referans olarak kullanılmıştır. Referans dizinin benzerleri Geneious yazılımında Sylvestris, Farga ve domates proteinlerinden oluşturulan veri bankasında, Blastp seçeneği "Full sequence with annotations" parametresi kullanılarak araştırılmıştır. Blastp analizi sonucunda domates ve Farga çeşidi protein dizileri ile yüksek oranlarda gösteren Sylvestris proteinleri belirlenmiş ve ayrı bir dosyaya kaydedilmiştir. Bu proteinlere *A. thaliana* D14 protein dizisi de eklenerek toplamda 61 adet protein dizisi ile, Geneious programında varsayılan parametreler ile "Muscle" algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır (multiple alignment) (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. D14 protein dizilerinin hizalanması

Çalışmada daha sonra, Geneious yazılımında “Geneious Tree Builder” komutu kullanılarak UPGMA algoritması ile filogenetik bir ağaç çizilmiştir (Şekil 4.43).



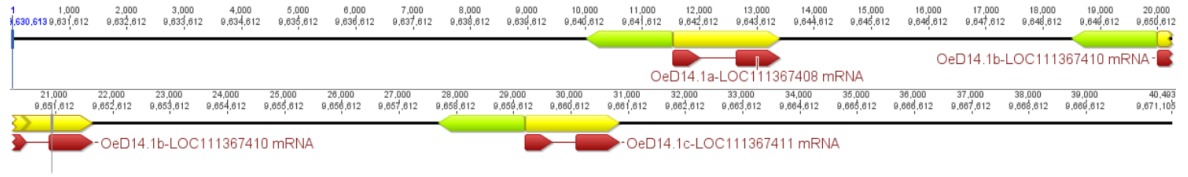


Şekil 4.43. Hizalanan D14 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel D14 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir

Bu ağaç üzerinde XP_022844030.1, XP_022844031.1, XP_022844032.1, XP_022884824.1, XP_022884825.1, XP_022858472.1, XP_022858475.1, XP_022870880.1 ve XP_022883513.1 no'lu Sylvestris çeşidi proteinleri *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup, muhtemel D14 proteini olarak değerlendirilmek üzere ele alınmıştır. XP_022844030.1 ve XP_022844032.1 no'lu protein dizileri birbiri ile tamamen aynıdır. Ayrıca, XP_022884824.1 ve XP_022884825.1 no'lu protein dizileri de birbiri ile tamamen aynıdır. Bu nedenle sonraki aşamalarda XP_022844030.1 ve XP_022884824.1 ile devam edilmiştir. Bununla beraber, XP_022858472.1 ve XP_022883513.1 no'lu protein dizileri kısmi olduğu için çalışma dışında bırakılmıştır.

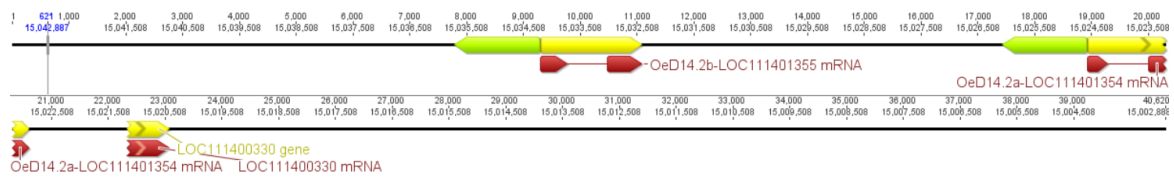
Çalışmada daha sonra, filogenetik ağaç kullanılarak belirlenen 5 muhtemel protein dizisini kodlayan *D14* transkriptleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun için ilk olarak, XP_022844030.1 no'lu Sylvestris proteini transkriptom veri bankasında tblastn seçeneğindeki “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmış ve %100 benzerlik gösteren XM_022988262.1 ve XM_022988264.1 no'lu transkriptler bulunmuştur. Aynı yöntem ile XP_022844031.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_022988263.1 no'lu transkript, XP_022884824.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023029056.1 ve XM_023029057.1 no'lu transkriptler, XP_022858475.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023002707.1 no'lu transkript, XP_022870880.1 no'lu protein araştırıldığında, %100 benzerlik gösteren XM_023015112.1 no'lu transkript elde edilmiştir. Böylece toplamda Sylvestris çeşidinde D14'e ait 7 adet muhtemel transkript dizisi bulunmuştur.

Çalışmada daha sonra, bu transkript dizilerini zeytin genomunda kodlayan bölgeler, Sylvestris genom veri tabanında Geneious yazılımındaki blastn seçeneğindeki “Extended Regions with annotations” komutu ile parametre değeri 20 000 olacak şekilde tek tek sorgulanmıştır. Bu sorgulama sonrasında, XM_022988262.1, XM_022988263.1 ve XM_022988264.1 no'lu transkriptlerin 18. zeytin kromozomu üzerindeki NC_036254 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği bulunmuştur (Şekil 4.44).



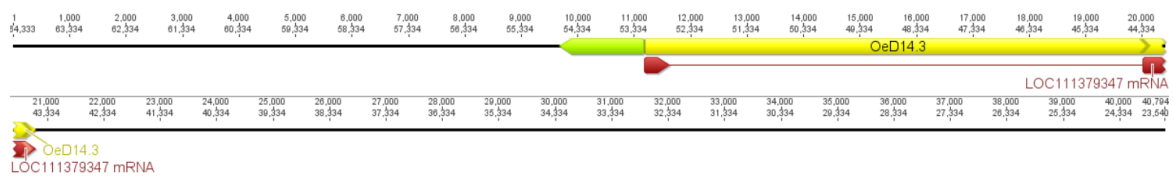
Şekil 4.44. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036254 no'lu genomik bölge

XM_023029056.1 ve XM_023029057.1 no'lu transkriptlerin ise NC_036246 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.45). Bu genomik bölge zeytinde 10 numaralı kromozom üzerindedir.



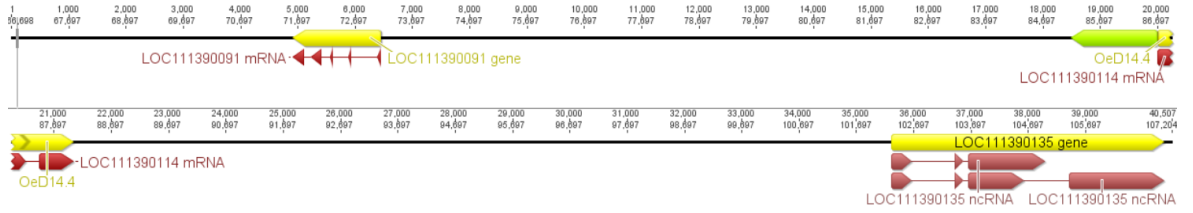
Şekil 4.45. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NC_036246 no'lu genomik bölge

XM_023002707.1 no'lu transkriptin ise NW_019237586 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019237586 no'lu genomik bölge

XM_023015112.1 no'lu transkriptin ise NW_019264872 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.47).



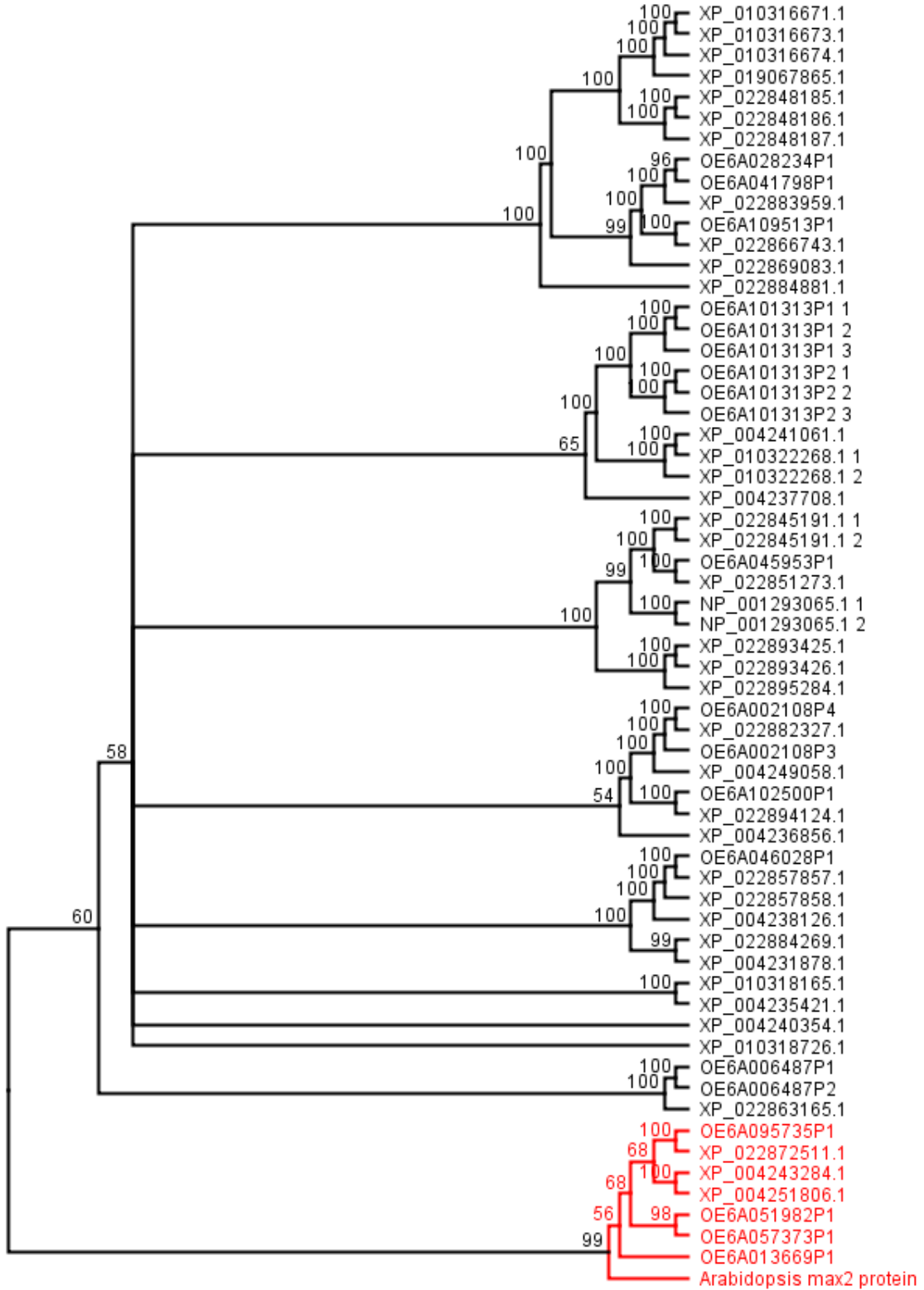
Şekil 4.47. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019264872 no’lu genomik bölge

Çalışmada, *D14* transkriptlerini kodlayan genomik dizilerin 5’ uçları ilk ekzondan önceki 1500 bp uzunluğundaki gen bölgesi, bilgisayara ayrı bir dosya halinde kaydedilmiş (Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4.47, yeşil renkli bölgeler) ve promotor analizleri için kullanılmıştır. Böylece *D14* için Sylvestris çeşidinde toplamda 4 genomik dizi, 7 transkript dizisi ve 5 protein dizisi elde edilmiştir. Bulunan genomik diziler *OeD14.1*, *OeD14.2*, *OeD14.3* ve *OeD14.4* olarak, *OeD14.1* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizileri *OeD14.1a*, *OeD14.1b* ve *OeD14.1c* olarak; *OeD14.2* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizileri *OeD14.2a* ve *OeD14.2b* olarak; *OeD14.3* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizisi *OeD14.3* olarak ve *OeD14.4* no’lu genomik diziden ifade olan transkript dizisi *OeD14.4* olarak adlandırılmıştır.

4.2.6. MAX2

Çalışmada *A. thaliana* MAX2 proteinine ait amino asit dizisi (AT2G42620) TAIR web sayfasından indirilmiş ve referans olarak kullanılmıştır. Referans dizinin benzerleri Geneious yazılımında Sylvestris, Farga ve domates proteinlerinden oluşturulan veri bankasında, Blastp seçeneği “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmıştır. Blastp analizi sonucunda domates ve Farga çeşidi protein dizileri ile yüksek oranlarda gösteren Sylvestris proteinleri belirlenmiş ve ayrı bir dosyaya kaydedilmiştir. Bu proteinlere *A. thaliana* MAX2 protein dizisi de eklenerek toplamda 61 adet protein dizisi ile, Geneious programında varsayılan parametreler ile “Muscle” algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır (multiple alignment) (Şekil 4.48).

Şekil 4.48. MAX2 protein dizilerinin hizalanması

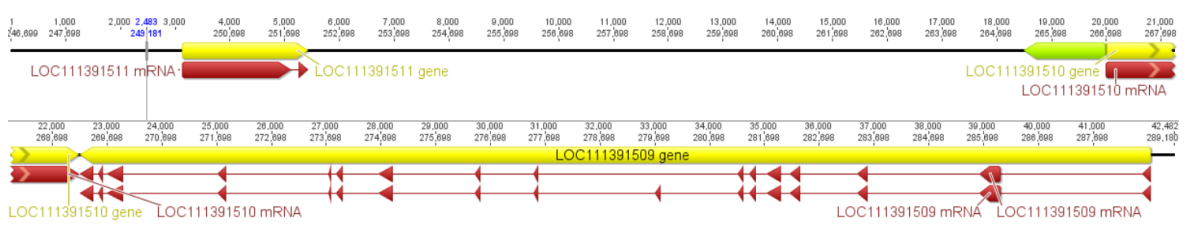


Şekil 4.49. Hizalanan MAX2 protein dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaç, zeytine ait muhtemel MAX2 proteinlerinin bulunduğu grup kırmızı renk ile belirtilmiştir

Bu ağaç üzerinde XP_022872511.1 no'lu Sylvestris çeşidi proteini *A. thaliana* ve domates proteinleri ile aynı dal üzerinde gruplanmış olup, muhtemel MAX2 proteini olarak değerlendirilmek üzere ele alınmıştır.

Çalışmada daha sonra, filogenetik ağaç kullanılarak belirlenen 1 muhtemel protein dizisini kodlayan MAX2 transkriptleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun için XP_022872511.1 no'lu Sylvestris proteini transkriptom veri bankasında tblastn seçeneğindeki “Full sequence with annotations” parametresi kullanılarak araştırılmış ve %100 benzerlik gösteren XM_023016743.1 no'lu transkript elde edilmiştir. Böylece toplamda Sylvestris çeşidinde MAX2'ye ait 1 adet muhtemel transkript dizisi bulunmuştur.

Çalışmada daha sonra, bu transkript dizilerini zeytin genomunda kodlayan bölgeler, Sylvestris genom veri tabanında Geneious yazılımındaki blastn seçeneğindeki “Extended Regions with annotations” komutu ile parametre değeri 20 000 olacak şekilde tek tek sorgulanmıştır. Bu sorgulama sonrasında, XM_023016743.1 no'lu transkriptin NW_019266413 no'lu genomik bölgeden ifade edildiği bulunmuştur (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. Sylvestris çeşidi genomunda bulunan NW_019266413 no'lu genomik bölge

Çalışmada, MAX2 transkriptlerini kodlayan genomik dizilerin 5' uçları ilk ekzondan önceki 1500 bp uzunluğundaki gen bölgesi, bilgisayara ayrı bir dosya halinde kaydedilmiş (Şekil 4.50, yeşil renkli bölge) ve promotor analizleri için kullanılmıştır. Böylece MAX2 için Sylvestris çeşidinde toplamda 1 genomik dizi, 1 transkript dizisi ve 1 protein dizisi elde edilmiştir. Bulunan genomik dizi *OeMAX2* olarak isimlendirilmiştir. *OeMAX2* no'lu genomik diziden ifade olan transkript dizisi ve bu transkriptten kodlanan protein de *OeMAX2* olarak isimlendirilmiştir.

Sylvestris çeşidine ait veri tabanlarında bulunan genomik, transkriptomik veya proteomik kodlara, sonraki biyoinformatik analizlerin takibinin kolaylığı açısından yukarıda belirtildiği şekliyle rakam ve harflerden oluşan kısa etiketler verilmiştir. Etiketlerde ilk önce zeytin bitkisinin tür adı olan *Olea europaea* isminin ilk harfleri olan “Oe” kullanılmıştır. Sonrasında gen adı yazılmış ve ardından da sıralama için rakam ve

harfler kullanılmıştır (örn: XP_022898221.1 yerine OeD27.1a gibi).

Bu çalışmada izlenen biyoinformatik yöntemlerin benzerleri takip edilerek kavak (*Populus trichocarpa*) SL genlerine ait protein ve nükleotid bilgileri araştırılmış ve amino asit dizilimi birbirine benzer iki MAX1 proteini (529 amino asit uzunluğunda) homoloğu (PtrMAX1a ve PtrMAX1b) bulunmuştur (Czarnecki ve ark., 2014). Kavaktaki bu homologların *A. thaliana* MAX1 proteini ile %84-85 benzerlik gösterdiği belirtilmiş ve PtrMAX1a için 3, PtrMAX1b ise 4 transkript varyantı olduğu belirlenmiştir (Czarnecki ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında ise zeytinde OeMAX1.1a, OeMAX1.1b ve OeMAX1.2 isimleri verilen 3 homolog tespit edilmiş ve bu homologların sırasıyla 1, 4 ve 1 transkript varyantı olduğu belirlenmiştir. OeMAX1.1a, OeMAX1.1b ve OeMAX1.2 ise *A. thaliana* MAX1 proteini ile sırasıyla %68,8, %73 ve %69,1 oranında benzerlik göstermektedir. OeMAX1.1a 531 aa, OeMAX1.1b 443 aa ve OeMAX1.2 537 aa'ten oluşmaktadır (Çizelge 4.5).

Kavak SL genlerine ait protein ve nükleotid bilgileri araştırılmış ve amino asit dizilimi birbirine benzer iki MAX2 proteini (701 ve 671 amino asit uzunluğunda) homoloğu (PtrMAX2a ve PtrMAX2b) bulunmuştur (Czarnecki ve ark., 2014). Kavaktaki bu homologların *A. thaliana* MAX2 proteini ile %76-71 benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Czarnecki ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında ise zeytinde OeMAX2 ismi verilen 1 homolog belirlenmiştir. OeMAX2 ise *A. thaliana* MAX2 proteini ile sırasıyla %52,9 oranında benzerlik göstermektedir ve 738 aa'ten oluşmaktadır (Çizelge 4.5).

Kavakta, 1 tane MAX3 proteini (618 amino asit uzunluğunda) homoloğu (PtrMAX3) bulunmuştur (Czarnecki ve ark., 2014). Kavaktaki bu homologun *A. thaliana* MAX3 proteini ile %77 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Czarnecki ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında ise zeytinde OeMAX3a ve OeMAX3b isimleri verilen 2 homolog tespit edilmiştir. OeMAX3a ve OeMAX3b ise *A. thaliana* MAX3 proteini ile sırasıyla %59,3 ve %61,2 oranında benzerlik göstermektedir. OeMAX3a 628 aa ve OeMAX3b 610 aa'ten oluşmaktadır (Çizelge 4.5).

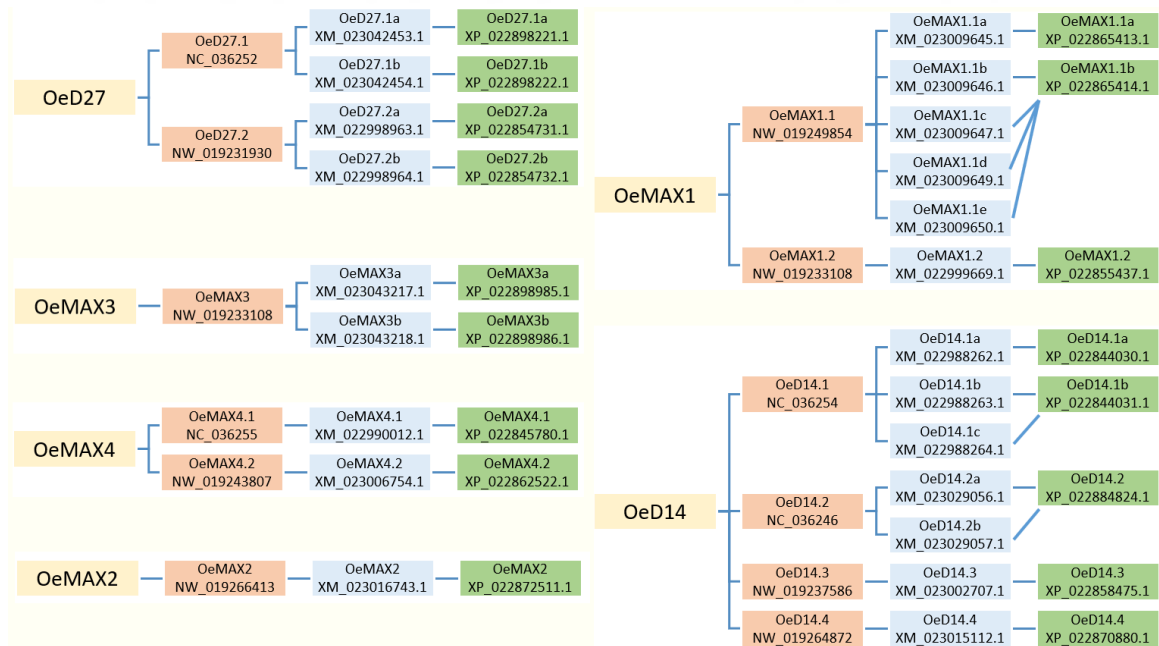
Benzer şekilde kavakta, amino asit dizilimi birbirine benzer iki MAX4 proteini (557 amino asit uzunluğunda) homoloğu (PtrMAX4a ve PtrMAX4b) bulunmuştur (Czarnecki ve ark., 2014). Kavaktaki bu homologların *A. thaliana* MAX4 proteini ile %78 benzerlik gösterdiği belirtilmiş ve PtrMAX4a ve PtrMAX4b için 2'şer transkript varyantı olduğu belirlenmiştir (Czarnecki ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında ise zeytinde OeMAX4.1 ve OeMAX4.2 isimleri verilen 2 homolog tespit edilmiş ve bu homologların 1'er transkript varyantı olduğu belirlenmiştir. OeMAX4.1 ve OeMAX4.2 ise *A. thaliana*

MAX4 proteini ile sırasıyla %62,8 ve %62,6 oranında benzerlik göstermektedir. OeMAX4.1 563 aa, ve OeMAX4.2 562 aa'ten oluşmaktadır (Çizelge 4.5).

Kavak bitkisi ile yapılan bu çalışma, SL yolağının çok yıllık odunsu bitkilerde de olduğunu göstermektedir (Czarnecki ve ark., 2014). Çalışmada ayrıca D14'ün de 2 protein homoloğu bulunmuştur ve bunlar da AtD14'e %89 ve %88 benzemektedirler (Czarnecki ve ark., 2014). Zeytin bitkisinde ise OeD14.1a, OeD14.1b, OeD14.2, OeD14.3, OeD14.4, *A. thaliana* D14 proteini ile aminoasit düzeyinde sırasıyla %77,1, %77,4, %74,4, %74,2 ve %75,6 oranında benzerlik göstermektedir. Ayrıca kavakta D27'nin 1 protein homoloğu bulunmuştur ve AtD27 ile %59 benzerdir (Czarnecki ve ark., 2014). Zeytin bitkisinde ise OeD27.1a, OeD27.1b, OeD27.2a ve OeD27.2b, *A. thaliana* D27 proteini ile aminoasit düzeyinde sırasıyla %42,4, %38, %40,5 ve %41,4 oranında benzerlik göstermektedir.

Kavak bitkisinde yukarıda bahsedilen çalışmadan bağımsız olarak *D14* geni karakterize edilmiştir (Zheng ve ark., 2016). *A. thaliana* D14 dizisi referans olarak kullanılarak kavakta 2 adet homolog bulunmuştur (PtD14a ve PtD14b) ve bunlar AtD14 ile %89 benzerdir (Zheng ve ark., 2016).

SL biyosentezinden, algılanmasından ve iletiminden sorumlu genlerin *Sylvestris* zeytin çeşidindeki biyoinformatik analiz sonuçları Şekil 4.51'de özetlenmiştir.



Şekil 4.51. *Sylvestris* çeşidinde biyoinformatik analizler sonucu elde edilen diziler (Pembe renkli kutucuklar genomik bölgeleri, mavi renkli kutucuklar transkriptleri ve yeşil renkli kutucuklar ise proteinleri temsil etmektedir)

4.2.7. Sylvestris Muhtemel SL Proteinlerinin Özellikleri

Biyoinformatik analizler ile Sylvestris çeşidi SL genlerinin kodladıkları tahmin edilen proteinlerin biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları ExPASy web sayfasında ProtParam algoritması ile (<https://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger ve ark., 2005) hesaplanmıştır. Hücre içi lokalizasyonları ise CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>; Yu ve ark., 2006) ile tahmin edilmiştir. Proteinlerin korunmuş domain analizleri ise Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü'nün Interpro aracı ile (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Mitchell ve ark., 2019) belirlenmiştir (Çizelge 4.5).



Çizelge 4.5. Sylvestris çeşidine ait protein özellikleri

Protein Adı & Kodu	Aminoasit Sayısı / <i>Olea europaea</i> cv. Sylvestris	Aminoasit Sayısı <i>A. thaliana</i> / <i>S. lycopersicum</i>	Moleküler Ağırlık	Teorik pI	Hücre İçi Lokalizasyon	Korunmuş Domainler
>OeMAX1.2-XP_022855437.1	537	522/519	60294.99	9.35	Plazma Membranı Mitokondriyel	Cytochrome P450 superfamily
>OeMAX1.1a-XP_022865413.1	531		60111.86	9.15	Plazma Membranı	Cytochrome P450 superfamily
>OeMAX1.1b-XP_022865414.1	443		50392.05	8.94	Mitokondriyel	Cytochrome P450 superfamily
>OeMAX2-XP_022872511.1	738	693/711	82987.92	5.55	Ekstraselüler Çekirdek	F-box-like domain superfamily
>OeMAX3a-XP_022898985.1	628	618/618	71373.93	8.79	Sitoplazmik	Carotenoid oxygenase
>OeMAX3b-XP_022898986.1	610		69335.46	8.34	Sitoplazmik	Carotenoid oxygenase
>OeMAX4.1-XP_022845780.1	563	570/557	62274.31	7.22	Sitoplazmik Kloroplast	Carotenoid oxygenase
>OeMAX4.2-XP_022862522.1	562		62612.48	6.72	Sitoplazmik Kloroplast	Carotenoid oxygenase
>OeD14.1a-XP_022844030.1	266	267/268	29295.73	5.98	Plazma Membranı	α/β hydrolase fold
>OeD14.1b-XP_022844031.1	266		29295.73	5.98	Plazma Membranı	α/β hydrolase fold
>OeD14.2-XP_022884824.1	266		29179.80	5.97	Plazma Membranı	α/β hydrolase fold
>OeD14.3-XP_022858475.1	290		32141.03	5.80	Plazma Membranı	α/β hydrolase fold
>OeD14.4-XP_022870880.1	266		29345.75	6.11	Plazma Membranı	α/β hydrolase fold
>OeD27.1a-XP_022898221.1	253	264/265	28692.25	8.84	Ekstraselüler Çekirdek	Beta-carotene isomerase D27-like
>OeD27.2a-XP_022854731.1	256		29226.87	8.90	Plazma Membranı	Beta-carotene isomerase D27-like
>OeD27.1b-XP_022898222.1	222		25173.28	9.31	Ekstraselüler Çekirdek	Beta-carotene isomerase D27-like
>OeD27.2b-XP_022854732.1	253		28904.44	9.05	Plazma Membranı Çekirdek	Beta-carotene isomerase D27-like

Protein analiz sonuçlarına göre zeytine ait proteinlerin aminoasit sayıları *A. thaliana* ve domates (*S. lycopersicum*) gibi bitkilere benzerdir. Ayrıca proteinlerin korunmuş domainleri de diğer bitkilerde bulunan korunmuş domainler ile aynıdır.

4.2.8. Promotor Analizleri

Sylvestris çeşidinde biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen her genomik dizi için -1500 bç'lik bölgeler promotor analizleri için ayrı dosyalarda kaydedilmiştir. Bu bölgeler kullanılarak, promotor bölgeleri regülatör motifleri, PlantCARE (Plant Cis-Actin Regulatory Element; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>; Lescot ve ark., 2002) aracı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.52).

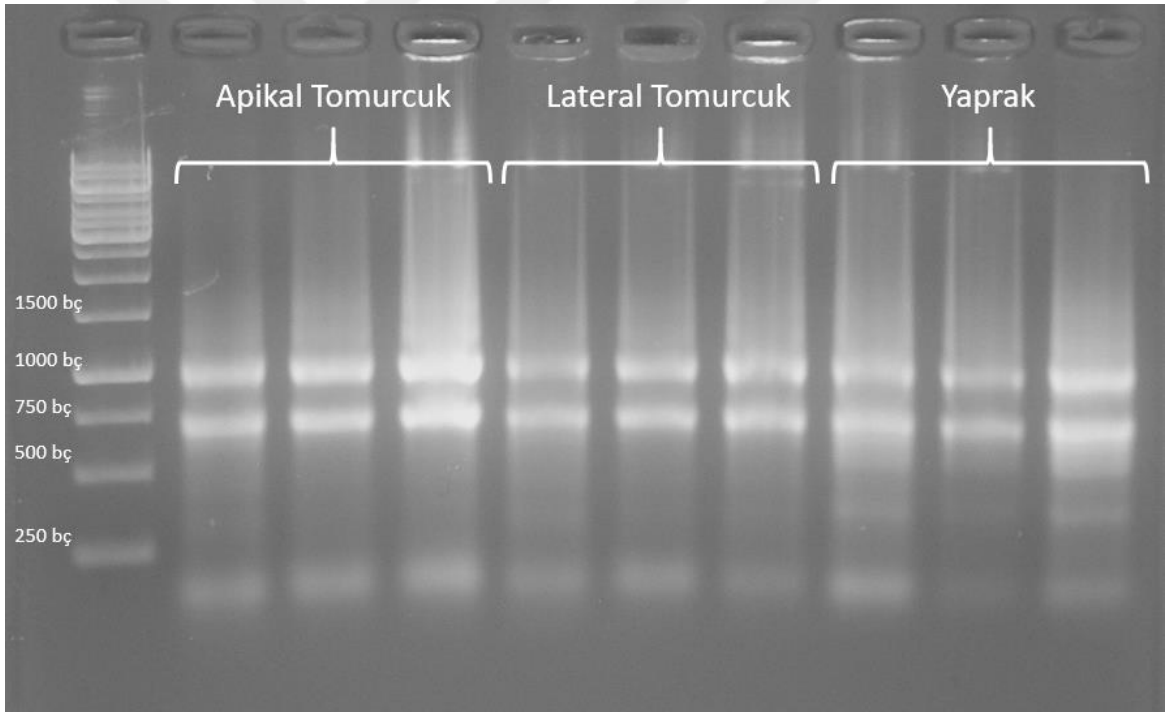
	FUNCTIONS	MAX1.1	MAX1.2	MAX2	MAX3	MAX4.1	MAX4.2	D14.1a	D14.1b	D14.1c	D14.2a	D14.2b	D14.3	D14.4	D27.1	D27.2
AAAC-motif	light responsive element															1
AAGAA-motif		1		1	1					1	1	1	1	1		1
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1	1
ABRE3a						1					1	1	1			1
ABRE4	ABA (abscisic acid) response					1					1	1	1			1
ACA-motif	part of gapA in (gapA-CMA1) involved with light responsiveness					1										
ACE	cis-acting element involved in light responsiveness							1						1		1
AE-box	part of a module for light response	1														
AP-1	DNA sequence to which AP-1 transcription factors are able to bind				1										1	1
ARE	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	1	1	1	1	1	1				1	1	1		1	1
AT-rich element	binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)	1							1	1						
ATCT-motif	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness		1					1								
AT~ABRE																1
AT~TATA-box	core promotor element		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1			1
AT1-motif	part of a light responsive module														1	
AuxRR-core	cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness														1	
Box 4	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1			1	1
Box II	part of a light responsive element		1													1
Box III	protein binding site															1
CAAT-box	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT-box	cis-acting regulatory element related to meristem expression	1	1	1												1
CCAAT-box	MYBHv1 binding site	1														
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	1	1		1	1		1	1						1	1
ERE	ethylene-responsive element	1	1		1			1	1	1				1	1	1
F-box					1											1
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness		1	1	1			1	1		1	1			1	1
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	1	1	1	1	1	1				1	1	1			1
GA-motif	part of a light responsive element					1	1				1	1	1	1		
GARE-motif	gibberellin-responsive element	1								1						
GATA-motif	part of a light responsive element	1		1		1		1					1			
GC-motif	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility															1
GTGGC-motif	part of a light responsive element									1						
GT1-motif	light responsive element			1			1	1						1		1
HD-Zip 1	element involved in differentiation of the palisade mesophyll cells	1														
I-box	part of a light responsive element			1												1
LS7	part of a light responsive element			1												
LTR	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness	1									1	1		1		
MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility	1				1	1	1			1	1		1	1	
MBSI	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation			1												
MRE	MYB binding site involved in light responsiveness						1			1			1	1		1
MSA-like	cis-acting element involved in cell cycle regulation				1											
MYB	myb recognition motif	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MYB recognition site		1														
MYB-like sequence	possible MYB binding region				1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	
MYC	myc recognition sequence	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Myb	myb recognition motif	1		1		1	1	1			1	1		1	1	
Myb-binding site		1	1		1		1				1		1		1	1
Myc	myc recognition sequence										1	1			1	1
O2-site	cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation				1											
Pc-CMA2a	part of a light responsive element															1
P-box	gibberellin-responsive element				1	1		1								
RY-element	cis-acting regulatory element involved in seed-specific regulation						1						1			
STRE	stress response element	1		1		1	1	1							1	1
TATA	core promotor element	1			1						1	1	1	1		
TATA-box	core promoter element around -30 of transcription start	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TATC-box	cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness													1		
TC-rich repeats	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness				1									1		
TCA	auxin-responsive element	1				1		1								
TCA-element	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness	1	1	1		1										
TCCC-motif	part of a light responsive element	1		1												
TCT-motif	part of a light responsive element	1	1	1							1	1	1	1		
TGA-element	auxin-responsive element				1		1					1				
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	1	1		1	1		1	1						1	1
W box	elicitation; wounding and pathogen responsiveness			1				1	1	1				1		1
WRE3	wound inducibility (third region)	1	1		1		1		1	1						
WUN-motif	wound responsive element			1				1	1	1						
as-1	oxidative stress-responsive element	1	1		1	1		1	1						1	1
box S	elicitation; wounding and pathogen responsiveness								1	1						
chs-CMA1a	part of a light responsive element			1		1		1	1	1	1	1				
circadian	cis-acting regulatory element involved in circadian control															1

Şekil 4.52. Promotor analizleri sonucu tespit edilen cis-acting elementler

Sylvestris çeşidi promotor analizleri sonucunda toplamda 70 farklı cis-acting element tespit edilmiştir. Bunlardan 21 tanesi ışık yanıtı ile ilgili motiflerdir. 12 tanesi absisik asit, giberellin, oksin, jasmonik asit, etilen, salisilik asit gibi hormonların yanıtı ile ilgili motiflerdir. Geriye kalan 9 tanesi ise kuraklık, sıcaklık, oksijen, yaralanma, patojen varlığı gibi çevresel stres koşullarına yanıt ile ilgili motiflerdir.

4.3. Gen Anlatımı Çalışmaları

Zeytin Ayvalık çeşidinde kök, apikal tomurcuk, lateral tomurcuk ve yaprak dokularında, SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu genlerin (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4*, *D14* ve *D27*) anlatımları belirlenmiştir. Çalışmada bu dokulara ait 3'er biyolojik tekrar kullanılmıştır. Bunun için öncelikle bu dokulardan RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.53).



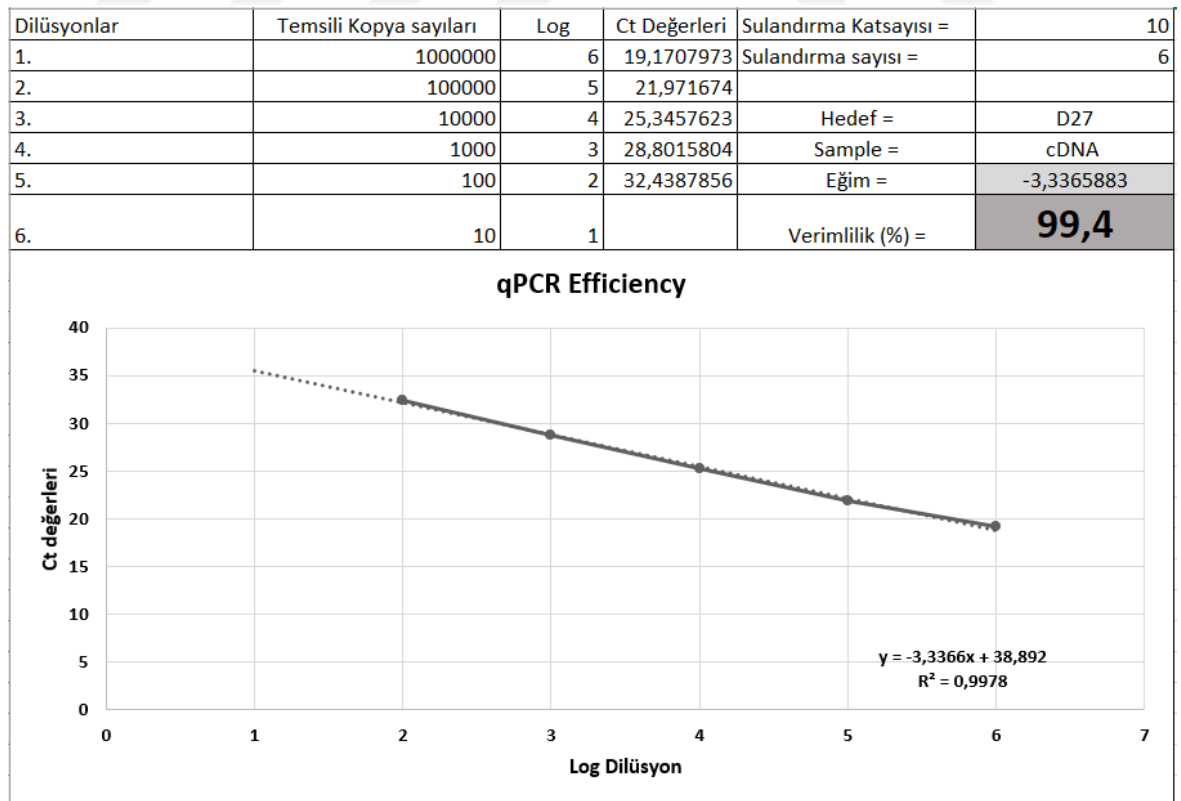
Şekil 4.53. qPZR çalışmalarında kullanılan RNA örnekleri

qPZR çalışmalarında, RACE çalışmaları için köklerden izole edilen RNA'lar kullanılmıştır. Bu RNA'lardan elde edilen cDNA'lar ile ilk olarak primerlerin (Çizelge 4.6) verimlilikleri belirlenmiştir. qPZR çalışmalarında her bir döngüde ürünün 2 katına çıkması, seçilen primerlerin %100 verimlilikte çalıştığını gösterir.(Dorak, 2006).

Çizelge 4.6. qPZR çalışmalarında kullanılan primerler

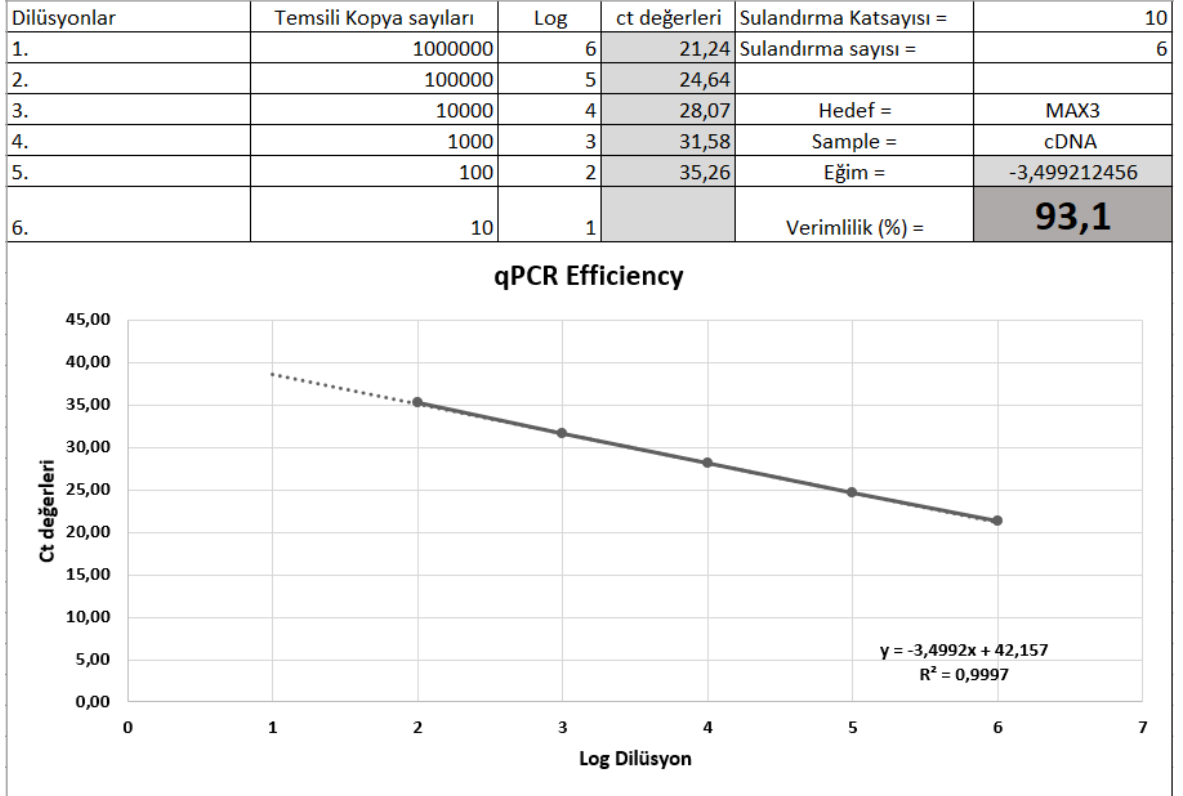
	Forward Primer (5'3')	Reverse Primer (5'-3')
D27	TTCAAGCTTCAACAGGATTCAGAAGCA	CTGCTGCCCAGTTGGAGTAAACA
MAX3	AAGCTCCTTCTCAGTTATGGGTACTCC	CGCTCCGCCAATCATATCCAAACAT
MAX4	CAGGAAAGTTGGTCCCGAACGATAG	CACTCAGCCACAGTGGTATTTCTCC
MAX1	AGGATCTTTAGCTAGGACTCCAAGGG	CACAGTTTCTCCATTAGTTGCAAGGGA
D14	CAGTGGCTGTGGCTCATTCTTGT	CTCTTAGCACGCTTTGTCCCATGTT
MAX2	GCCGTCACCTTCCCTTACGCTCTA	CCTCACCAGCTTCACTTGCTTCAAAT

Çalışmada, her gene özgü primer çifti için seri sulandırılmış cDNA kalıpları kullanılarak qPZR yapılmış ve sonrasında Ct değerleri ve temsili kopya sayılarının logaritmik değerleri kullanılarak Excel yazılımında standart eğriler çizilmiştir.



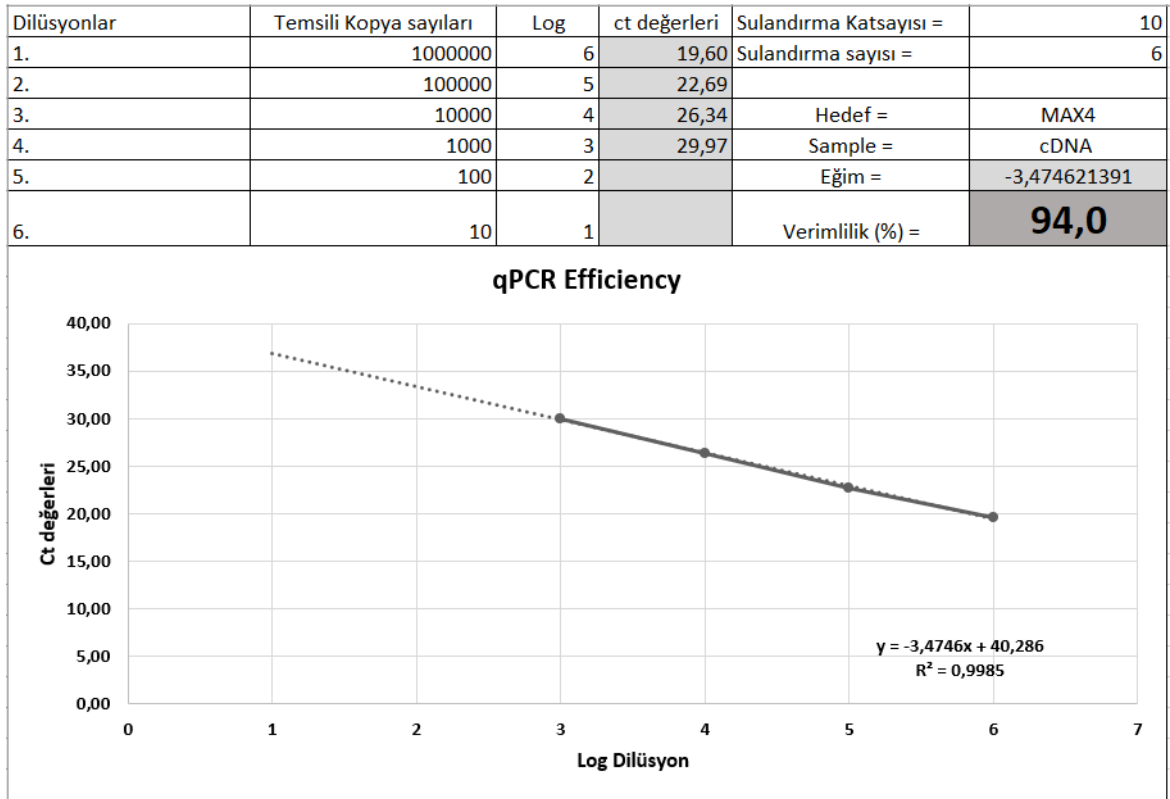
Şekil 4.54. D27 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi

D27 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9978 olarak hesaplanmıştır. Buna göre *D27* geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,3365883'tür. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %99,4 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.54). Böylece bu primer çiftinin *D27* gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.



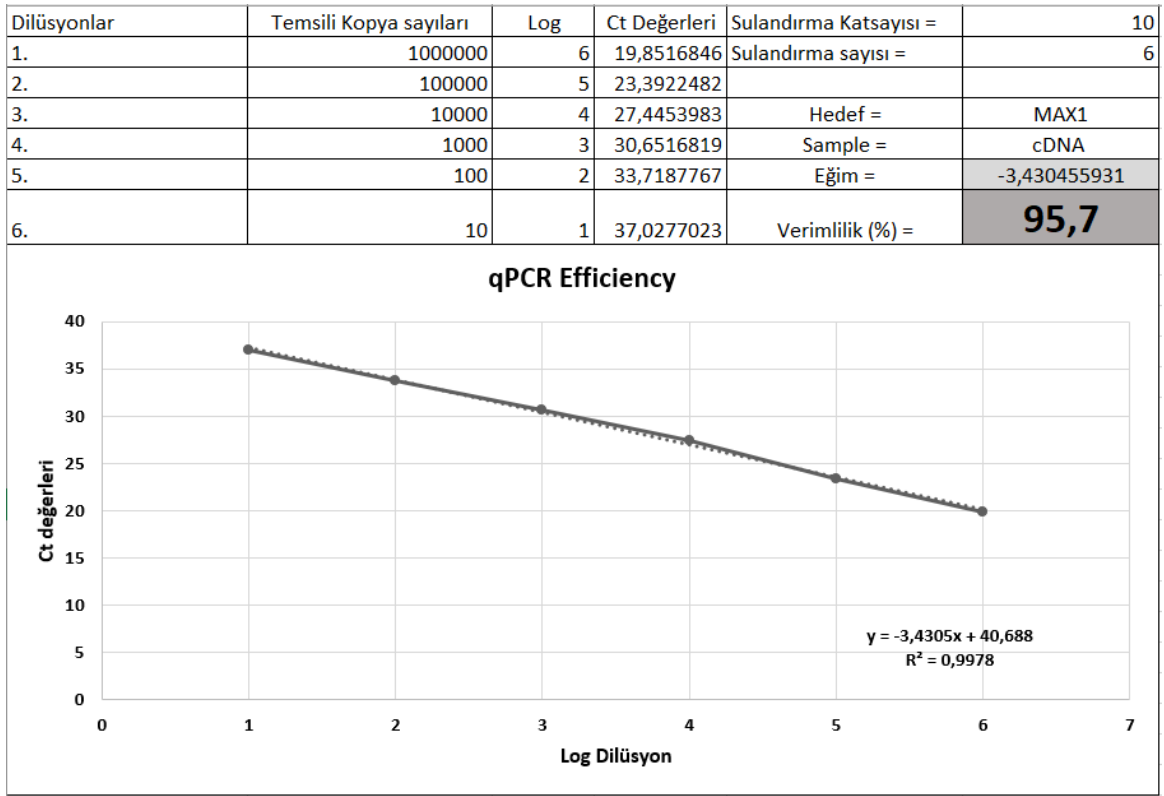
Şekil 4.55. *MAX3* genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi

MAX3 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9997 olarak hesaplanmıştır. Buna göre *MAX3* geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,499212456'dır. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %93,1 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.55). Böylece bu primer çiftinin *MAX3* gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.



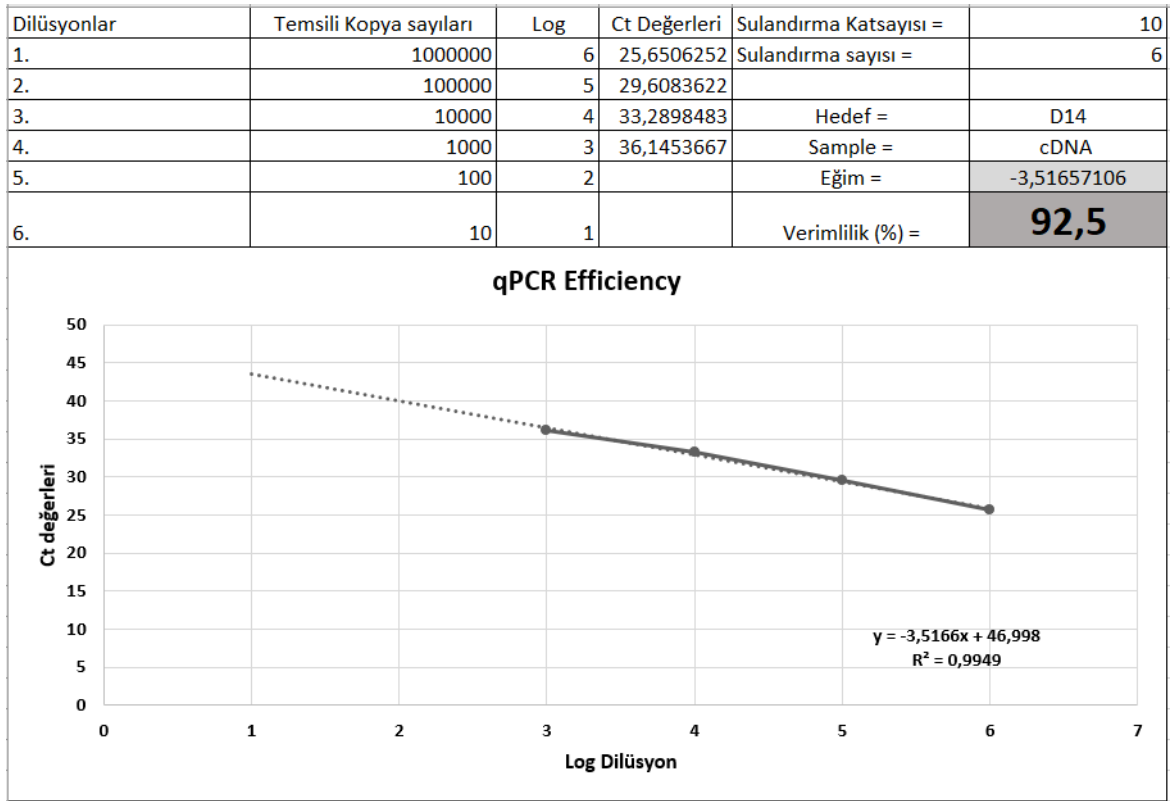
Şekil 4.56. MAX4 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi

MAX4 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9985 olarak hesaplanmıştır. Buna göre MAX4 geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,474621391'dir. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %94 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.56). Böylece bu primer çiftinin MAX4 gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.



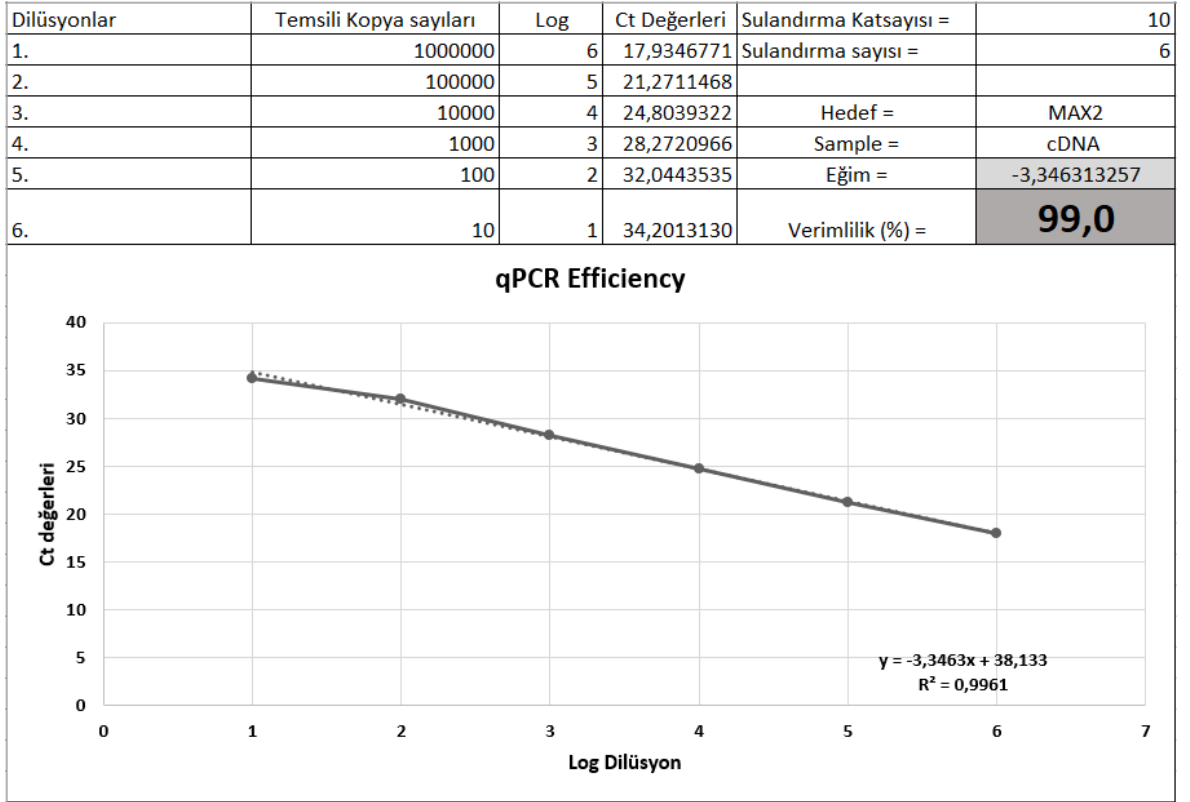
Şekil 4.57. *MAX1* genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi

MAX1 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9978 olarak hesaplanmıştır. Buna göre *MAX1* geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,430455931'dir. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %95,7 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.57). Böylece bu primer çiftinin *MAX1* gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.58. *D14* genine ait qPCR primer çiftinin standart eğrisi

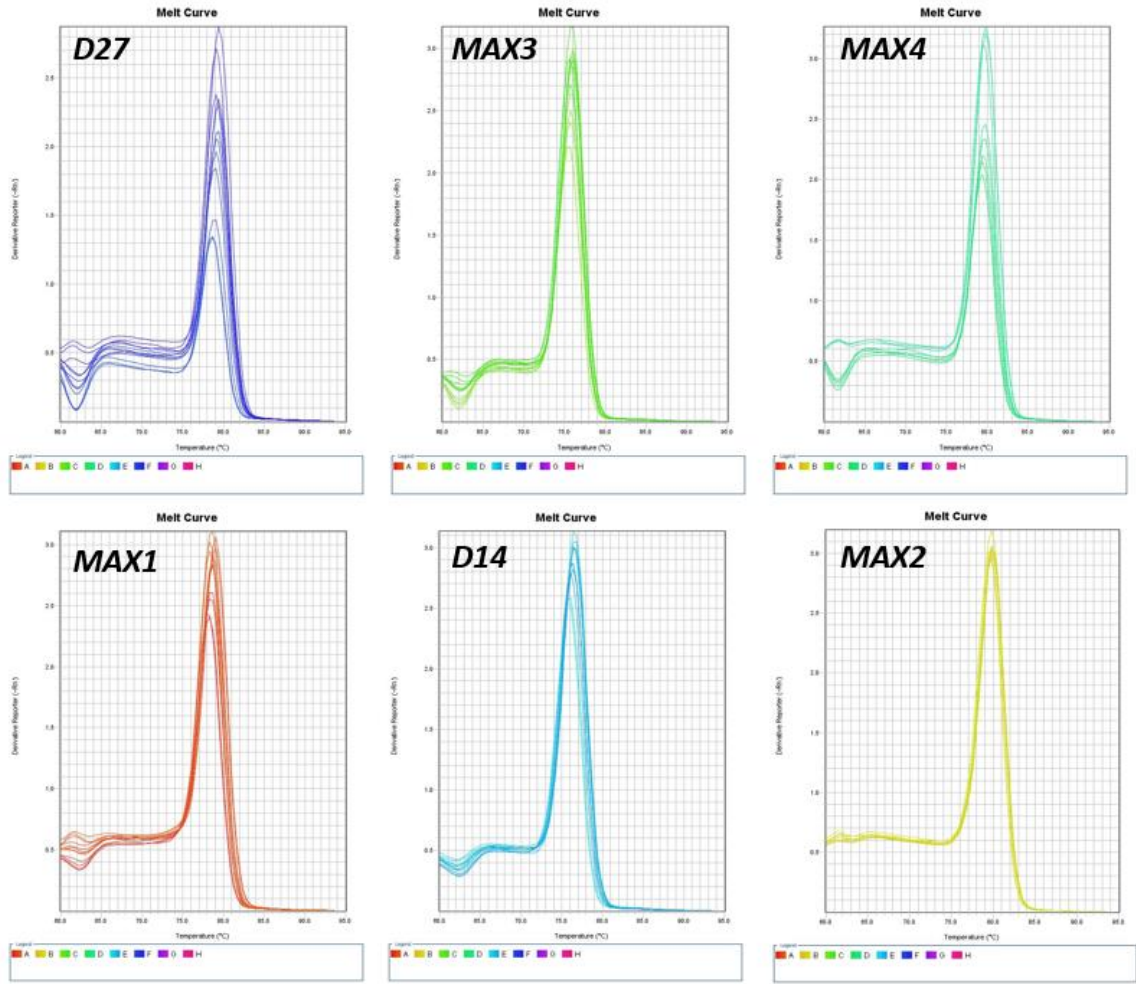
D14 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9949 olarak hesaplanmıştır. Buna göre *D14* geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,51657106'dır. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %92,5 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.58). Böylece bu primer çiftinin *D14* gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.59. MAX2 genine ait qPZR primer çiftinin standart eğrisi

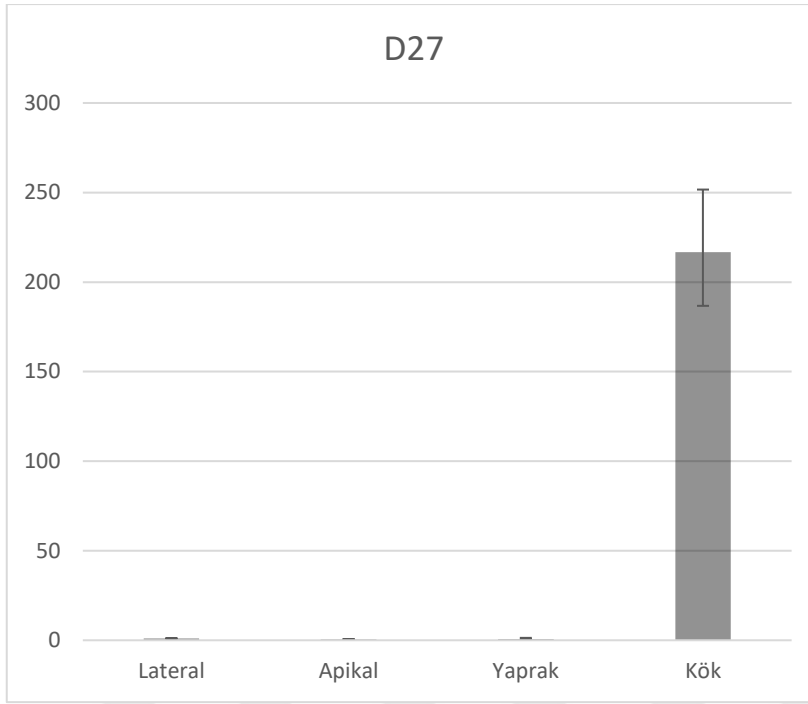
MAX2 geninin primer çiftine ait standart eğride R^2 değeri 0,9961 olarak hesaplanmıştır. Buna göre MAX2 geni primer çifti için çizilen standart eğri doğrusaldır. Bu eğrinin eğimi -3,44631357'dir. Eğim değeri kullanılarak verimlilik hesaplandığı zaman, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmalarının %99 verimlilik ile çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.59). Böylece bu primer çiftinin MAX2 gen anlatım çalışmalarında kullanmak için güvenilir olduğu anlaşılmıştır.

Primer verimliliklerinin belirlenmesinden sonra tüm reaksiyonlara ait erime eğrisi sonuçları incelenmiş ve reaksiyonlarda bu primerlerin tek bir ürün çoğalttıkları doğrulanmıştır (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. SL primerlerinin erime eğrisi analizleri

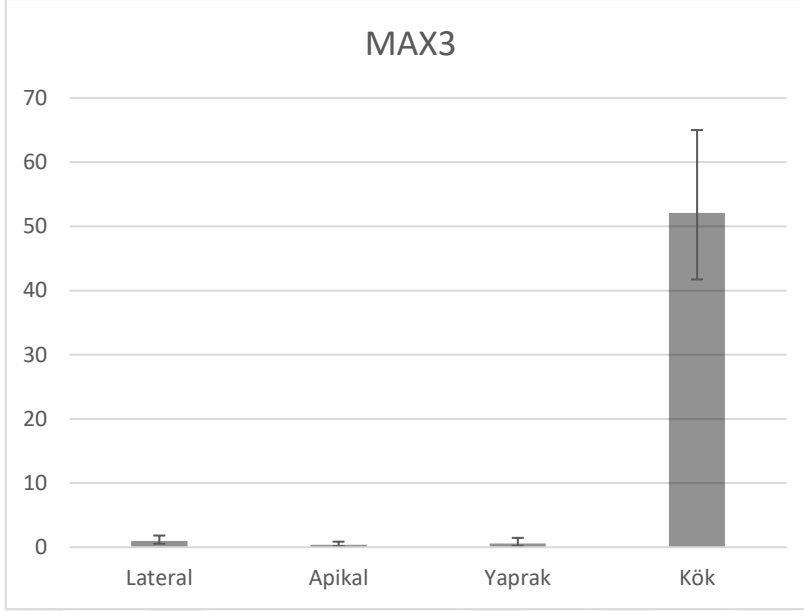
Erime eğrisi analizleri ve verimlilik sonuçlarına göre, SL genleri için seçilen tüm primerlerin qPZR çalışmalarında kullanılabilecek durumda olduğu belirlenmiştir. Çalışmada bu aşamadan sonra Ayvalık zeytin çeşidi kök, yaprak, lateral tomurcuk ve apikal tomurcuk dokularında SL genlerinin anlatımları incelenmiştir



Şekil 4.61. *D27* qPZR anlatım sonucu

SL biyosentezinin ilk basamağını gerçekleştiren *D27*'nin anlatım miktarının en fazla köklerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.61). *D27*'nin kök dokusundaki anlatım miktarı lateral tomurcuk dokusundaki anlatım miktarının 216 katıdır.

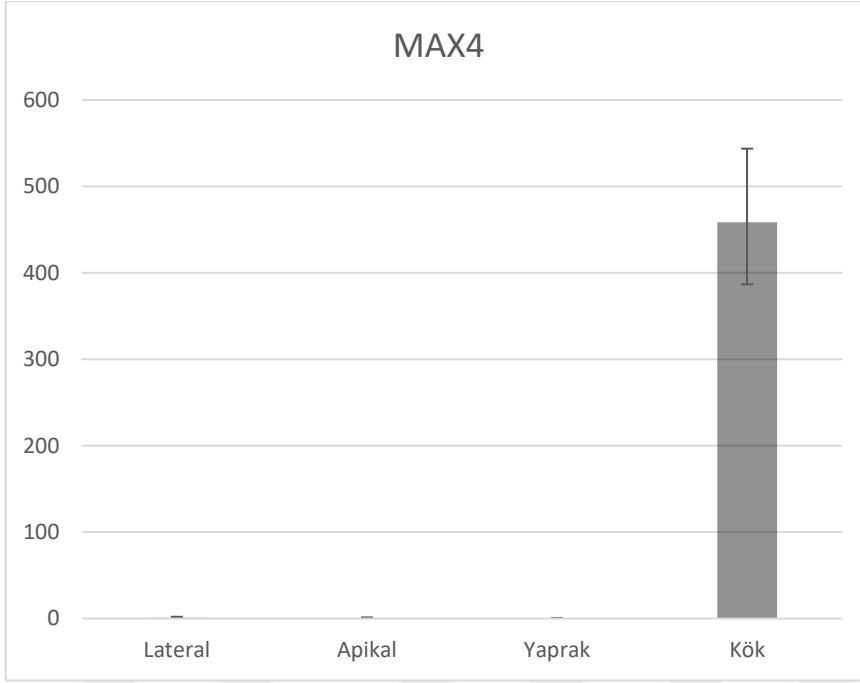
Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda *D27* geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise köklerde daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. *D27* gen ifadesinin krizantem lateral tomurcuklarında kök ve yapraklara oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Wen ve ark., 2016). Çeltikte yapılan bir çalışmada ise, *D27* geninin kök ve yapraklara oranla lateral tomurcukta daha fazla ifade olduğu qPZR ile gösterilmiş ama in situ hibridizasyon çalışmaları kök dokusunda da bu genin anlatımının yüksek olduğunu işaret etmiştir (Lin ve ark., 2009). *Medicago truncatula* bitkisinde ise *D27* gen ifadesinin köklerde yapraklara oranla daha fazla ifade olduğu anlaşılmıştır (Liu ve ark., 2011). Farklı bitkilerle yapılan bu çalışmalar ve bu tez çalışmasının sonuçları, SL biyosentezinde görev alan *D27* geninin temel olarak köklerde ifade olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.62. MAX3 qPZR anlatım sonucu

SL biyosentezinde görev alan genlerden biri olan MAX3 gen anlatımının da, en fazla kök dokusunda olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.62). MAX3'ün kök dokusundaki anlatım miktarı lateral tomurcuk dokusundaki anlatım miktarının 52 katıdır.

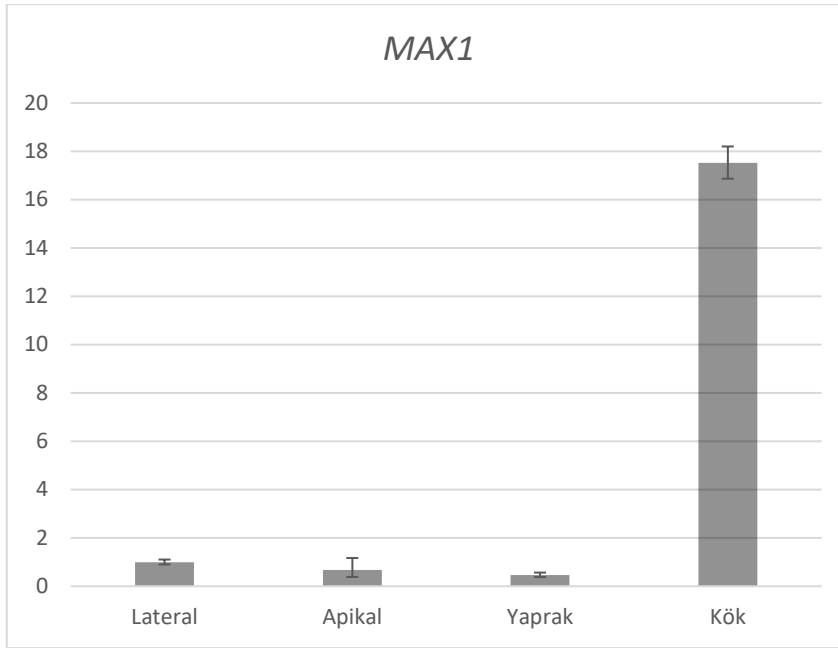
Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda MAX3 geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise köklerde daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Çiçek, gövde, yaprak, kök gibi *A. thaliana* dokularında MAX3 gen ifadesi araştırıldığında anlatımın en fazla kök dokusunda olduğu bildirilmiştir (Booker ve ark., 2004). MAX3 ifadesinin aynı şekilde bezelyede (Johnson ve ark., 2006), petunyada (Drummond ve ark., 2009), yine *A. thaliana* bitkisinde (Mashiguchi ve ark., 2009), domateste (Vogel ve ark., 2010) ve kavakta (Czarnecki ve ark., 2014) yaprak dokusuna oranla kök dokularında daha fazla anlatıma uğradığı görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, diğer birçok bitki ile yapılan anlatım çalışmaları ile paralellik göstermekte ve MAX3 geninin temel olarak köklerde ifade olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.63. MAX4 qPCR anlatım sonucu

SL biyosentezinde görev alan MAX4 geninin anlatım miktarı yine en fazla kök dokusunda gözlenmiştir (Şekil 4.63). MAX4'ün kök dokusundaki anlatım miktarı lateral tomurcuk dokusundaki anlatım miktarının 458 katıdır.

Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda MAX4 geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise köklerde daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. MAX4 gen ifadesinin kök dokusunda olduğu *A. thaliana* (Bainbridge ve ark., 2005) ve çeltik (Arite ve ark., 2007) bitkilerinde de gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, *A. thaliana* bitkisinde (Sorefan ve ark., 2003; Auldrige ve ark., 2006; Mashiguchi ve ark., 2009), bezelyede (Foo ve ark., 2005), petunyada (Snowden ve ark., 2005; Drummond ve ark., 2009), domateste (Kohlen ve ark., 2012) ve kavakta Czarnecki ve ark., 2014) çalışılan bütün dokular içerisinde MAX4 ifadesi en çok kök dokusunda bulunmuştur. Krizantemde ise yine MAX4 ifadesi kök dokusunda yaprak dokusuna oranla daha yüksektir (Liang ve ark., 2010). Zeytin bitkisi için elde edilen sonuçlar, yapılmış olan bu çalışmalar ile uyumludur. MAX3 ve MAX4 anlatımları ayrıca yosun bitkilerinde de tespit edilmiştir (Proust ve ark., 2011). Bu şekilde benzer bir anlatım modeli SL biyosentezinin kara bitkilerinde korunmuş bir mekanizma ile gerçekleştiğine işaret etmektedir (Proust ve ark., 2011; Kohlen ve ark., 2012).

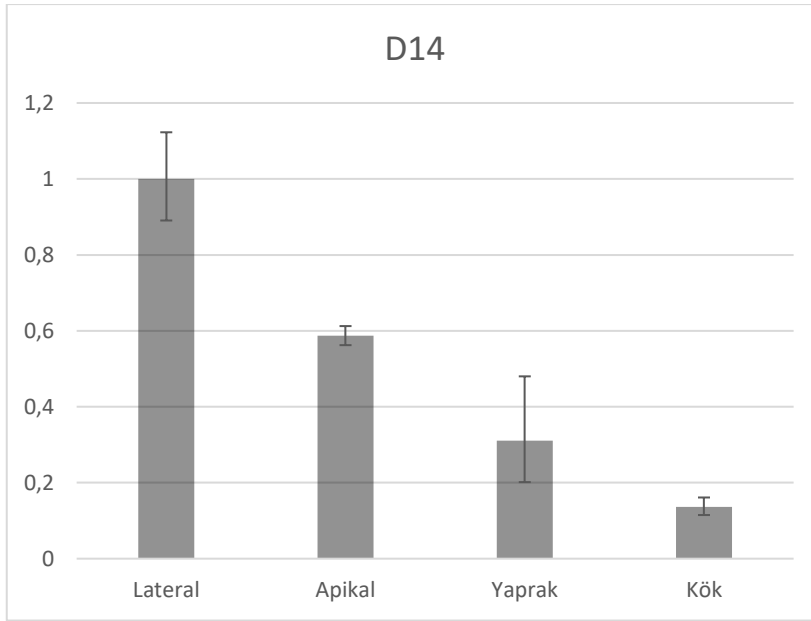


Şekil 4.64. *MAX1* qPZR anlatım sonucu

SL biyosentezinde görev alan *MAX1* geninin anlatım miktarı da en fazla kök dokusunda gözlenmiştir (Şekil 4.64). *MAX1*'in kök dokusundaki anlatım miktarı lateral tomurcuk dokusundaki anlatım miktarının 17,5 katıdır.

Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda *MAX1* geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise köklerde daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. *MAX1* geni *A. thaliana* bitkisinde (Mashiguchi ve ark., 2009) ve kavakta (Czarnecki ve ark., 2014) test edilen dokular içerisinde en çok kök dokusunda anlatıma uğramaktadır. *A. thaliana* bitkisinde ayrıca *MAX1* transkriptlerine hem kökte hem de vasküler dokularda rastlanmış ve bunun ksilem vasıtasıyla mobil bir sinyalin iletimi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Booker ve ark., 2005). Bu çalışma ile zeytin bitkisinde de önceki çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiş ve *MAX1* ifadesine en çok kök dokusunda rastlanmıştır.

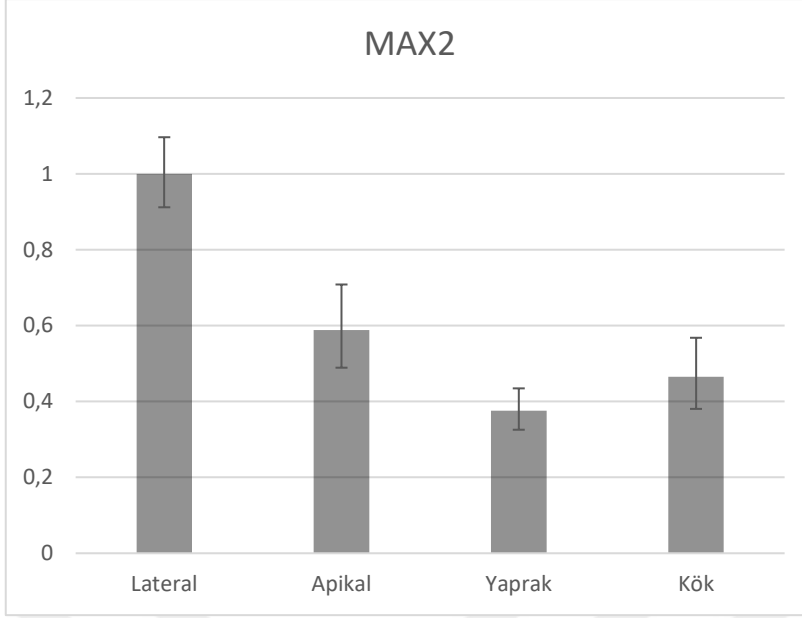
Bu sonuçlara göre SL biyosentezinin diğer pek çok bitkide olduğu gibi, zeytin bitkisinde de esas olarak kök dokusunda sentezlendiği gözlenmiştir (Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1996; Beveridge ve ark., 1997; Beveridge, 2000; Foo ve ark., 2001; Morris ve ark., 2001; Turnbull ve ark., 2002; Booker ve ark., 2004; Booker ve ark., 2005).



Şekil 4.65. *D14* qPZR anlatım sonucu

SL algılanmasında görev yapan *D14*'ün anlatım miktarı zeytin bitkisi Ayvalık çeşidinde en fazla lateral tomurcuk dokusunda gözlenmiştir (Şekil 4.65).

Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda *D14* geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise lateral tomurcuklarda daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Çeltik bitkisi ve kavak ile yapılan çalışmalarda *D14* gen anlatımının yaprak dokusunda kök dokusuna oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Arite ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2016). Petunyada ise en çok *D14* ifadesi belirlenen dokular sırası ile yaprak, lateral tomurcuk ve köktür (Hamiaux ve ark., 2012). Araştırmacılar bu sonucun *D14*'ün tomurcuk dormansisini devam ettirdiğinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir (Hamiaux ve ark., 2012). Zeytin bitkisinde elde edilen sonuçlara göre de, SL algılanmasından sorumlu *D14* geninin en çok lateral tomurcuk dokusunda ifade olması, SL'ın zeytinde lateral tomurcuk dormansisini devam ettirerek gövde dallanmasını kontrol ediyor olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.66. MAX2 qPZR anlatım sonucu

SL sinyal iletiminde görev yapan MAX2'nin anlatım miktarı zeytin bitkisi Ayvalık çeşidinde en fazla lateral tomurcuk dokusunda gözlenmiştir (Şekil 4.66).

Ayvalık çeşidinde yapılan gen anlatım çalışmalarında, tüm dokularda MAX2 geninin ifade olduğu belirlenmiş, dokular kendi aralarında karşılaştırıldığında ise lateral tomurcuklarda daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. *A. thaliana* bitkisinde test edilen kök, yaprak, gövde, çiçek, tohum gibi tüm dokularda MAX2'nin anlatıma uğradığı belirlenmiştir (Stirnberg ve ark., 2007; Mashiguchi ve ark., 2009). Bezelye bitkisinde MAX2 anlatımı yaprak sapı dibindeki yaprakçıklarda kök dokularından daha fazladır (Johnson ve ark., 2006). Krizantem bitkisinde ise en çok MAX2 ifadesi sırası ile lateral tomurcuk, yaprak ve kök dokularında belirlenmiştir (Dong ve ark., 2013). Benzer şekilde kavakta da MAX2 kök dokusundan çok yaprak dokusunda anlatıma uğramıştır (Czarnecki ve ark., 2014). Zeytin bitkisinde elde edilen sonuçlar da bu sonuçlar ile benzerdir. MAX2'nin bitki gövdesinde görev yaptığı ve dallanmayı inhibisyonunda görev aldığı *A. thaliana* bitkisinde gösterilmiştir (Booker ve ark., 2005). Bu çalışma ile elde edilen sonuçlara göre, SL sinyal iletiminden sorumlu olan MAX2'nin en çok lateral tomurcuk dokusunda ifade olması, SL'in zeytinde gövde dallanmasını kontrol ediyor olabileceğine işaret etmektedir.

4.4. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Doku Kültürü Çalışmaları

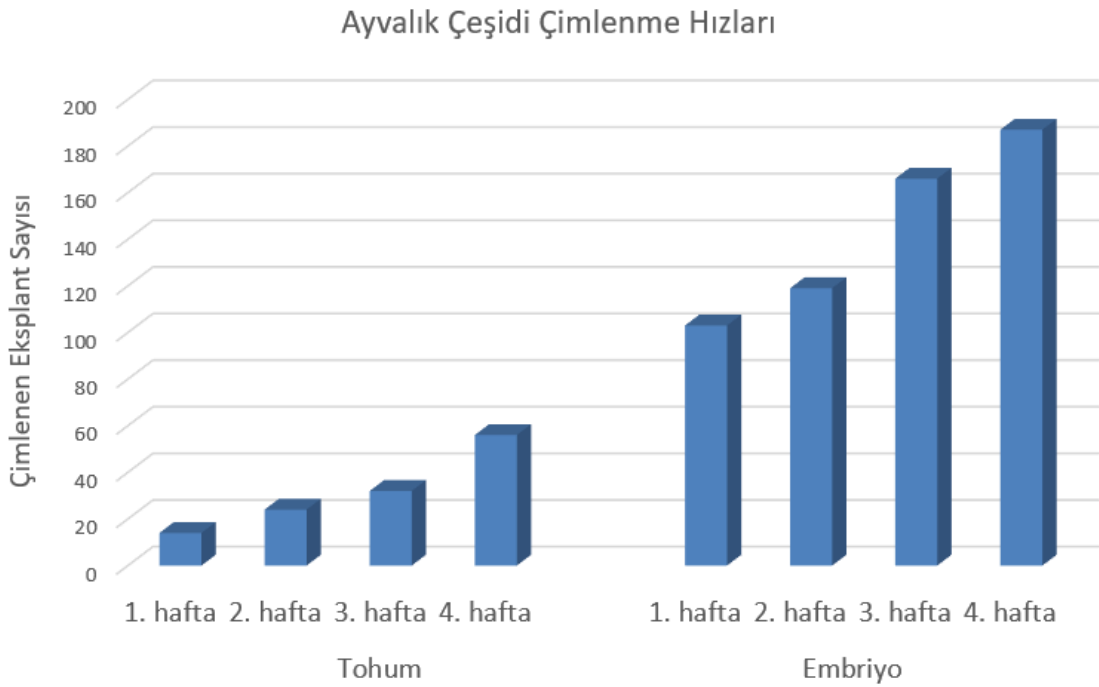
Bu tez çalışmasında doku kültürü şartlarında Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohum ve embriyoların SL analogu (*rac*-GR24) ve inhibitörü (TIS108) varlığında öncelikle

çimlenme oranları ve kök boyları, daha sonra da dış ortama alıştırılan bu bitkilerin oluşturdukları yan dal sayıları ve internod mesafeleri belirlenmiştir. Böylece SL'ın *in vitro* koşullar altında zeytin bitkisi üzerine etkileri tespit edilmiştir.

4.4.1. Çimlenme Oranları ve Kök Boyları

Çalışmada öncelikle Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohum ve endospermden ayrılan embriyolar, içerisine farklı miktarlarda (1, 5 ve 10 μ M) *rac*-GR24 ve TIS108 eklenmiş ve eklenmemiş (kontrol) besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Her bir grup için uygulamalar 50'şer adet eksplant ile gerçekleştirilmiştir.

Ayvalık Çeşidi Çimlenme Oranı ve Kök Boyları: Çalışmada Ayvalık çeşidine ait tohum ve embriyoların çimlenmeleri kültüre alınmalarını takip eden 4 hafta boyunca gözlenmiş ve öncelikle aralarındaki çimlenme hızı farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.67). Çimlenme hızlarının belirlenmesinde tüm eksplantlar sayılmış, doz veya uygulama ayrımı gözletilmemiştir.



Şekil 4.67. Ayvalık tohum ve embriyolarında çimlenme hızları

Dört hafta boyunca elde edilen verilere göre endosperm dokusu çıkarılmadan kültüre alınan tohumların çimlenme hızı, endosperm dokusu çıkarıldıktan sonra kültüre alınan çıplak embriyolara oranla daha azdır. 4. haftanın sonunda 350 tohumun yalnızca 56 tanesi

çimlenirken, endosperm dokusundan ayrılmış olan 350 embriyodan 187 tanesi çimlenmiştir.

SL'in, çeşitli parazit bitki tohumlarının çimlenme uyarıcısı olarak görev yaptıklarına dair bazı çalışmalar mevcuttur;

- Kırmızı yonca kök eksüдалarı *O. minör* ve *O. ramosa* tohumlarına (Yokota ve ark., 1998; Xie ve ark., 2008a; Kim ve ark., 2010),

- Çeltik kök eksüдалarı *Striga hermonthica* (Umehara ve ark., 2008; Ito ve ark., 2011) ve *O. minör* (Lin ve ark., 2009; Xie ve ark., 2013) tohumlarına,

- Domates kök eksüдалarı *Phelipanche ramosa* (Kohlen ve ark., 2012) ve *O. ramosa* (Lopez-Raez ve ark., 2008, 2010) tohumlarına,

- Tütün kök eksüдалarı *O. minor* ve *P. ramosa* (Xie ve ark., 2007, 2013) tohumlarına,

- Mısır kök eksüдалarı *S. hermonthica* (Matusova ve ark., 2005; Charnikhova ve ark., 2017) ve *Striga asiatica* (Siame ve ark., 1993) tohumlarına,

- Börölce kök eksüдалarı *S. hermonthica* ve *Orobancha crenata* (Matusova ve ark., 2005) tohumlarına,

- Salatalık kök eksüдалarı *O. minor* and *P. ramosa* (Khetkam ve ark., 2014) tohumlarına,

- Sorgum kök eksüдалarı *S. asiatica*, *S. hermonthica*, *Striga gesnerioides*, *Orobancha aegyptiaca* and *Alectra vogelii* (Hauck ve ark., 1992; Siame ve ark., 1993) tohumlarına,

- Darı kök eksüдалarı *S. asiatica* (Siame ve ark., 1993) tohumlarına,

- Ay çiçeği kök eksüдалarı *S. hermonthica*, *Orobancha cumana*, *O. minor*, *O. crenata*, and *Phelipanche aegyptiaca* (Ueno ve ark., 2014) tohumlarına,

- Bezelye kök eksüдалarı *O. minör* (Xie ve ark., 2009a) tohumlarına, pamuk kök eksüдалarı *O. minör* (Sato ve ark., 2005) tohumlarına,

- *Avena strigosa* kök eksüдалarı *O. minor*, *P. ramosa* and *S. hermonthica* (Kim ve ark., 2014) tohumlarına,

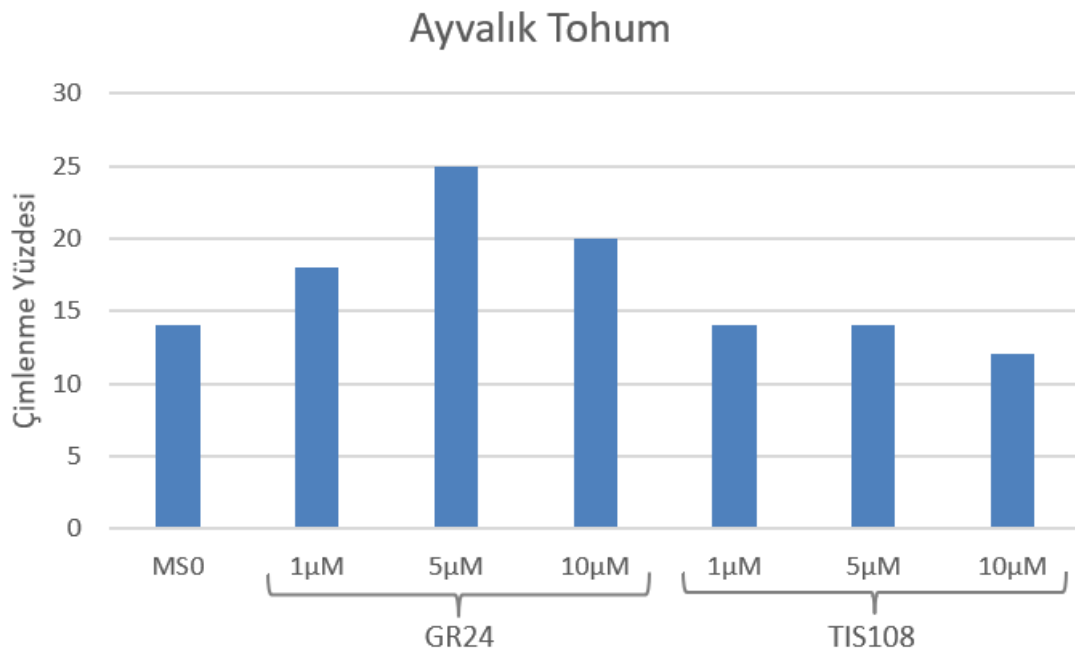
- *Houttuynia cordata* kök eksüдалarı *O. minor*, *P. ramosa*, ve *S. hermonthica* (Kisugi ve ark., 2013) tohumlarına,

- *Lotus japonicus* kök eksüдалarı *O. minor*, *P. ramosa*. ve *S. hermonthica* (Xie ve ark., 2019) tohumlarına,

- *A. thaliana* kök eksüдалarı *O. aegyptiaca* (Goldwasser ve ark., 2008) ve *P. ramosa* (Kohlen ve ark., 2011) tohumlarına uygulandığı zaman çimlenmenin uyarıldığı belirlenmiştir.

Yalnızca su uygulandığı zaman neredeyse hiç çimlenmeyen parazit bitki

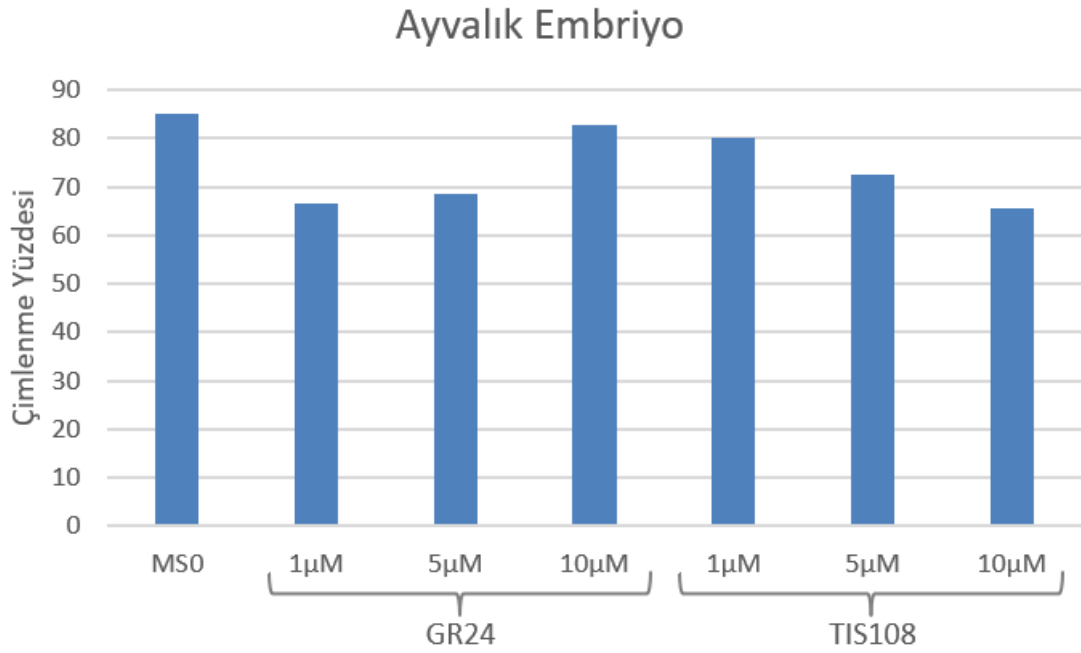
tohumlarına, SL analogu GR24 uygulandığında çimlenme artmıştır (Matusova ve ark., 2005; Xie ve ark., 2007; Goldwasser ve ark., 2008; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Lopez-Raez ve ark., 2008, 2010; Bhattacharya ve ark., 2009; Lin ve ark., 2009; Kim ve ark., 2010; Ito ve ark., 2011; Kohlen ve ark., 2011, 2012; Alder ve ark., 2012; Boyer ve ark., 2012; Kretschmar ve ark., 2012; Xie ve ark., 2013; Ueno ve ark., 2014; Umehara ve ark., 2015; Bao ve ark., 2017; Charnikhova ve ark., 2017). Bu çalışmada ise 4. haftanın sonunda, hem tohum hem de embriyolarda *rac*-GR24 ve TIS108 uygulamaları için çimlenme oranları % cinsinden belirlenmiş ve grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.68 ve Şekil 4.69).



Şekil 4.68. Ayvalık tohumlarının çimlenme yüzdeleri

Çalışmada içerisine farklı miktarlarda *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan tohumların çimlenme oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın, içerisine farklı miktarlarda TIS108 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan tohumların çimlenme oranlarının kontrol grubundan farklı olmadığı belirlenmiştir. *A. thaliana* tohumları GR24 ile muamele edildiğinde çimlenme oranı kontrol grubuna göre daha yüksek olmuştur (Waters ve ark., 2012b; Scaffidi ve ark., 2013; Stanga ve ark., 2013). Bu sonuçlar *rac*-GR24 ile muamele edilmiş Ayvalık tohumlarından alınan sonuçlar ile uyumludur. TIS108'in parazit bitki tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği belirtilse de (Bao ve ark., 2017), doğal SL ile birlikte uygulandığı zaman çimlenmeyi baskıladığı belirlenmiştir (Ito ve ark., 2011). Ayvalık

çeşidi tohumlarından gelişen bitkilerde ise doku kültürü şartlarında TIS108'in tohum çimlenmesi üzerine etkisi yoktur.



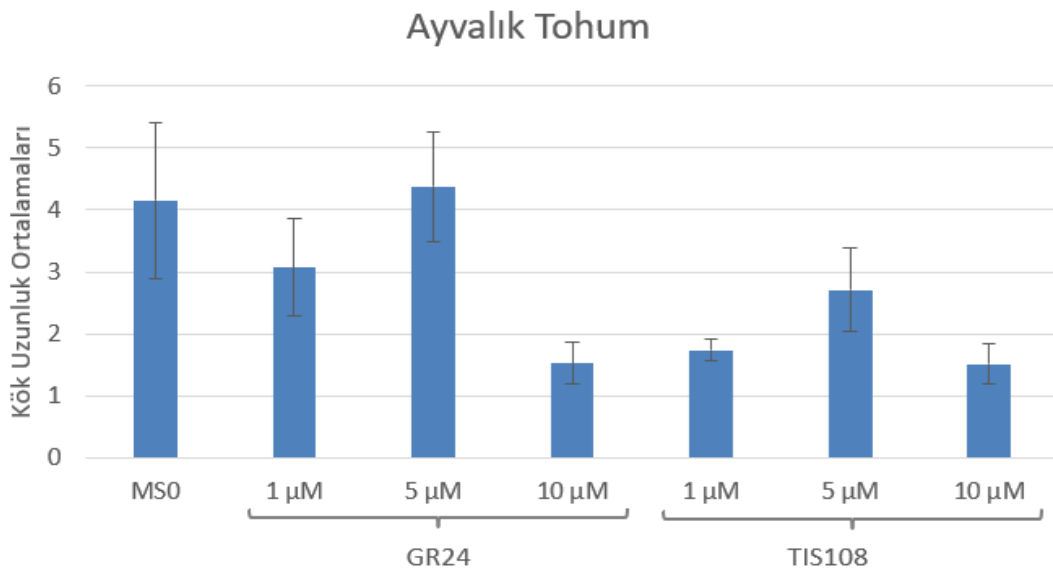
Şekil 4.69. Ayvalık embriyolarının çimlenme yüzdeleri

Çalışmada içerisine farklı miktarlarda *rac*-GR24 ve TIS108 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan embriyoların çimlenme oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın, *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan embriyoların çimlenme oranlarının artan dozla birlikte yükseldiği, içerisine TIS108 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan embriyoların ise çimlenme yüzdelерinin doz artışı ile azaldığı belirlenmiştir. *A. thaliana* bitkisinde GR24 uygulamasının tohum çimlenmesini kontrol grubuna oranla arttırdığı gözlenirse de (Waters ve ark., 2012b; Scaffidi ve ark., 2013; Stanga ve ark., 2013), Ayvalık embriyolarında *rac*-GR24 uygulamalarında çimlenme oranı kontrol grubuna göre düşük kalmıştır. Bununla birlikte parazit bitkiler üzerinde GR24 uygulamalarının doz arttıkça çimlenmeyi artırdığı gözlenmiştir (Matusova ve ark., 2005; Xie ve ark., 2007; Goldwasser ve ark., 2008; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Lopez-Raez ve ark., 2008, 2010; Bhattacharya ve ark., 2009; Lin ve ark., 2009; Kim ve ark., 2010; Ito ve ark., 2011; Kohlen ve ark., 2011, 2012; Alder ve ark., 2012; Boyer ve ark., 2012; Kretschmar ve ark., 2012; Xie ve ark., 2013; Umehara ve ark., 2015; Bao ve ark., 2017; Charnikhova ve ark., 2017). Ayvalık çeşidine ait embriyolarda da *rac*-GR24 uygulamalarında doz artışı ile çimlenme oranı arasında doğru

orantı gözlenmiştir. TIS108 uygulamalarında ise doz artışı ile çimlenme oranı azalmıştır.

Toplamda on farklı zeytin çeşidi ile yapılan bir çalışmada tohumların çimlenmelerinin çeşide bağlı olarak 55-95 gün arasında olduğu, ancak embriyolar izole edildiklerinde bu sürenin 10-14 güne düştüğü gözlemlenmiştir (Acabedo ve ark., 1997). Bu çeşitlerdeki çimlenme oranları ise tohumlarda %5-26 aralığında kalırken, embriyolarda bu oranlar %70-80'lere kadar çıkmıştır (Acabedo ve ark., 1997). Benzer şekilde, bu çalışmada kullanılan Ayvalık ve Domat zeytin çeşitlerinde de embriyoların çimlenme hızları tohumlara göre daha fazladır. Bunun nedeni olarak, embriyonun gelişiminde endospermden ya da embriyoyu saran diğer dokulardan kaynaklanan fiziksel bir inhibisyon olduğu belirtilmiştir (Acabedo ve ark., 1997). Ayrıca, zeytin tohumlarındaki dormansinin, embriyoyu saran dokulardan kaynaklandığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Acabedo ve ark., 1997'ye göre Istambouli ve Neville, 1977; Lagarda ve ark., 1983; Voyiatzis ve Porlings, 1986). Buna ek olarak, zeytin tohumlarındaki çimlenme durgunluğunun nedeninin, embriyonun gelişimini önleyen bazı kimyasallar olabileceği de öne sürülmüştür (Rostami ve Shasavar, 2009'a göre Voyiatzis ve Porlings, 1987). Bununla birlikte zeytinde embriyo kültürleri zeytin çimlenme süresini kısaltan bir yöntemdir ve zeytin ıslah programlarında kullanılabilir (Acabedo ve ark., 1997).

Çalışmada daha sonra , kültürün 4. haftasında kök boyu ölçümleri yapılmıştır. Hem tohum hem de embriyolarda oluşan köklerin uzunlukları ölçülerek ve ortalama değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.70 ve Şekil 4.71).



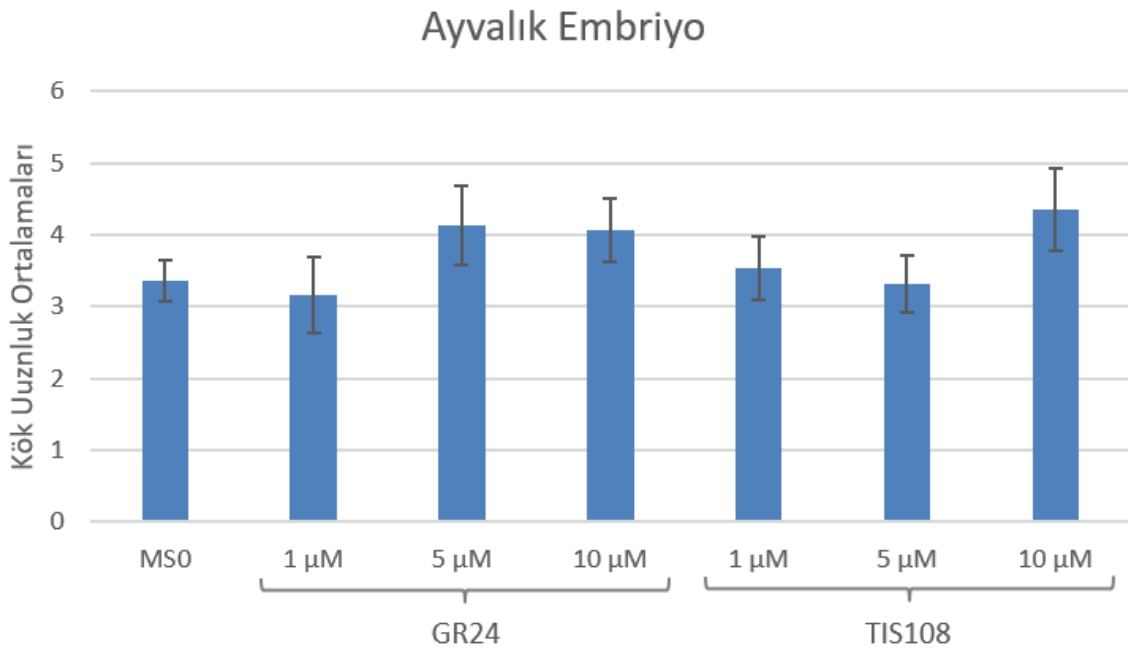
Şekil 4.70. Ayvalık tohumlarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde ortalama kök boy uzunluğu $4,15 \pm 1,25$ cm olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunluğu $3,07 \pm 0,79$ cm, $5 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,38 \pm 0,88$ cm, $10 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $1,52 \pm 0,33$ cm iken, $1 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $1,73 \pm 0,17$ cm, $5 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $2,71 \pm 0,66$ cm, $10 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $1,51 \pm 0,33$ cm olarak tespit edilmiştir. Yalnızca *rac*-GR24 $5 \mu\text{M}$ uygulaması kök boyu ortalamaları kontrol grubuna yakındır. Diğer tüm uygulamalarda kök boyu ortalamalarının kontrol grubundan daha azdır.

Kök boyu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan SPSS (23.0) yazılımı ile değerlendirilmiştir. İlk olarak veri dağılımının homojenitesi analiz edilmiş ve verilerin homojen dağılmadığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,001<0,05). Bu nedenle veriler “log” fonksiyonu kullanılarak transforme edilmiş ve homojen hale getirilmiştir (Levene Testi; Sig:0,055>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası fark Sig:0,017<0,05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır (df:6; F:2,955; p<0,05). Bu aşamadan sonra Tukey testi ile aralarında anlamlı fark çıkan grupların toplamda 2 farklı alt gruba bölündüğü gözlenmiştir. Birinci grupta kontrol, *rac*-GR24 1 ve $10 \mu\text{M}$ ile TIS108 1 , 5 , $10 \mu\text{M}$ uygulamaları bulunurken, ikinci grupta kontrol, *rac*-GR24 1 ve *rac*-GR24 $5 \mu\text{M}$ ile TIS108 1 , 5 , $10 \mu\text{M}$ uygulamaları bulunmaktadır. Buna göre *rac*-GR24’ün 5 ve $10 \mu\text{M}$ uygulamalarına ait sonuçlar farklı gruplarda bulundukları için, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak bununla beraber kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olan uygulama grubu bulunmamaktadır.

Çeltik ve *A. thaliana* bitkilerinde GR24 uygulaması ile ana kök boyunun uzadığı bildirilmiştir (Ruyter-Spira ve ark., 2011; Sun ve ark., 2014). Benzer şekilde GR24 uygulanmış yeşil alg, ciğer otu ve bazı yosun türlerinde de rizoid boyu uzamıştır (Delaux ve ark., 2012). Bununla birlikte mısırdaki *max4* mutantlarında ana kökler yabancı bitkiye göre daha kısa kalmıştır (Guan ve ark., 2012). Ayrıca SL mutantlarında kök biyokütlesinin de azaldığı gözlenmiştir (Snowden ve ark., 2005; Drummond ve ark., 2009). Ancak *A. thaliana* bitkisinde yaptıkları uygulamalarda yabancı tip bitkilerde $1,25$ ve $2,5 \mu\text{M}$ GR24 uygulandığında ana kök boylarının uzadığı, ancak 5 ve $10 \mu\text{M}$ GR24 uygulandığında ise uzamadığı bildirilmiştir (Ruyter-Spira ve ark., 2011). Zeytin bitkisi Ayvalık çeşidinde

tohumdan gelişen bitkilerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada GR24 uygulamalarında yalnızca 5 μM uygulaması kontrol grubundan daha fazla kök uzunluğu ortalamasına sahip olmakla beraber, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak 10 μM uygulamasında kök uzunluğu ortalamasında ani bir düşüş meydana gelmiştir ve bu azalma 5 μM uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmadır. *A. thaliana* bitkisinde 5 μM dozda görülen ana kök boyu inhibisyonu (Ruyter-Spira ve ark., 2011), Ayvalık tohumlarından gelişen bitkilerde 10 μM dozda görülmüştür. TIS108 uygulamalarında ise tüm doz uygulamalarına ait kök boyu ortalamaları kontrol grubundan daha azdır. Böylece SL biyosentez inhibitörü olan TIS108'e ait sonuçların, SL mutantları ile benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 4.71. Ayvalık embriyolarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde ortalama kök boy uzunluğu $3,36 \pm 0,28$ cm olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $3,17 \pm 0,52$ cm, 5 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,13 \pm 0,54$ cm, 10 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,06 \pm 0,45$ cm iken, 1 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $3,53 \pm 0,44$ cm, 5 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $3,32 \pm 0,39$ cm, 10 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,35 \pm 0,58$ cm

olarak tespit edilmiştir.

Ayvalık çeşidi embriyolarında uygulama gruplarında kök boyu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, verilerin homojen dağıldığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,070>0,05). Buna karşın, gruplar arası fark (Sig:0,421>0,05) istatistiksel olarak anlamlı değildir. (df:6; F:1,010; p>0,05).

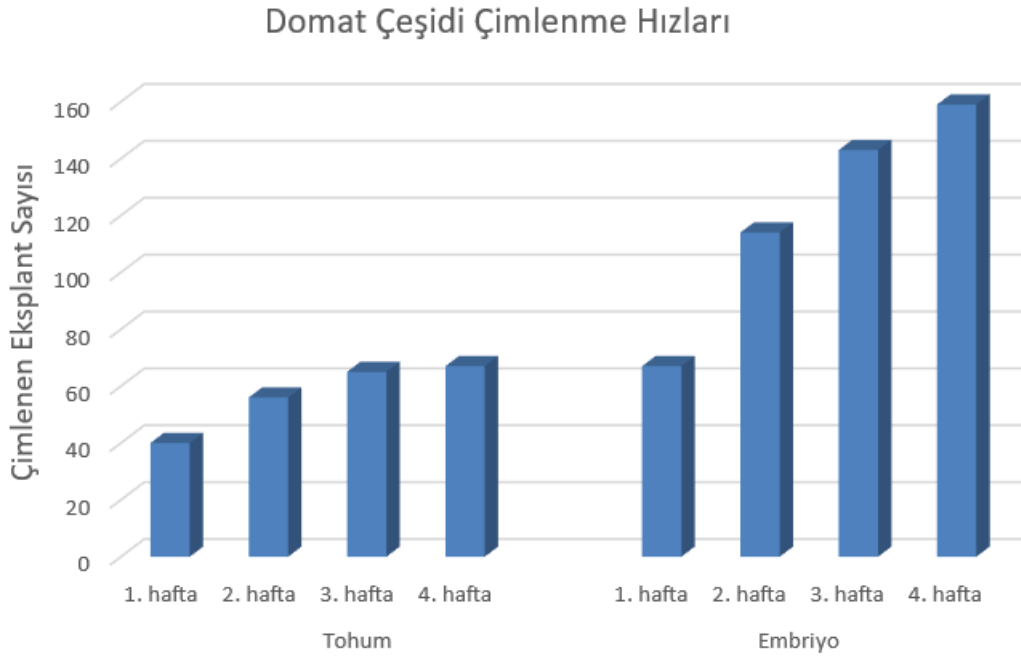
Ortalama kök boy uzunlukları tohumlarda en az 1,52 cm iken, çıplak embriyolarda en az 3,17 cm'dir. Ayvalık çeşidinde doku kültürü şartlarında kök gelişimi endosperm dokusu uzaklaştırıldıktan sonra kültüre alınan embriyolarda daha fazladır.

Birçok bitkide, dışarıdan GR24 uygulandığında kök boylarının uzadığı, SL mutantlarında ise kök boylarının kısaldığı ve biyokütlenin azaldığı bildirilmiştir (Snowden ve ark., 2005; Drummond ve ark., 2009; Ruyter-Spira ve ark., 2011; Delaux ve ark., 2012; Guan ve ark., 2012; Sun ve ark., 2014). Bu durum birçok araştırmacı tarafından, kök meristemindeki kortikal hücre sayısındaki artış ile açıklanmıştır (Dubrovsky ve ark., 2009; Ruyter-Spira ve ark., 2011; Arite ve ark., 2012; Koren ve ark., 2013). Koltai ve ark. (2010)'na göre ise köklerin uzaması, hücre bölünmesinden çok hücre uzaması ile ilgilidir. Zeytin Ayvalık çeşidi embriyolarından gelişen bitkilere 1 µM *rac*-GR24 uygulandığında ortalama kök boyu kontrol grubuna göre kısa olsa da bu fark istatistik olarak anlamlı değildir. Buna karşın, daha yüksek miktarlarda *rac*-GR24 uygulandığında (5 ve 10 µM) ortalama kök boyu kontrol grubuna göre daha uzun olmuştur. Bu durum literatürde diğer bitkiler ile yürütülmüş çalışmalar ile uyumludur (Ruyter-Spira ve ark., 2011; Delaux ve ark., 2012; Sun ve ark., 2014). Çalışmada Ayvalık embriyolarına 1 ve 5 µM TIS108 uygulandığında ise ortalama kök boyları kontrol grubu ile benzer uzunlukta olmuş, ancak yüksek miktarda (10 µM) TIS108 uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ortalama kök boyları kontrol grubundan uzun olmuştur.

Lotus japonicus bitkisi ile yapılan bir çalışmada, *max3* mutantlarında ortalama kök boylarının yabancı bitkilere göre daha uzun olduğu gözlenmiştir (Liu ve ark., 2013). Benzer şekilde *A. thaliana* bitkisinde uygulanan doza bağlı olarak GR24 nedeniyle ortalama kök boylarının kısa kaldığı gözlenmiştir (Shinohara ve ark., 2013). Ayvalık embriyolarından gelişen bitkilerde ise SL inhibitörünün yüksek dozda ortalama kök boy uzunluklarının artmasına neden olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, yonca ve domates bitkilerinde yapılan çalışmalarda ortalama kök boy uzunlukları üzerine farklı miktarlarda GR24 uygulamalarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir ve bu durum SL'in kök boy uzunluğuna etkilerinin bitki türüne bağlı olarak değişebileceği görüşünü desteklemektedir (Koltai ve ark., 2010; de Cuyper ve ark., 2015;

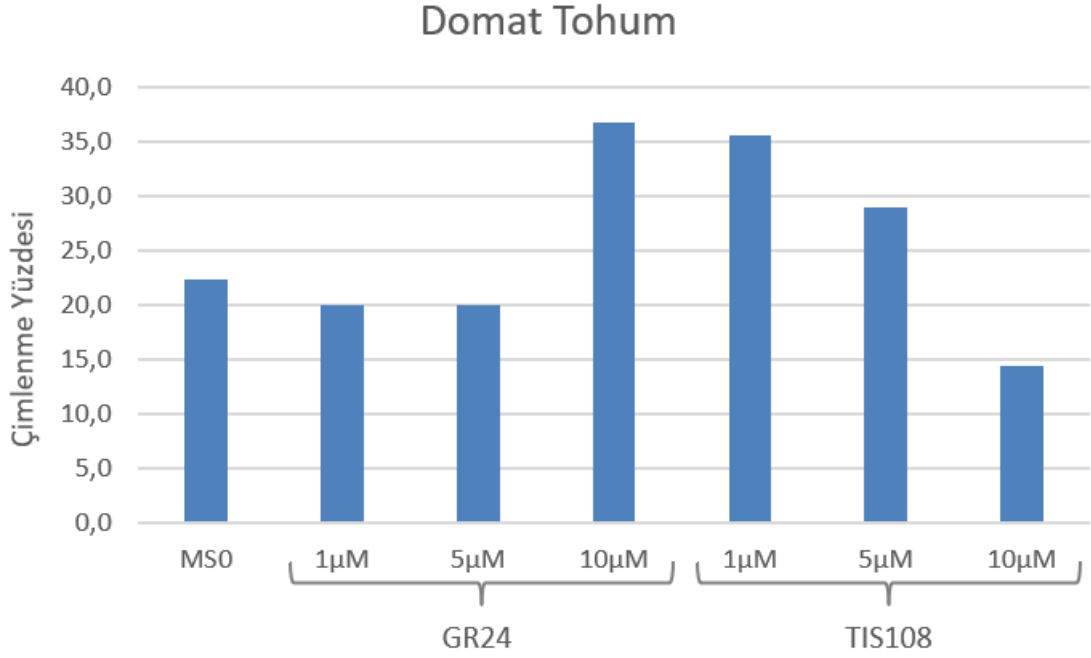
Matthys ve ark., 2016).

Domat Çeşidi Çimlenme Oranı ve Kök Boyları: Çalışmada Ayvalık çeşidine ait tohum ve embriyoların çimlenmeleri kültüre alınmalarını takip eden 4 hafta boyunca gözlenmiş ve öncelikle aralarındaki çimlenme hızı farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.72). Çimlenme hızlarının belirlenmesinde tüm eksplantlar sayılmış, doz veya uygulama ayrımı gözetilmemiştir.



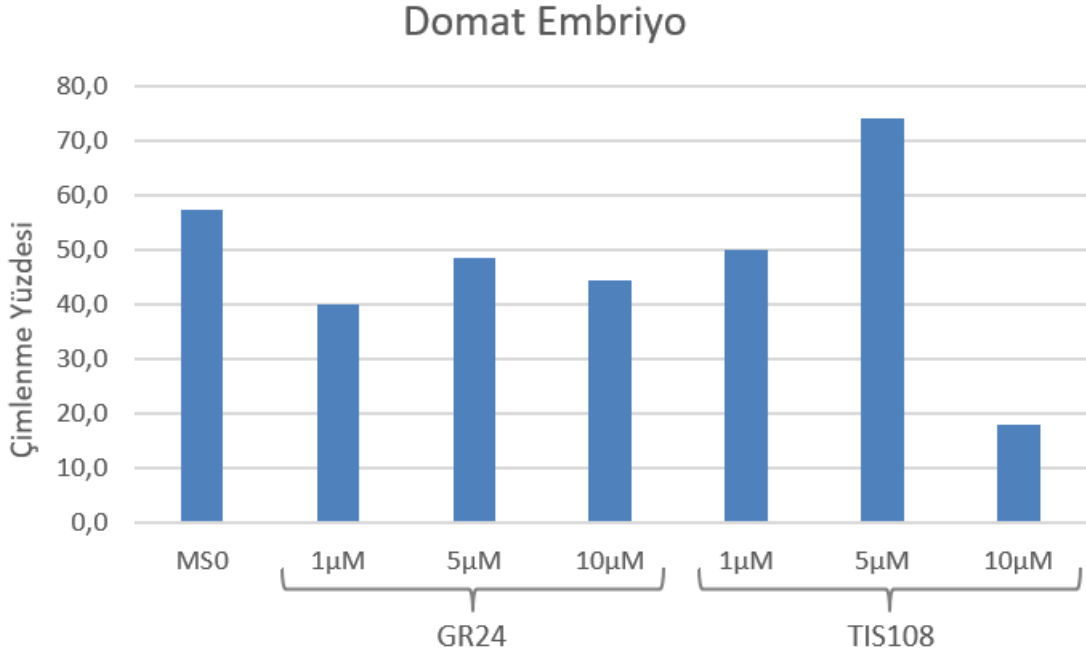
Şekil 4.72. Domat tohum ve embriyolarında çimlenme hızları

Dört hafta boyunca elde edilen verilere göre endosperm dokusu çıkarılmadan kültüre alınan tohumların çimlenme hızı, endosperm dokusu çıkarıldıktan sonra kültüre alınan çıplak embriyolara oranla daha azdır. Kültürün 4. haftası sonunda 350 tohumun yalnızca 67 tanesi çimlenirken, endosperm dokusundan ayrılmış olan 350 embriyodan 159 tanesi çimlenmiştir. Ardından hem tohum hem de embriyolarda *rac*-GR24 ve TIS108 uygulamaları için çimlenme oranları % cinsinden belirlenmiş ve grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.73 ve Şekil 4.74).



Şekil 4.73. Domat tohumlarının çimlenme yüzdeleri

Çalışmada içerisinde farklı miktarlarda *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan tohumlarda, 10 µM *rac*-GR24 uygulanmış olan grupta çimlenme oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın, içerisinde farklı miktarlarda TIS108 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan tohumlarda ise 10 µM TIS108 uygulanmış olan grupta çimlenme oranlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük olduğu görülmüştür. *A. thaliana* bitkisinde GR24 ile yapılan çalışmalarda uygulanan doza bağlı olarak çimlenme oranının da arttığı belirlenmiştir (Waters ve ark., 2012b; Scaffidi ve ark., 2013; Stanga ve ark., 2013). Domat çeşidine ait tohumlardan gelişen bitkilerde ise 1 ve 5 µM *rac*-GR24 uygulandığında çimlenme oranının kontrol grubundan fazla olmadığı, 10 µM *rac*-GR24 uygulandığında ise çimlenme oranının kontrol grubundan fazla olduğu gözlenmiştir. Buna göre, Domat tohumlarından gelişen bitkilerde de doz ile birlikte çimlenme oranında artış görülmüştür. TIS108 ise parazit bitki tohumlarının çimlenmesini teşvik etmektedir (Bao ve ark., 2017). Domat tohumlarından gelişen bitkilerde ise 1 ve 5 µM TIS108 uygulandığında çimlenme oranı kontrol grubuna göre daha yüksek olmuştur. Ancak 10 µM TIS108 uygulandığında ani bir düşüş belirlenmiştir. Bao ve ark. (2017)'nin parazit bitki tohumları üzerinde yapmış oldukları araştırmada da, TIS108'in uygulanan en yüksek dozu (3000 µM) çimlenmeyi oldukça azaltmıştır.



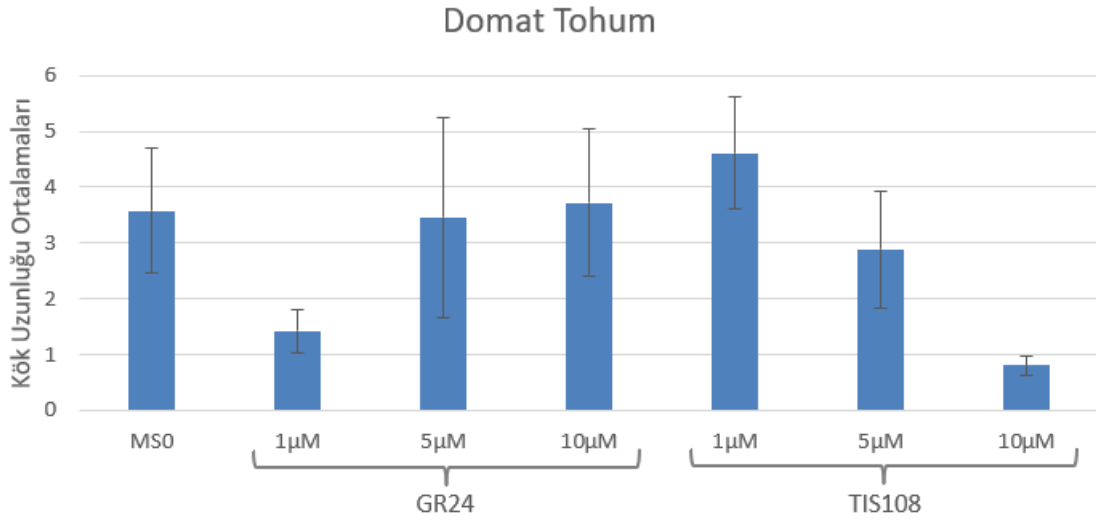
Şekil 4.74. Domat embriyolarının çimlenme yüzdeleri

Çalışmada içerisine farklı miktarlarda *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında kültüre alınan embriyoların çimlenme oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Bu durum *A. thaliana* ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile çelişmektedir (Waters ve ark., 2012b; Scaffidi ve ark., 2013; Stanga ve ark., 2013). Domat embriyolarından gelişen bitkilere TIS108 uygulamalarında ise yalnızca 5 µM doz uygulanan grupta çimlenmede artış gözlenirken, 10 µM dozda ani bir düşüş gerçekleşmiştir. Bao ve ark. (2017)'nin parazit bitki tohumları üzerinde yapmış oldukları çalışmada 3, 30, 300 ve 3000 µM TIS108 uygulandığında, bu uygulamaların etkisi ile tohum çimlenme oranları sırasıyla %45, 60, 83 ve 25 olmuştur. Dolayısıyla Domat embriyoları ile yapılan çalışmaya benzer şekilde, yüksek miktarda TIS108 uygulamasının çimlenmeyi inhibe ettiği anlaşılmıştır (Bao ve ark., 2017).

Çimlenme yüzdeleri tohumlarda en fazla %36,7 iken, çıplak embriyolarda bu oran %74,3'e kadar çıkmıştır. Domat çeşidinde doku kültürü şartlarında çimlenme, endosperm dokusu uzaklaştırıldığı zaman daha fazladır. Bu sonuçlar ile zeytinde doku kültürü şartlarında endospermin embriyodan uzaklaştırılmasının çimlenme oranını artırması, önceki çalışmalar ile uyumludur (Acabedo ve ark., 1997'ye göre Istambouli ve Neville, 1977; Lagarda ve ark., 1983; Voyiatzis ve Porlings, 1986; Acabedo ve ark., 1997).

Çalışmada daha sonra , kültürün 4. haftasında kök boyu ölçümleri yapılmıştır. Hem tohum hem de embriyolarda oluşan köklerin uzunlukları ölçülerek ve ortalama değerleri

hesaplanmıştır (Şekil 4.75 ve Şekil 4.76).



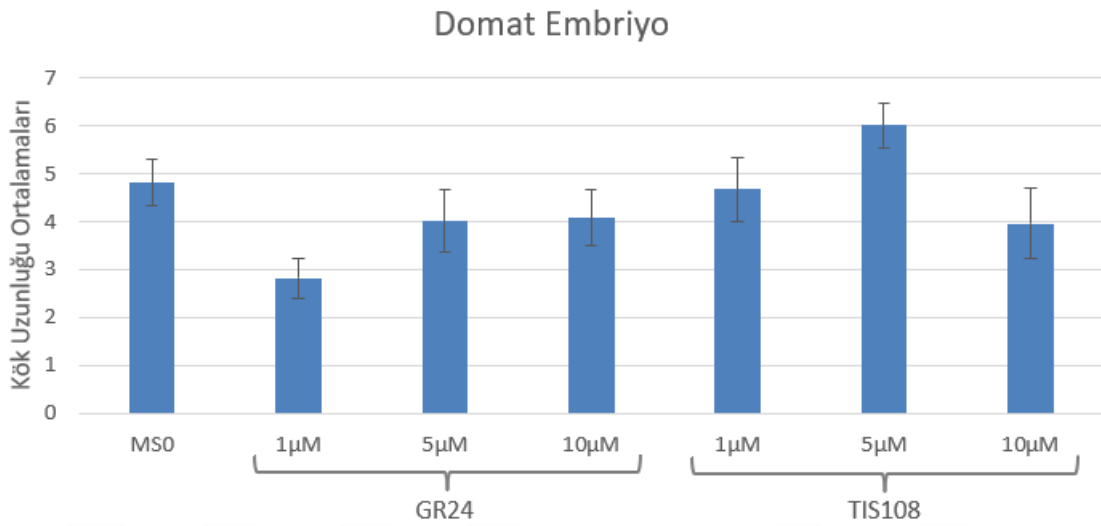
Şekil 4.75. Domat tohumlarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde ortalama kök boy uzunluğu $3,58 \pm 1,12$ cm olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $1,41 \pm 0,39$ cm, $5 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $3,46 \pm 1,78$ cm, $10 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $3,71 \pm 1,31$ cm iken, $1 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $4,61 \pm 1$ cm, $5 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $2,88 \pm 1,04$ cm, $10 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $0,8 \pm 0,18$ cm olarak tespit edilmiştir. *rac*-GR24 uygulamalarında doz ile birlikte kök ortalamalarının arttığı, TIS108 uygulamalarında ise azaldığı görülmüştür.

Kök boyu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle veri dağılımının homojenitesi analiz edilmiş ve verilerin homojen dağılmadığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,008<0,05). Bu nedenle veriler “sin” fonksiyonu kullanılarak transforme edilmiş ve homojen hale getirilmiştir (Levene Testi; Sig:0,137>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası fark Sig:0,569>0,05 olduğu için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (df:6; F:0,807; p>0,05).

SL’in ana kök boylarının uzaması üzerine pozitif düzenleyicileri oldukları daha öncesinde bildirilmiştir (Ruyter-Spira ve ark., 2011; Sun ve ark., 2014). Zeytin Domat

çeşidi tohumlarından gelişen bitkilerde de GR24 uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da ortalama kök boyu doz bağılı olarak artmıştır. TIS108 uygulamalarında ise yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da doz artışı ile birlikte ortalama kök boyları azalmıştır. Bu sonuçlar, zeytin Domat tohumlarından gelişen bitkilerde SL biyosentez inhibitörü olan TIS108'in petunya, mısır gibi bitki türleri SL mutantlarında olduğu gibi kök boyları üzerine etkisi olduğunu göstermiştir (Snowden ve ark., 2005; Drummond ve ark., 2009; Guan ve ark., 2012).



Şekil 4.76. Domat embriyolarında kök uzunluk ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde ortalama kök boy uzunluğu $4,82 \pm 0,49$ cm olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $2,82 \pm 0,41$ cm, $5 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,01 \pm 0,66$ cm, $10 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,08 \pm 0,58$ cm iken, $1 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerin ortalama kök boy uzunlukları $4,67 \pm 0,67$ cm, $5 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $6,01 \pm 0,47$ cm, $10 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $3,95 \pm 0,73$ cm olarak tespit edilmiştir. Yalnızca TIS108 $5 \mu\text{M}$ uygulamasında kök boy ortalamasının kontrol grubuna göre fazla olduğu gözlenmiştir.

Domat çeşidi embriyolarında uygulama gruplarında kök boyu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, verilerin homojen dağıldığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,435>0,05). Bununla birlikte, gruplar arası fark Sig:0,009<0,05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır (df:6; F:2,989; p<0,05). Bu aşamadan sonra Tukey testi

ile aralarında anlamlı fark çıkan grupların toplamda 2 farklı alt gruba bölündüğü gözlenmiştir. Birinci grupta kontrol, *rac*-GR24 1, 5, 10 μ M ile TIS108 1 ve 10 μ M uygulamaları bulunurken, ikinci grupta kontrol, *rac*-GR24 5 ve 10 μ M ile TIS108 1, 5, 10 μ M uygulamaları bulunmaktadır. Buna göre *rac*-GR24'ün 1 μ M ve TIS108'in 5 μ M uygulamalarının sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak bununla beraber kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olan uygulama grubu bulunmamaktadır.

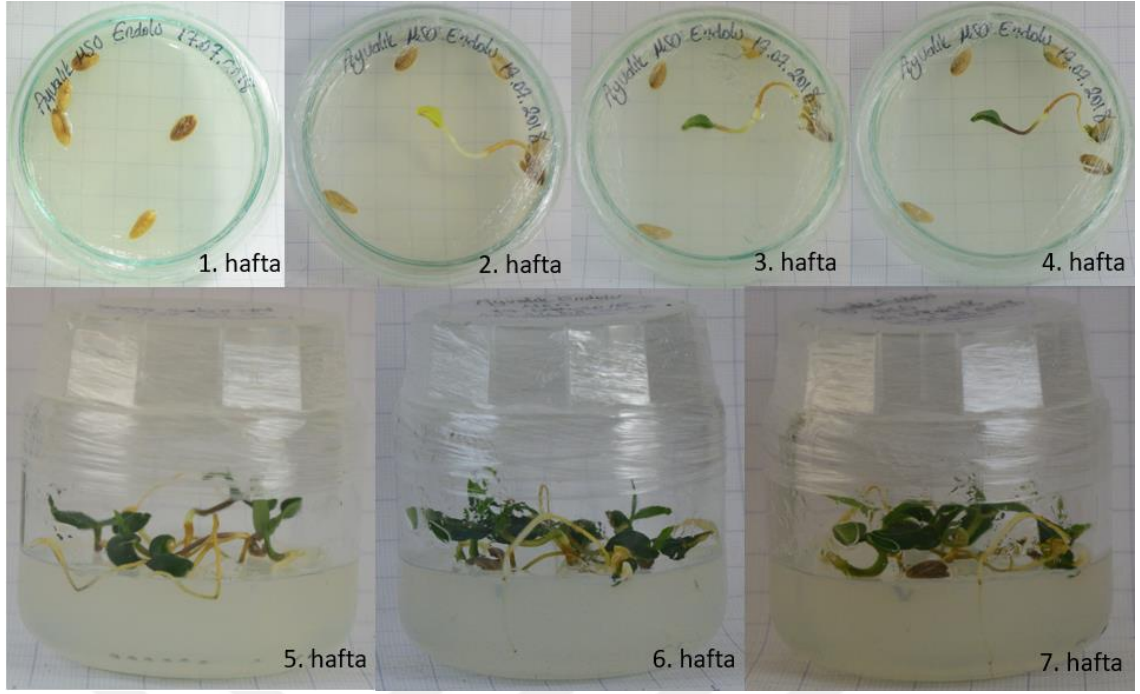
Ortalama kök boy uzunlukları tohumlarda en az 0,8 cm iken, çıplak embriyolarda en az 2,82 cm'dir. Domat çeşidinde doku kültürü şartlarında kök gelişimi endosperm dokusu uzaklaştırıldıktan sonra kültüre alınan embriyolarda daha fazladır.

Domat embriyolarından gelişen bitkilerde *rac*-GR24 uygulamalarında doz artışı ile birlikte kök boy ortalamalarında artış görülmüştür ancak bu artış kontrol grubuna ortalamasından daha azdır. TIS108 uygulamalarında 1 ve 5 μ M doz uygulamalarında doz artışı ile ortalama kök boy uzunlukları artmış fakat 10 μ M doz uygulamasında kontrol grubuna göre azalmıştır. SL'in ana kök uzunluğu üzerindeki etkileri için genelleme yapmak zordur çünkü bitkinin türü veya büyüme şartlarından etkilenebilir (Matthys ve ark., 2016). Rasmussen ve ark. (2013)'na göre ise, SL'in kökler üzerindeki etkileri ile ilgili daha pek çok çalışma yapılmalıdır.

4.4.2. Yan Dal Sayıları ve İnternod Uzunlukları

Ayvalık ve Domat çeşitlerinde doku kültürü şartlarında, tohum ve embriyolardan gelişen bitkilerin 6 ay sonunda yan dal sayıları belirlenmiş ve internod uzaklıkları ölçülmüştür.

Ayvalık Çeşidi Yan Dal Sayıları ve İnternod Uzunlukları: Ayvalık çeşidinde tohum ve embriyolardan çimlenen bitkilerin gelişimleri doku kültürü şartlarında 8. hafta süre ile takip edilerek fotoğrafları kaydedilmiştir (Şekil 4.77-Şekil 4.90).



Şekil 4.77. Ayvalık tohumlarının MS0 besi ortamında gelişimi



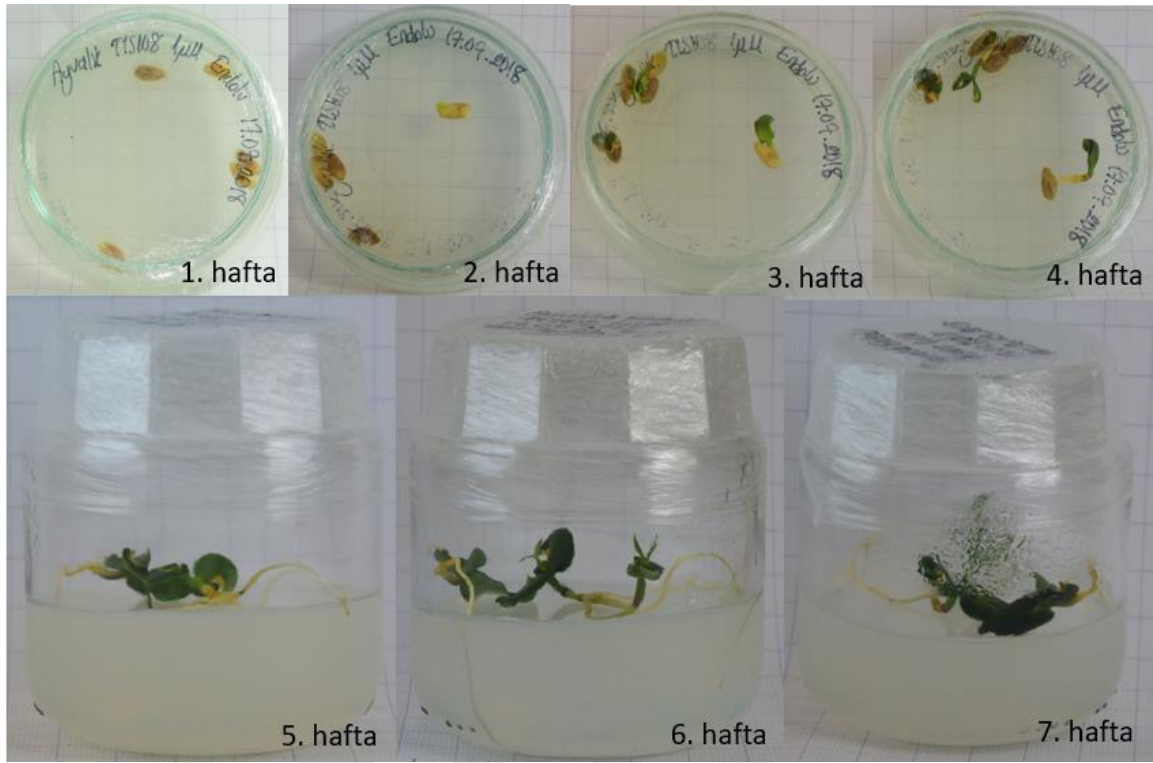
Şekil 4.78. Ayvalık tohumlarının *rac*-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



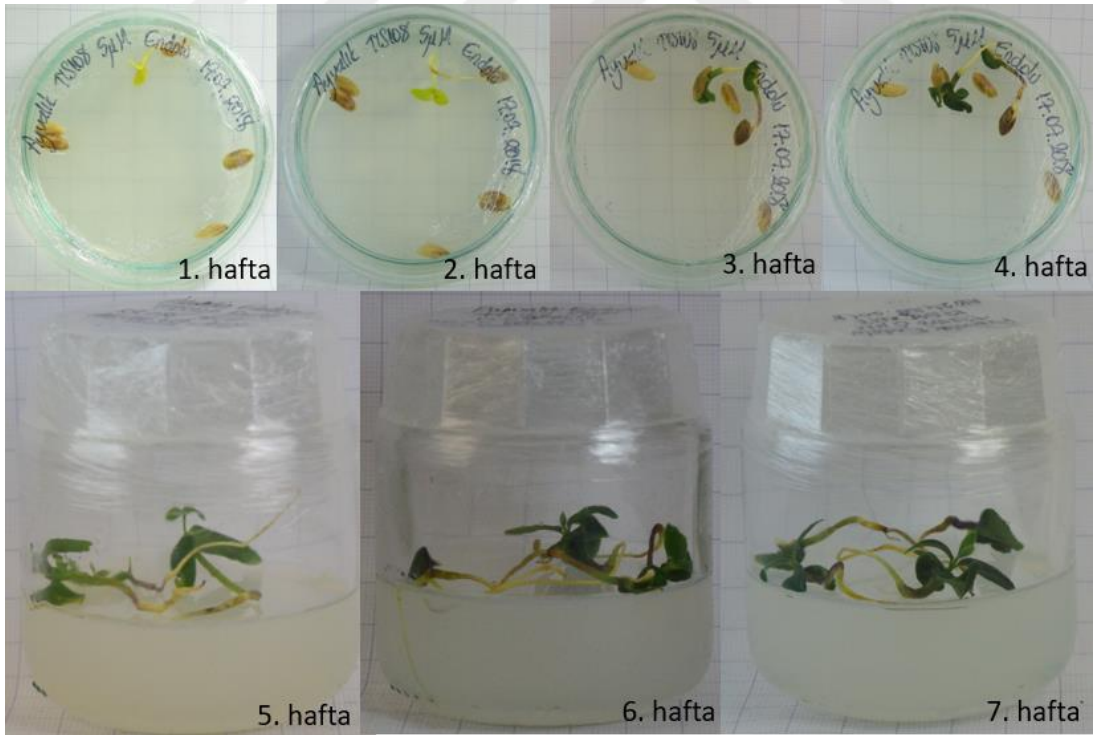
Şekil 4.79. Ayvalık tohumlarının *rac*-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



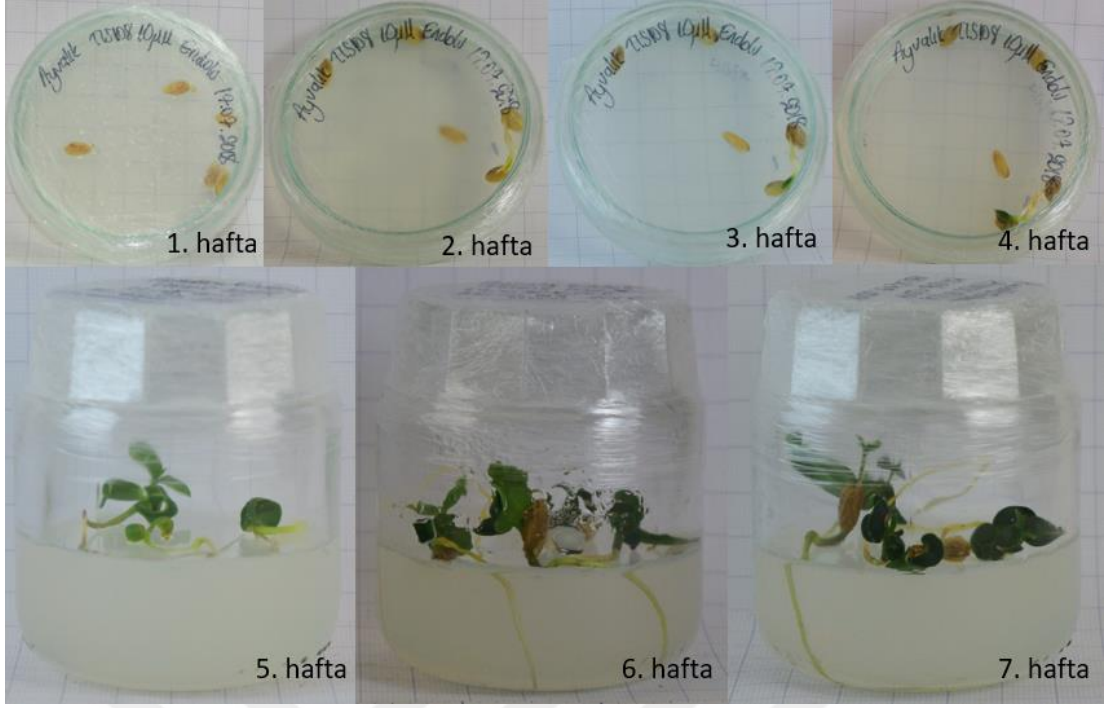
Şekil 4.80. Ayvalık tohumlarının *rac*-GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.81. Ayvalık tohumlarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



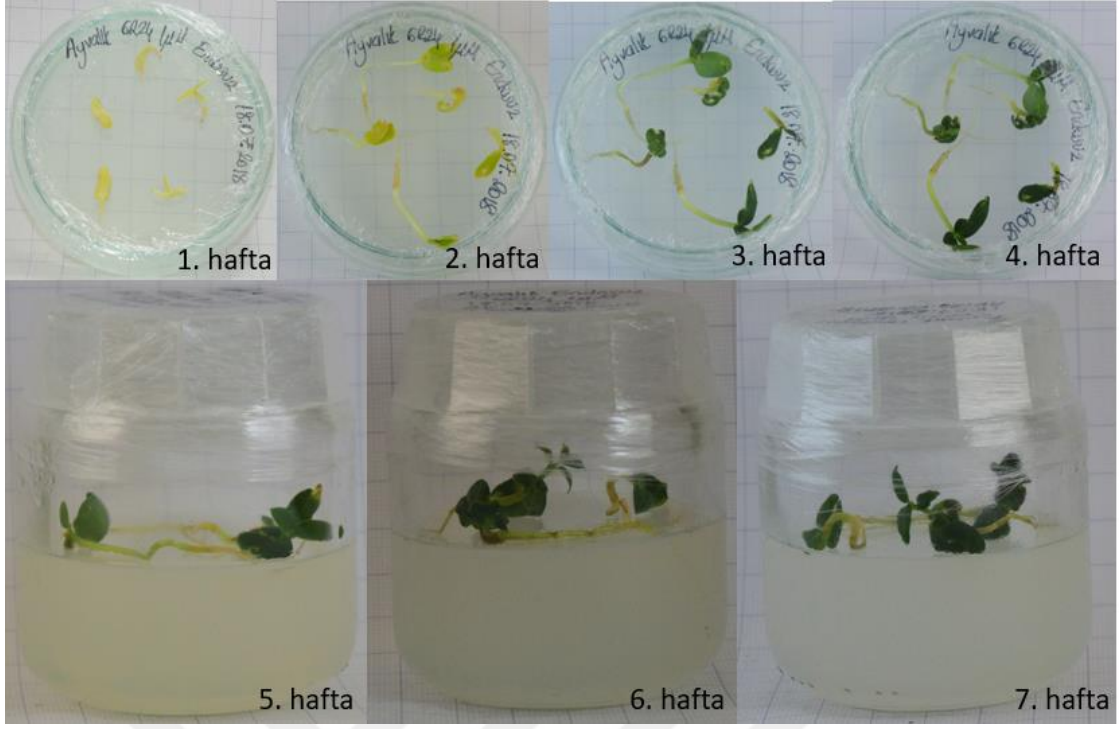
Şekil 4.82. Ayvalık tohumlarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.83. Ayvalık tohumlarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.84. Ayvalık embriyolarının MS0 besi ortamında gelişimi



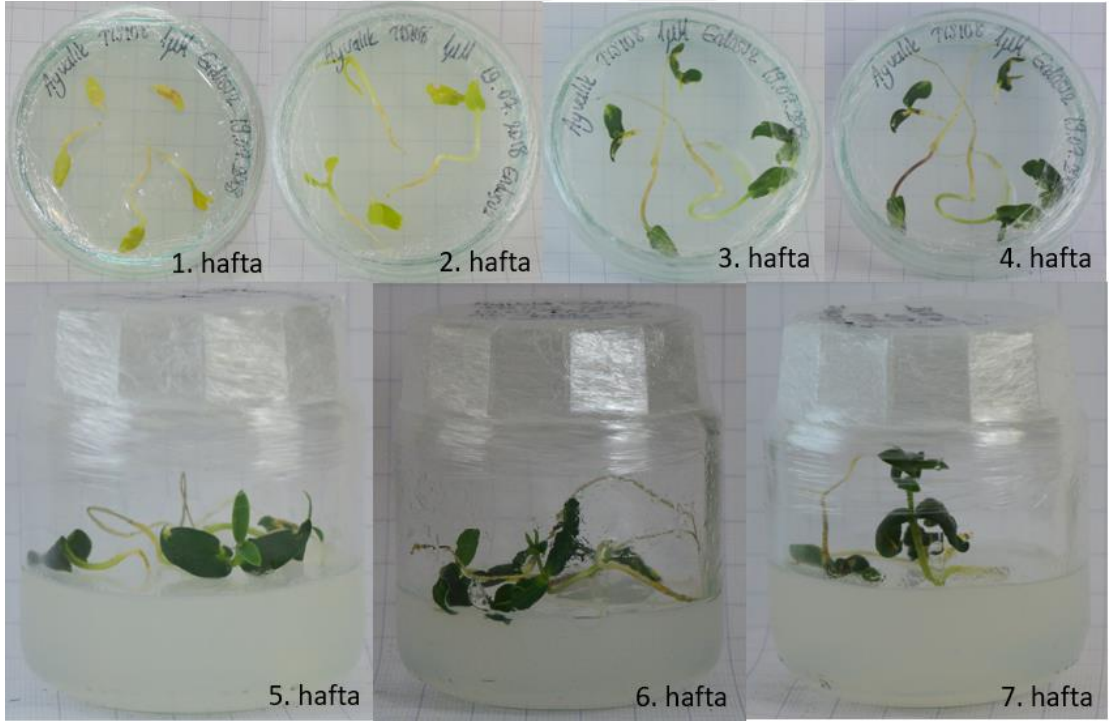
Şekil 4.85. Ayvalık embriyolarının *rac*-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



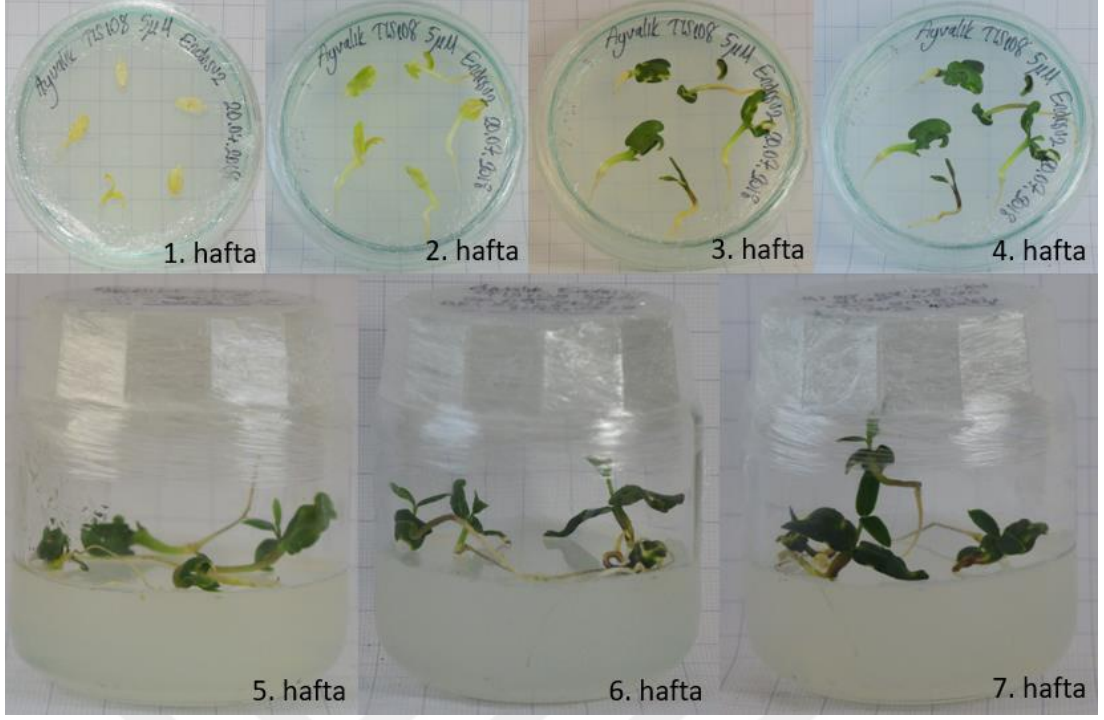
Şekil 4.86. Ayvalık embriyolarının *rac*-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.87. Ayvalık embriyolarının *rac*-GR24 10 μ M uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.88. Ayvalık embriyolarının TIS108 1 μ M uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.89. Ayvalık embriyolarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.90. Ayvalık embriyolarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi

Çalışmada Ayvalık çeşidine ait tohum ve embriyolardan gelişen bitkiler, kültürün 8. haftası sonunda torf/perlit karışımı içeren viyollerde dış ortama alıştırılmıştır. Bu

ortamlarda 24 haftanın sonunda ise tohum (Şekil 4.91) ve embriyolardan (Şekil 4.92) gelişen bitkilerin oluşturdukları yan dalların sayısı ve internod mesafeleri belirlenmiştir.

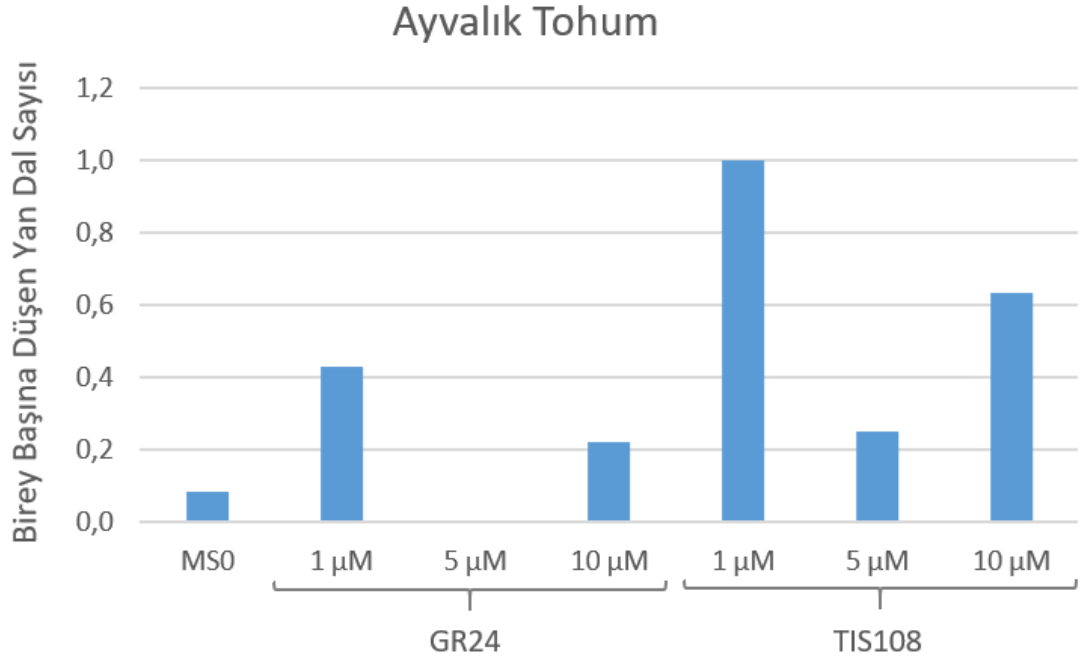


Şekil 4.91. Ayvalık çeşidine ait tohumlardan gelişen 6 aylık bitkiler



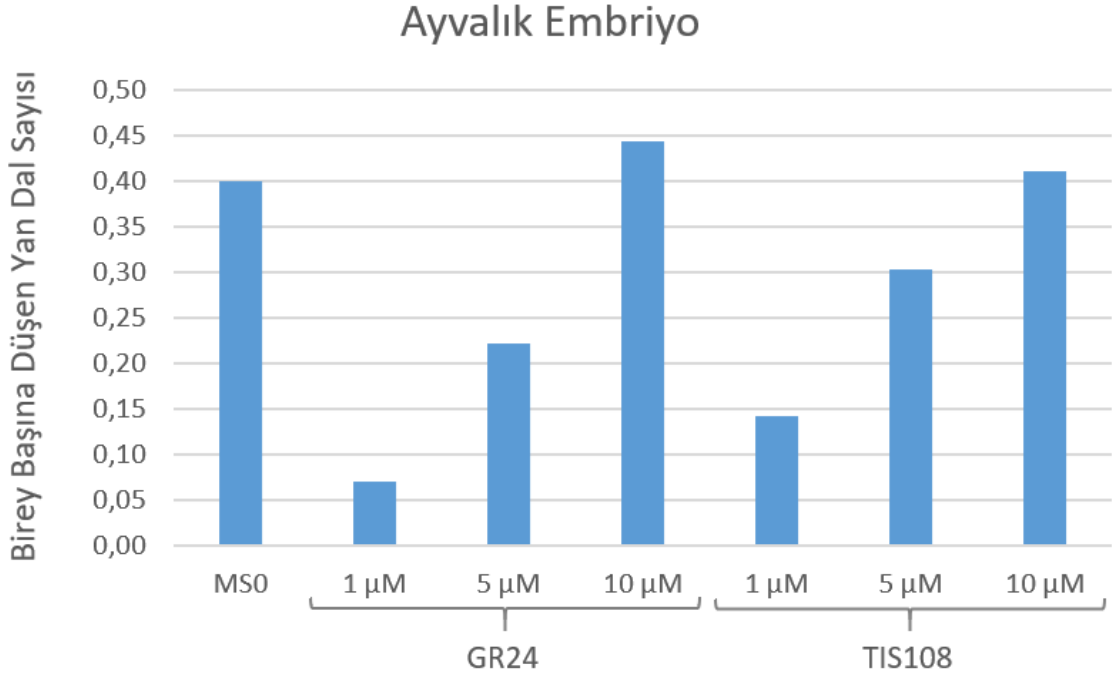
Şekil 4.92. Ayvalık çeşidine ait embriyolardan gelişen 6 aylık bitkiler

Çalışmanın bu kısmında, *rac*-GR24 ve TIS108'in Ayvalık çeşidi tohum ve embriyolarından gelişen bitkilerde, yan dal oluşturma sayısına etkileri belirlenmiştir. (Şekil 4.93 ve Şekil 4.94)



Şekil 4.93. Tohumlardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,083 olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,429, 5 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0 ve 10 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0,222 iken, 1 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 1, 5 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,25, 10 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,636 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.94. Embriyolardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,4 olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,071, 5 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0,222, 10 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0,444 iken, 1 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,143, 5 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,304, 10 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,412 olarak tespit edilmiştir.

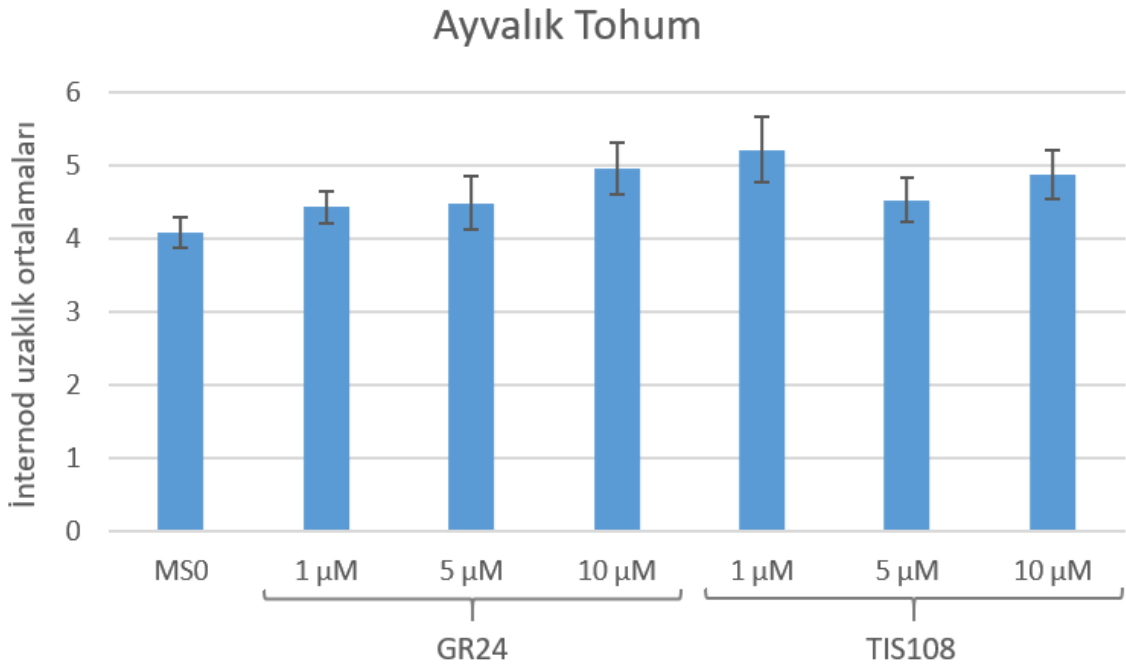
SL mutantlarının yabanıl tip bitkilere göre daha fazla dallanma gösterdiği, *A. thaliana* (Turnbull ve ark., 2002; Sorefan ve ark., 2003; Booker ve ark., 2004, 2005; Stirnberg ve ark., 2007; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Waters ve ark., 2012a), bezelye (Beveridge, 2000; Morris ve ark., 2001; Foo ve ark., 2005; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Drummond ve ark., 2009), çeltik (Ishikawa ve ark., 2005; Arite ve ark., 2007, 2009; Umehara ve ark., 2008; Lin ve ark., 2009), petunya (Napoli, 1996; Snowden ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007; Hamiaux ve ark., 2012), mısır (Guan ve ark., 2012), krizantem (Liang ve ark., 2010; Wen ve ark., 2016) ve *Lotus japonicus* (Liu ve ark., 2013) bitkilerinde gösterilmiştir.

Ayvalık tohumlarından gelişen bitkilerde yan dallanma 5 µM *rac*-GR24

uygulandığında tamamen baskılanmış olup, 1 ve 10 μM doz uygulamalarında bu etki görülmemiştir. Ayvalık embriyolarından gelişen bitkilerde ise birey başına düşen yan dal sayısı ortalamaları *rac*-GR24 uygulamasında doz ile birlikte artış göstermiştir. Literatürde de *A. thaliana* bitkisine doku kültürü şartlarında 1 μM (Shinohara ve ark., 2013), petunyada direkt olarak lateral tomurcuklara 10 μM (Hamiaux ve ark., 2012), çeltik bitkisinde hidroponik ortamda 1 μM (Jiang ve ark., 2013) ve bezelyede direkt olarak lateral tomurcuklara 1 μM (Gomez-Roldan ve ark., 2008) GR24 uygulandığı zaman dallanmanın azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirtilmiştir.

Ayvalık tohumlarından gelişen bitkilerde doku kültürü ortamında TIS108 uygulamalarında tüm gruplarda birey başına düşen yan dal sayısı kontrol grubuna göre fazladır. Embriyolardan gelişen bitkilerde ise sadece 10 μM uygulamasında kontrol grubunu geçmiştir. Bu sonuçlara göre TIS108 uygulaması ile Ayvalık çeşidinde doku kültürü şartlarında dallanmanın arttığı görülmüştür. Benzer şekilde, *A. thaliana* bitkisi ile yapılan bir çalışmada, 1 ve 3 μM TIS108 uygulandığı zaman dallanma istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Ito ve ark., 2013).

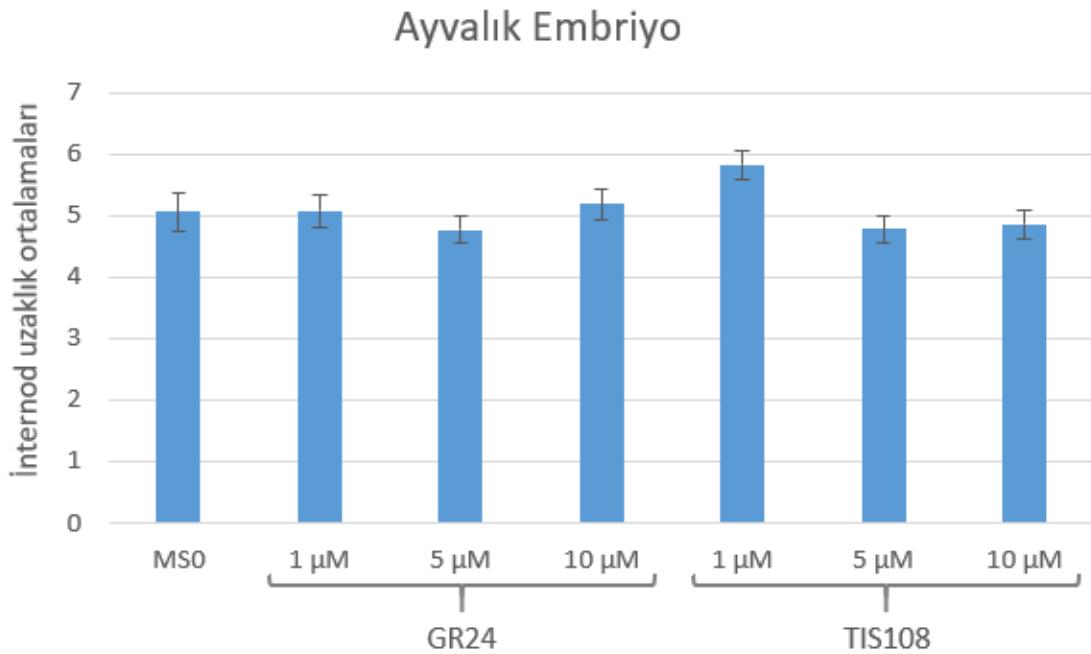
Yan dal sayılarının belirlenmesinin ardından Ayvalık çeşidinde internod uzaklıkları ölçülmüştür (Şekil 4.95 ve Şekil 4.96).



Şekil 4.95. Tohumlardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $4,09 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $4,43 \pm 0,21$, $5 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,48 \pm 0,36$, $10 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,95 \pm 0,35$ iken, $1 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,21 \pm 0,44$, $5 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,53 \pm 0,29$, $10 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,88 \pm 0,33$ olarak tespit edilmiştir.

Ayvalık çeşidi tohumlarında uygulama gruplarında internod uzaklıkları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle veri dağılımının homojenitesi belirlenmiştir. Bu uygulamada verilerin homojen dağıldığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,476>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplararası fark Sig:0,160>0,05 olduğu için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (df:6; F:1,553; p>0,05).



Şekil 4.96. Embriyolardan gelişen Ayvalık çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,07 \pm 0,31$ olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,08 \pm 0,26$, $5 \mu\text{M}$ *rac*-

GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,77 \pm 0,21$, 10 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $5,18 \pm 0,23$ iken, 1 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,82 \pm 0,23$, 5 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,78 \pm 0,21$, 10 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,85 \pm 0,23$ olarak tespit edilmiştir.

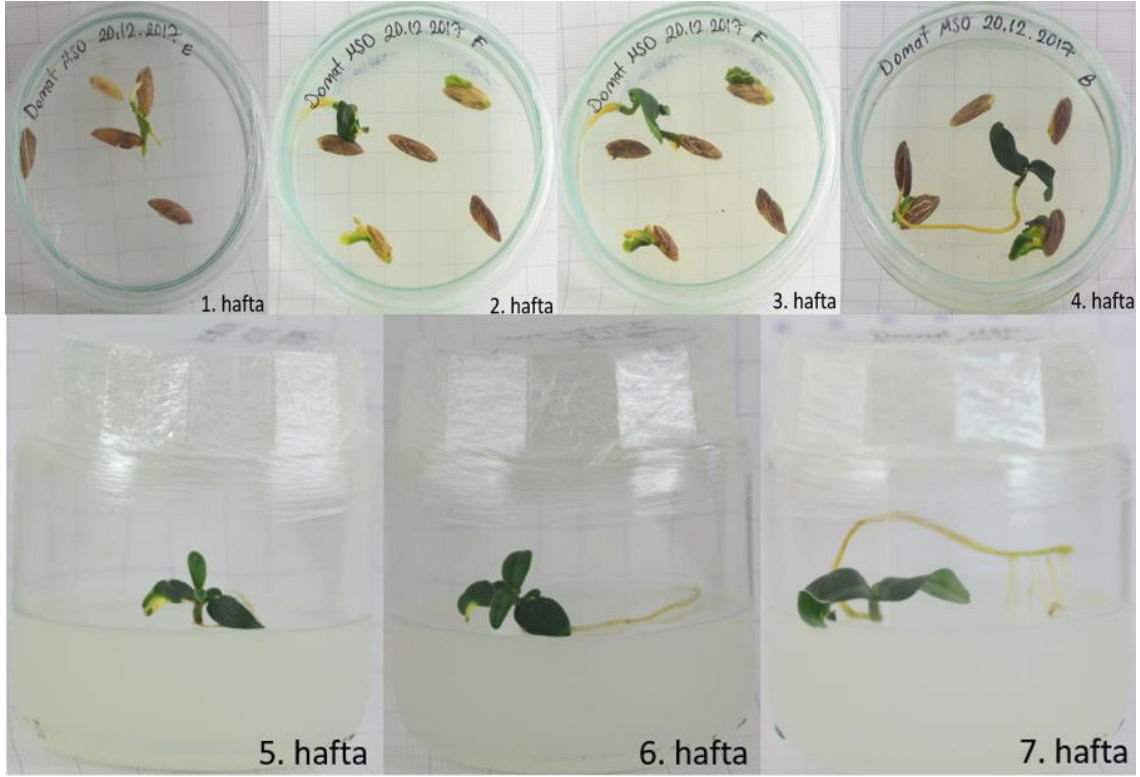
Ayvalık çeşidi embriyolarında uygulama gruplarında internod uzaklıkları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle veri dağılımının homojenitesi belirlenmiştir. Bu uygulamada verilerin homojen dağıldığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,445>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası fark Sig:0,016<0,05 olduğu için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (df:6; F:2,613; p<0,05). Bu aşamadan sonra Tukey testi ile aralarında anlamlı fark çıkan grupların toplamda 2 farklı alt gruba bölündüğü gözlenmiştir. Birinci grupta kontrol, *rac*-GR24 1, 5 ve 10 μM ile TIS108 5 ve 10 μM uygulamaları bulunurken, ikinci grupta ise kontrol, *rac*-GR24 1 ve 10 μM ile TIS108 1, 5 ve 10 μM uygulamaları bulunmaktadır. Buna göre *rac*-GR24’ün 5 μM ve TIS108’in 1 μM uygulamalarının sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak bununla beraber kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olan uygulama grubu bulunmamaktadır.

Ayvalık tohumlarından yetişen bitkilerde internod uzaklık ortalamaları *rac*-GR24 uygulamalarında kontrol grubuna göre daha fazladır. Bu ortalamalar doz artışı ile birlikte artmış olsa da, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayvalık embriyolarından gelişen bitkilerde ise *rac*-GR24 uygulaması ile kontrol grubu sonuçları benzerdir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Benzer şekilde çeltik bitkisinde 1 μM GR24 uygulaması sonucunda ise bitki boyunda anlamlı bir değişim olmamış (Nakamura ve ark., 2013), 2 μM GR24 uygulaması sonucunda ise bitki boyu artmıştır (Umehara ve ark., 2008). Bezelyede ise 3 μM GR24 uygulandığı zaman internod mesafesinin artışının anlamlı olmadığı görülmüştür (de Saint Germain ve ark., 2013).

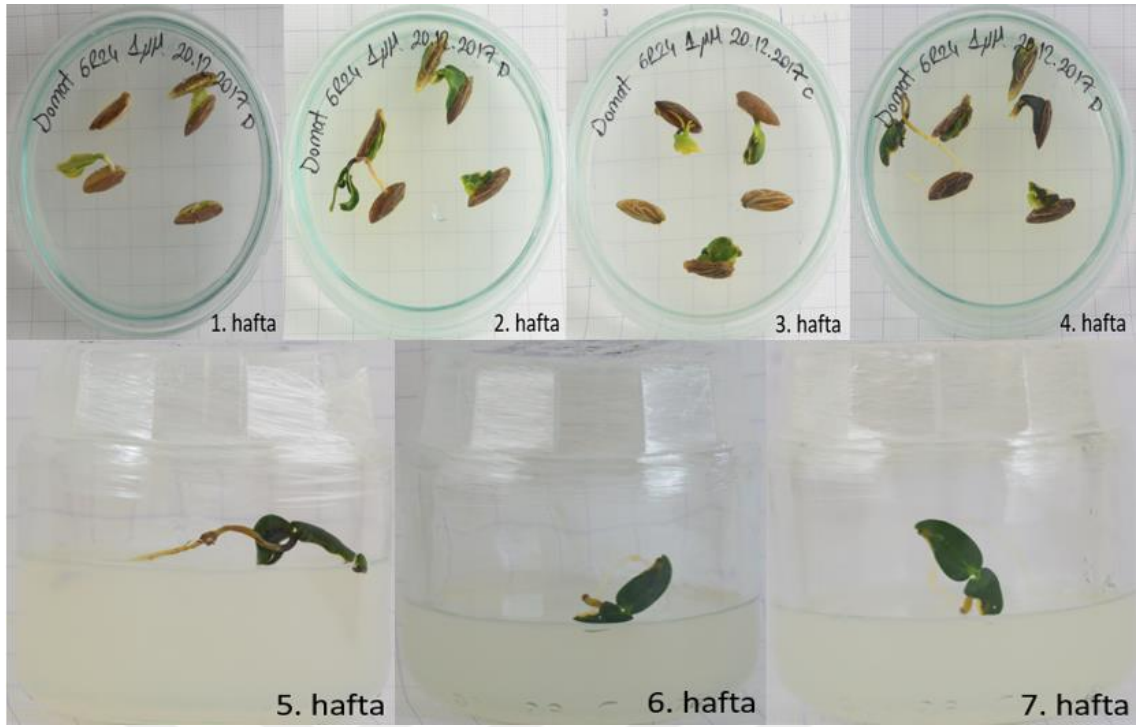
Ayvalık tohumlarından yetişen bitkilerde internod uzaklık ortalamaları TIS108 uygulamalarında kontrol grubuna göre daha fazladır ancak bu artış anlamlı değildir. Embriyolardan gelişen bitkilerde ise 5 ve 10 μM doz uygulanan gruplarda internod uzaklık ortalamalarının azaldığı görülmüştür. Literatürde SL mutantlarında internod mesafelerinin ya da bitki boylarının WT bitkilere oranla azaldığı, petunya (Napoli, 1996; Snowden ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007), bezelye (Beveridge ve ark., 1996, 1997; de Saint Germain ve ark., 2013), çeltik (Arite ve ark., 2007, 2012; Lin ve ark., 2009), mısır (Guan

ve ark., 2012) ve *Lotus japonicus* (Liu ve ark., 2013) bitkilerinde bildirilmiştir.

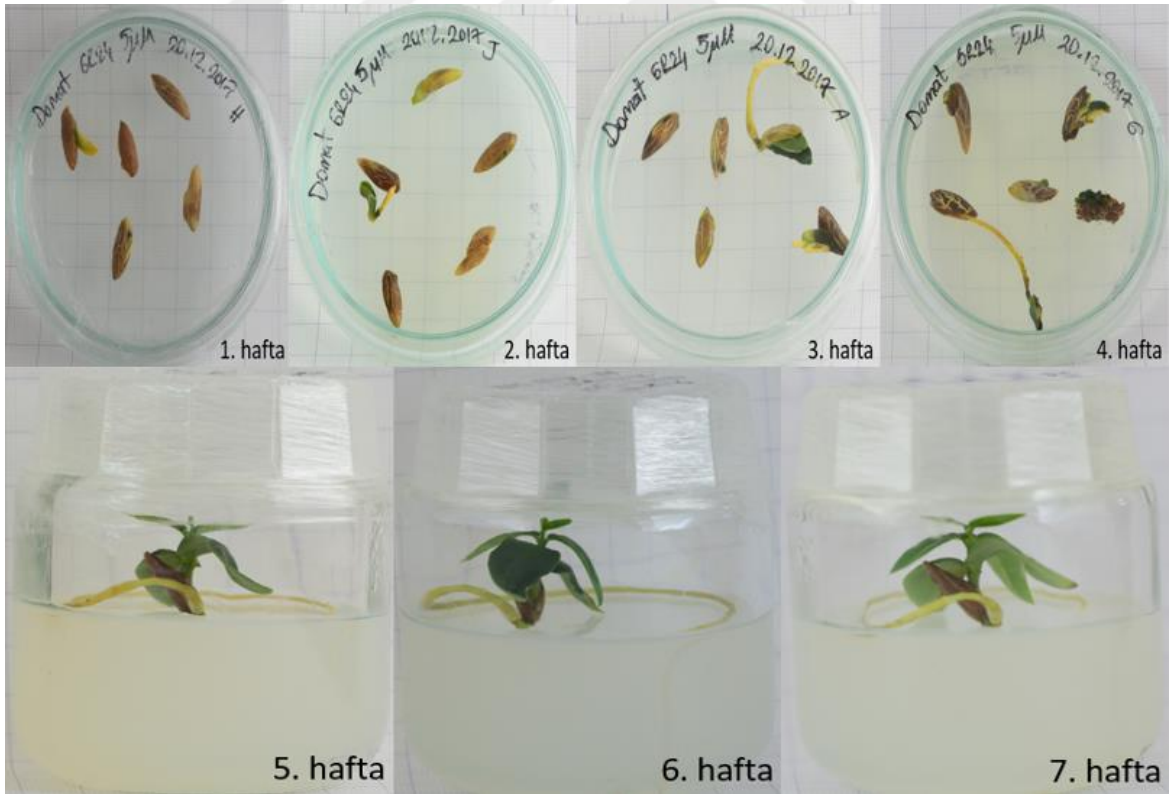
Domat Çeşidi Yan Dal Sayıları ve İnternod Uzunlukları: Domat çeşidinde tohum ve embriyolardan çimlenen bitkilerin gelişimleri doku kültürü şartlarında 8. hafta süre ile takip edilerek fotoğrafları kaydedilmiştir (Şekil 4.97Şekil 4.110).



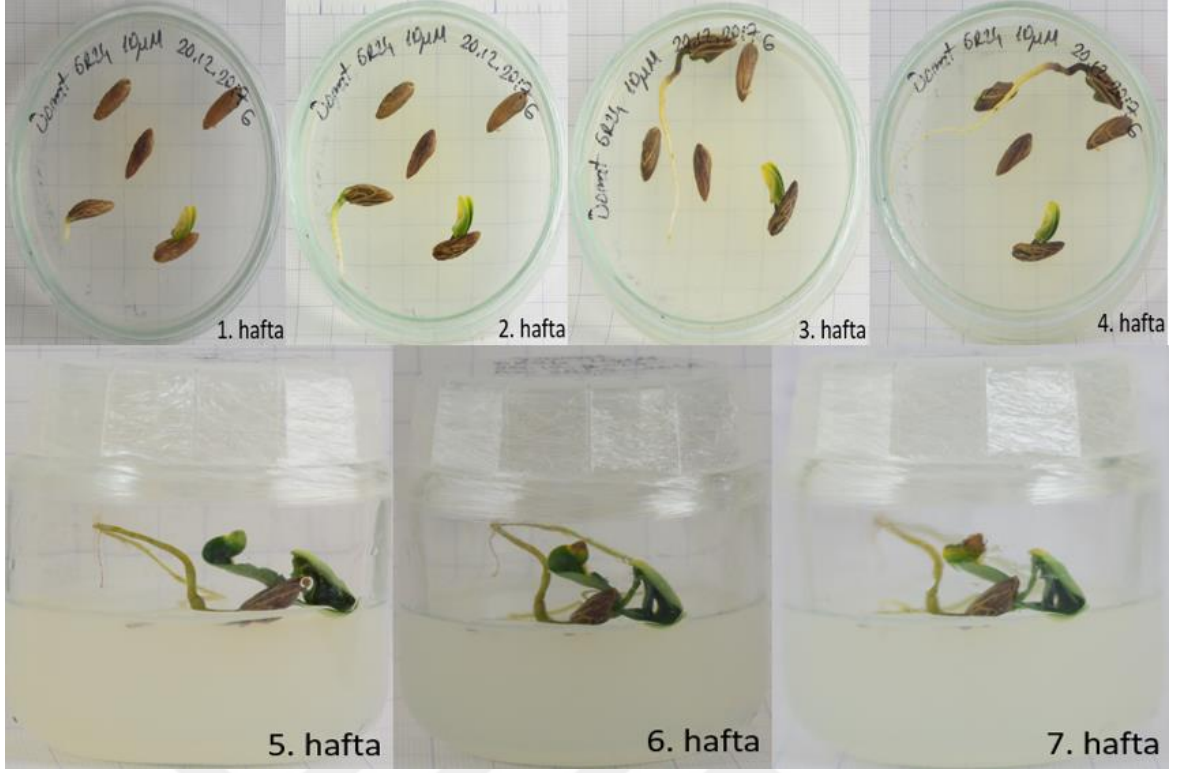
Şekil 4.97. Domat tohumlarının MS0 besi ortamında gelişimi



Şekil 4.98. Domat tohumlarının *rac*-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



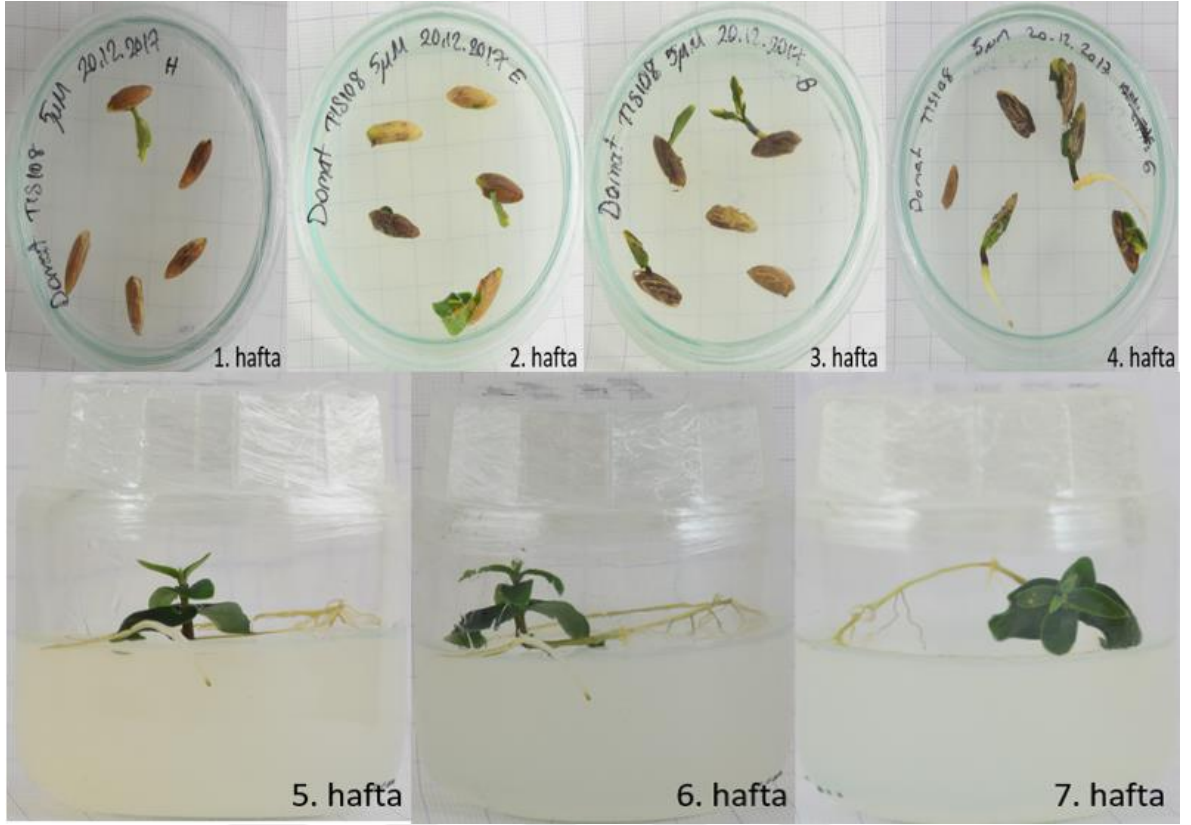
Şekil 4.99. Domat tohumlarının *rac*-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



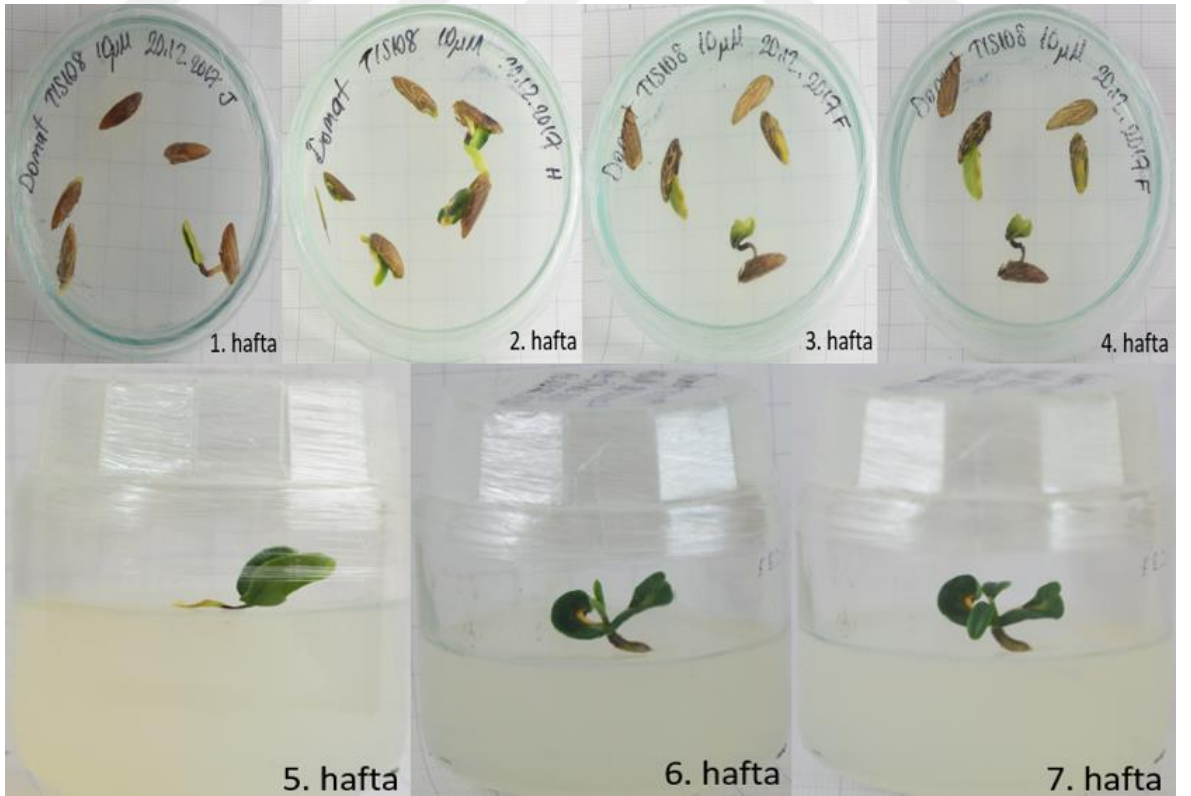
Şekil 4.100. Domat tohumlarının *rac*-GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



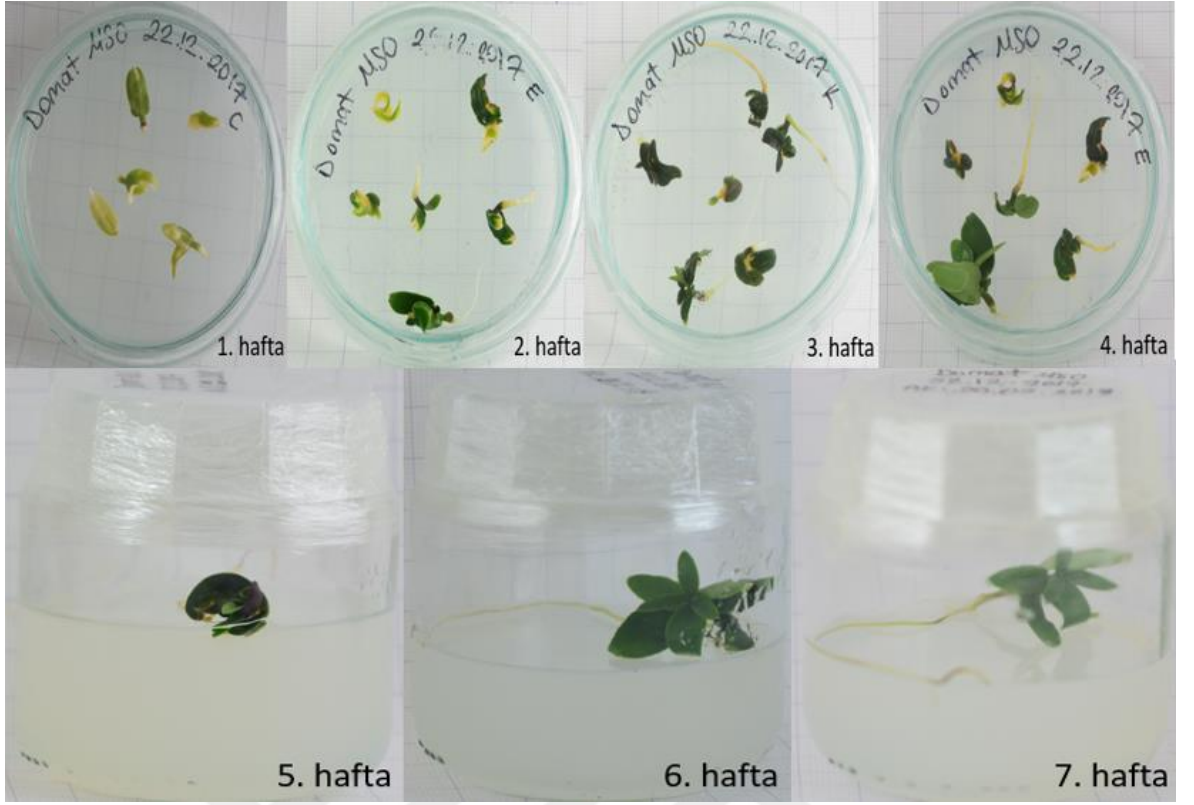
Şekil 4.101. Domat tohumlarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



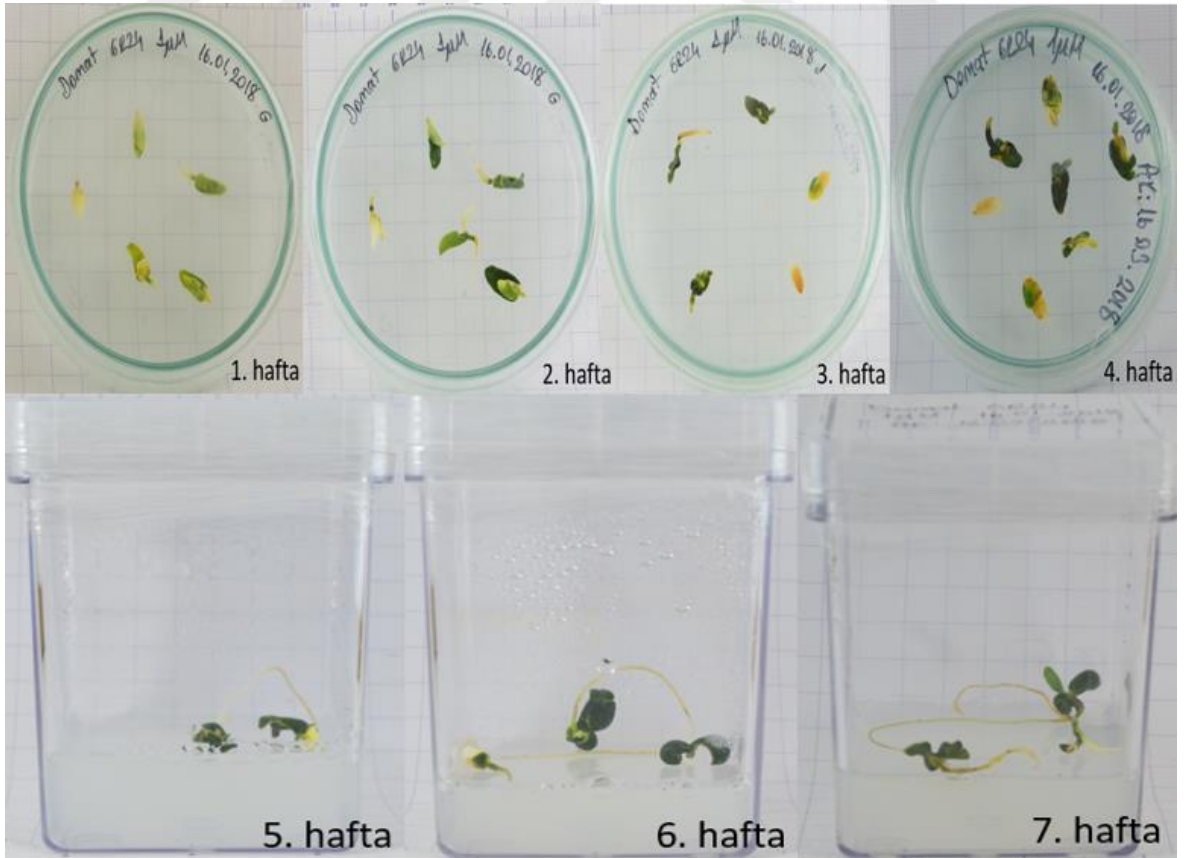
Şekil 4.102. Domat tohumlarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



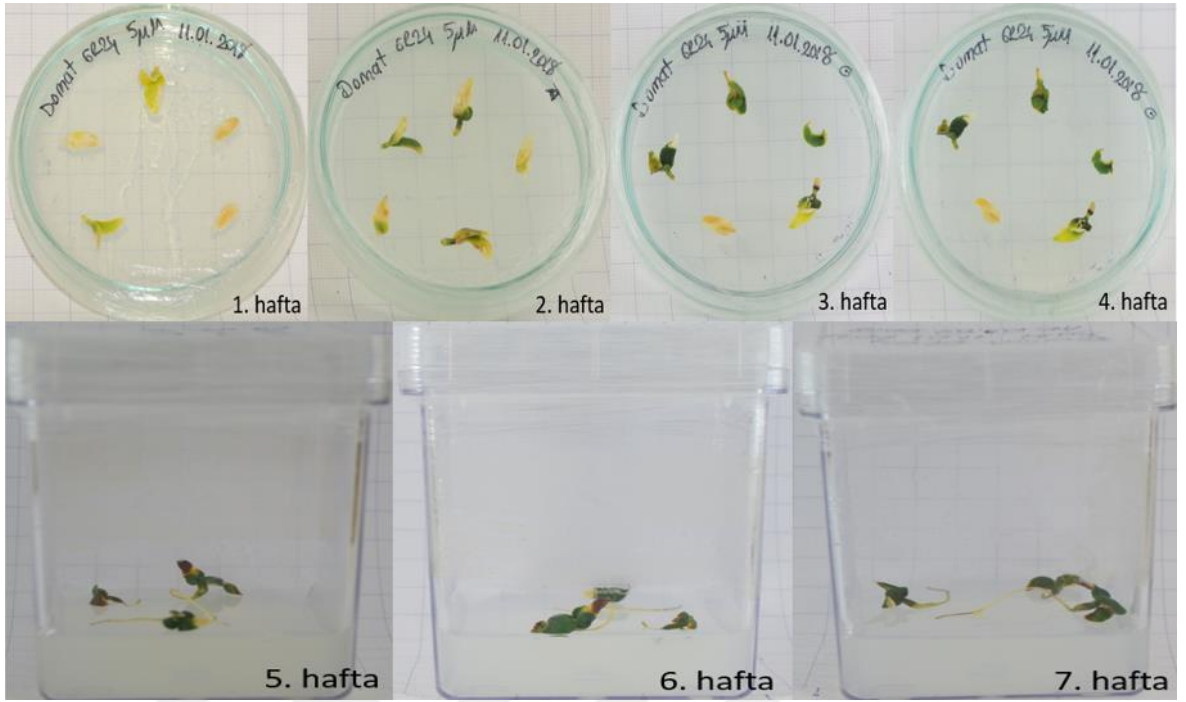
Şekil 4.103. Domat tohumlarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



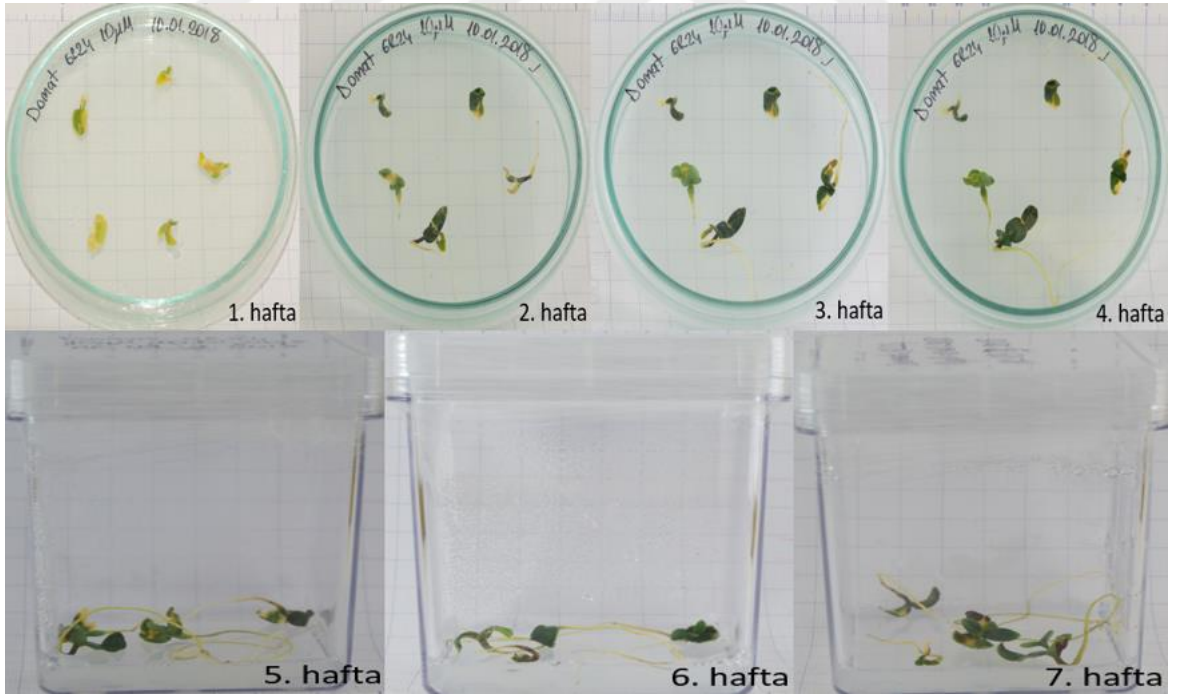
Şekil 4.104. Domat embriyolarının MS0 besi ortamında gelişimi



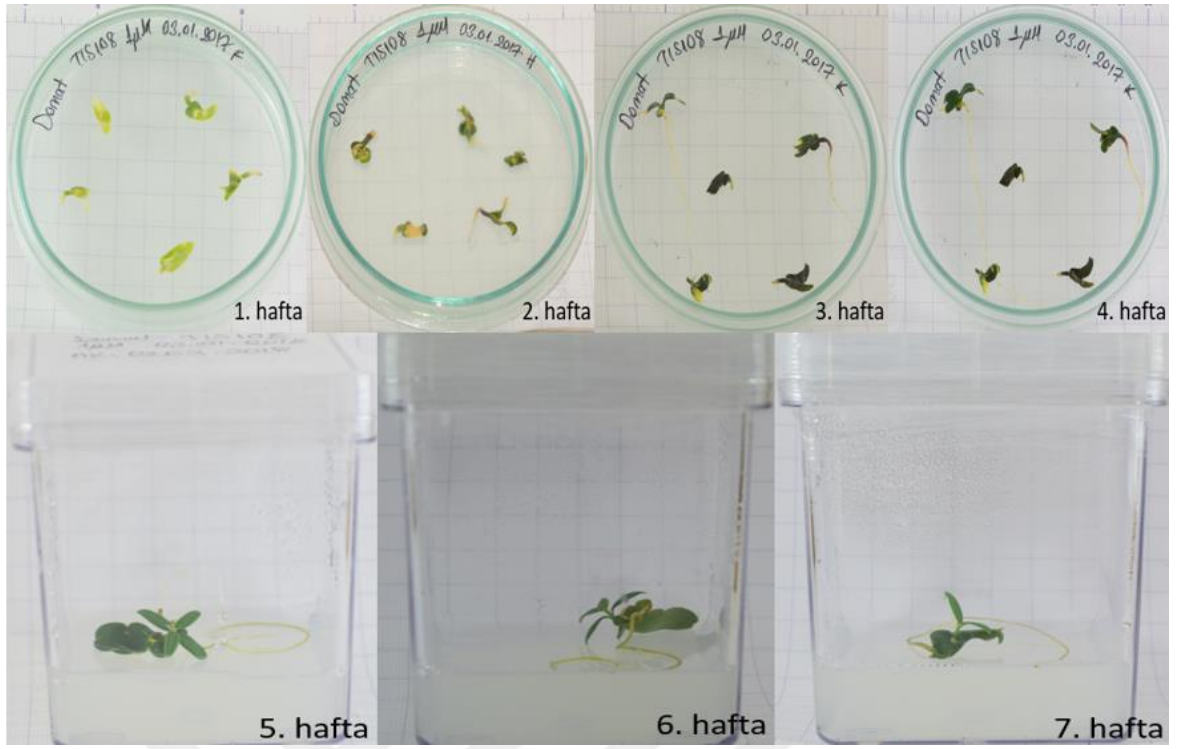
Şekil 4.105. Domat embriyolarının *rac*-GR24 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.106. Domat embriyolarının *rac*-GR24 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



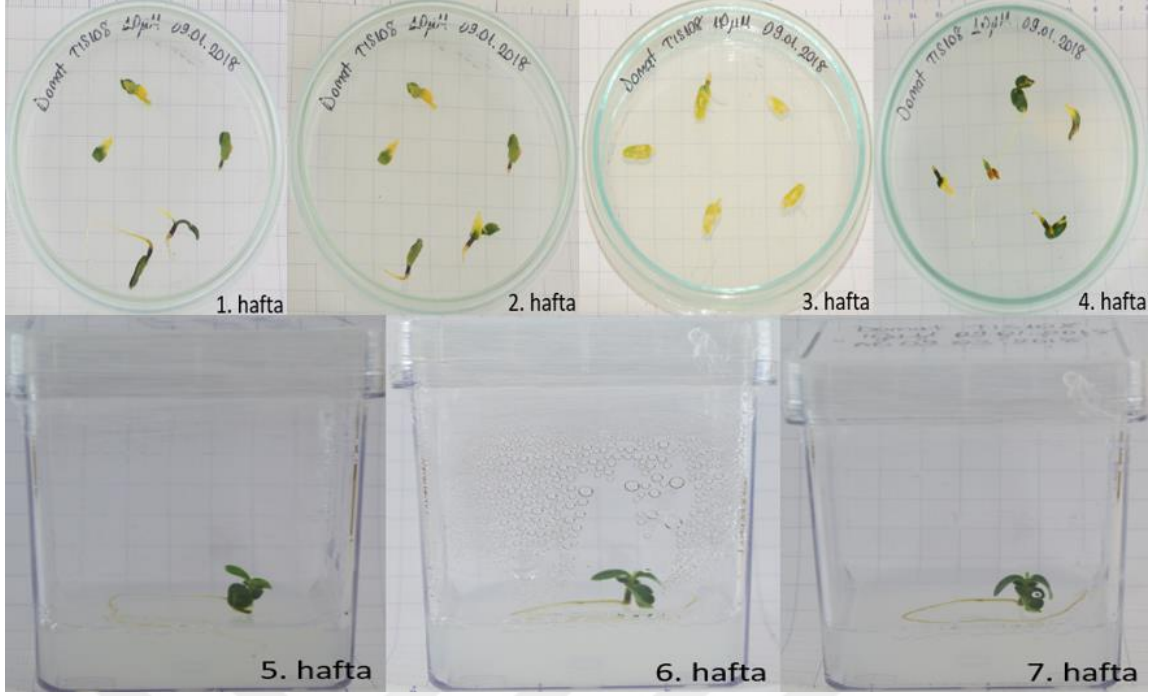
Şekil 4.107. Domat embriyolarının *rac*-GR24 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.108. Domat embriyolarının TIS108 1µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.109. Domat embriyolarının TIS108 5µM uygulanmış besi ortamında gelişimi



Şekil 4.110. Domat embriyolarının TIS108 10µM uygulanmış besi ortamında gelişimi

Çalışmada Domat çeşidine ait tohum ve embriyolardan gelişen bitkiler, kültürün 8. haftası sonunda torf/perlit karışımı içeren viyollerde dış ortama alıştırılmıştır. Bu ortamlarda 24 haftanın sonunda ise tohum (Şekil 4.111) ve embriyolardan (Şekil 4.112) gelişen bitkilerin oluşturdukları yan dalların sayısı ve internod mesafeleri belirlenmiştir.

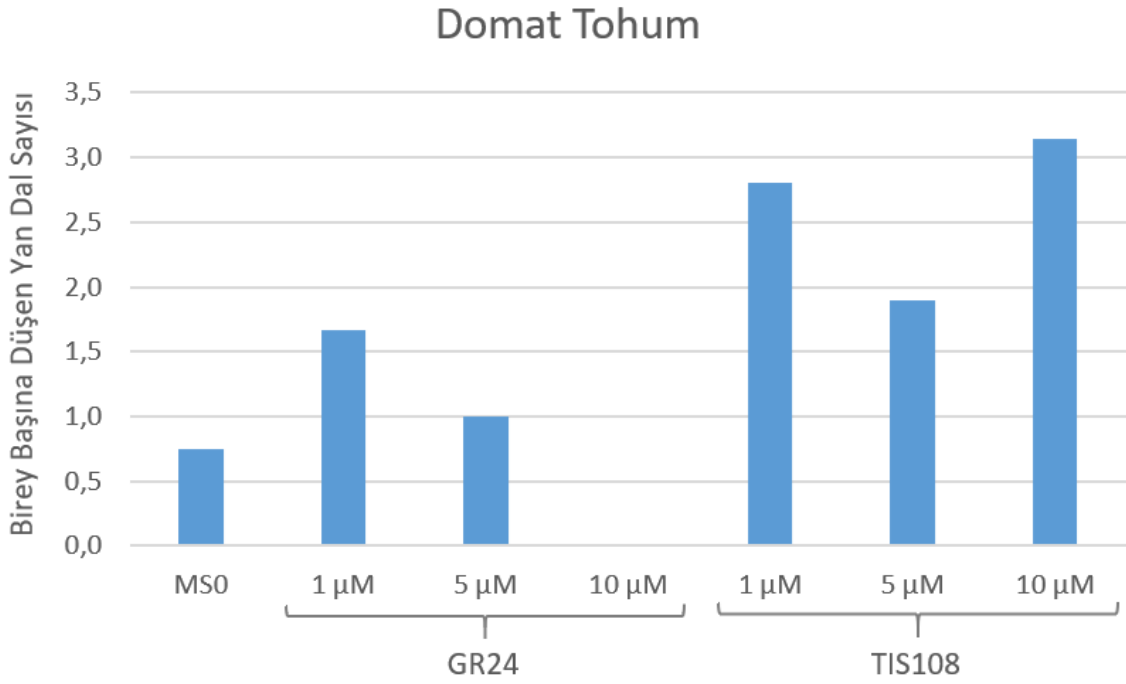


Şekil 4.111. Domat çeşidine ait tohumlardan gelişen 6 aylık bitkiler



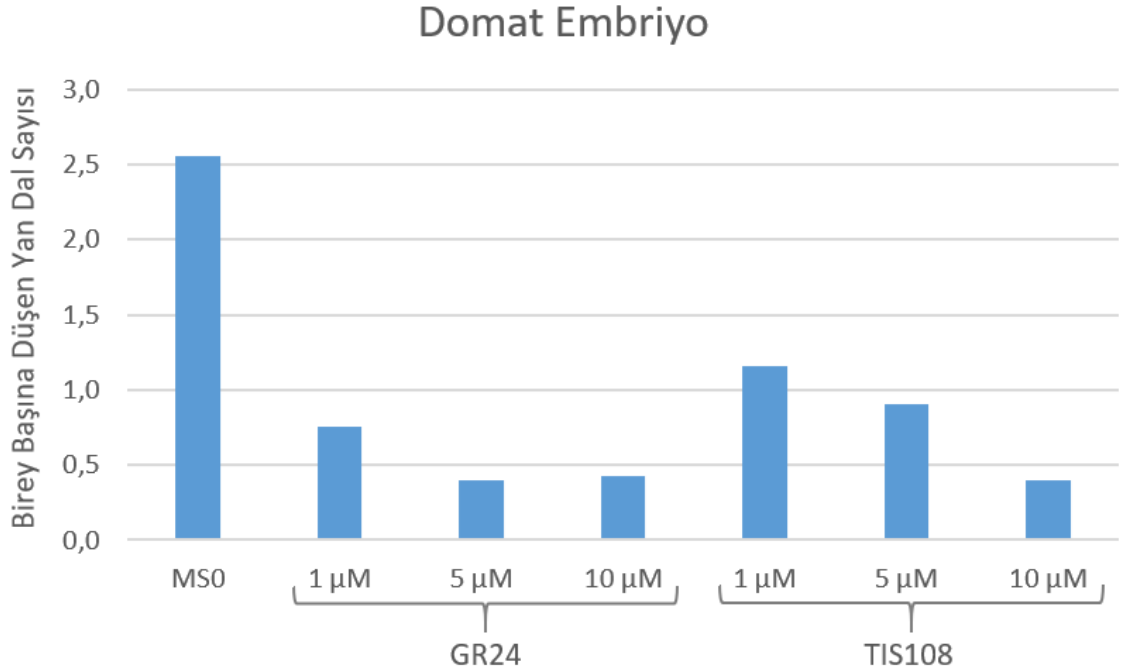
Şekil 4.112. Domat çeşidine ait embriyolardan gelişen 6 aylık bitkiler

Çalışmanın bu kısmında, *rac*-GR24 ve TIS108'in Domat çeşidi tohum ve embriyolarından gelişen bitkilerde, yan dal oluşturma sayısına etkileri belirlenmiştir. (Şekil 4.113 ve Şekil 4.114)



Şekil 4.113. Tohumlardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,75 olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 1,667, 5 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 1 ve 10 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0 iken, 1 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 2,8, 5 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 1,9, 10 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 3,143 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.114. Embriyolardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde birey başına düşen yan dal sayıları

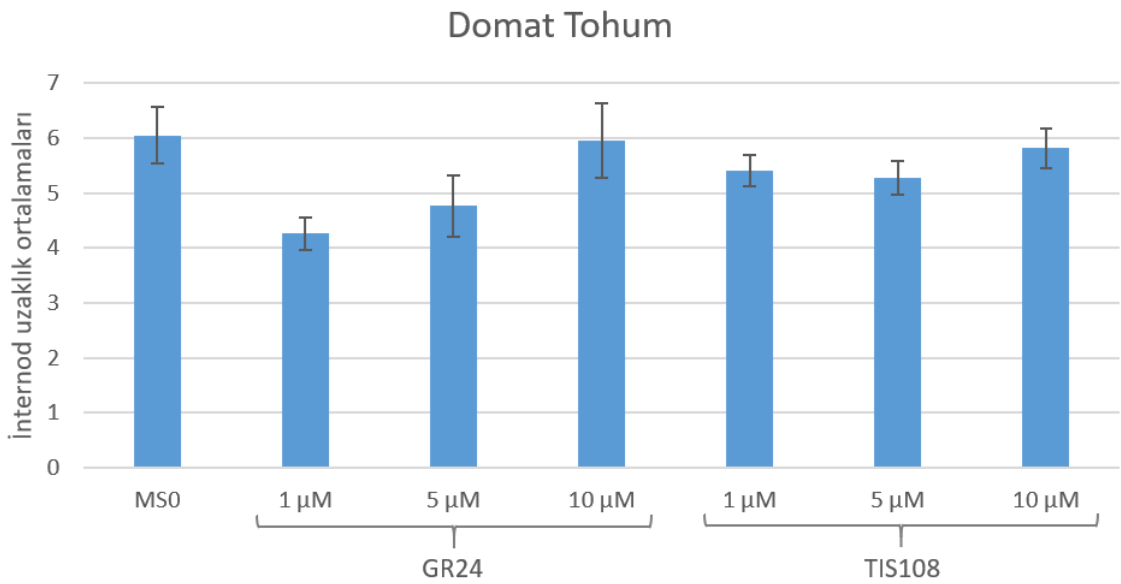
Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 2,56 olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 0,75, 5 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0,4 ve 10 µM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında 0,43 iken, 1 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı 1,16, 5 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,9, 10 µM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında 0,4 olarak tespit edilmiştir.

Domat tohumlarından gelişen bitkilerde *rac*-GR24 uygulamasında yan dallanma doz artışı ile birlikte azalmış olup, 10 µM uygulamasında tamamen baskılanmıştır. Embriyolardan gelişen bitkilerde ise tüm dozlarda dallanma kontrol grubuna göre oldukça azalmıştır. Bu sonuçlara göre GR24 uygulaması ile Domat çeşidinde doku kültürü şartlarında dallanmanın baskılandığı görülmüştür. Literatürde doku kültürü şartlarında 1 ve 5 µM GR24 uygulanan *A. thaliana* bitkisinde dallanma (Crawford ve ark., 2010) ve direkt olarak lateral tomurcuklara 10 µM GR24 uygulanan bezelye bitkisinde lateral tomurcuk gelişimi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Gomez-Roldan ve ark., 2008).

Domat tohumlarından gelişen bitkilerde doku kültürü ortamında TIS108 uygulamalarında tüm gruplarda birey başına düşen yan dal sayısı kontrol grubuna göre

artmıştır. Benzer şekilde *A. thaliana* bitkisi ile yapılan çalışmada ise 1 ve 3 μM TIS108 uygulaması dallanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Ito ve ark., 2013). Embriyolardan gelişen bitkilerde ise tüm TIS108 uygulama dozlarında dallanmada azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre SL inhibitörü olan TIS108 Domat zeytin çeşidinde doku kültüründe tohumdan gelişen bitkilerde dallanmayı artırırken, embriyodan gelişen bitkilerde ise azaltmıştır.

Yan dal sayılarının belirlenmesinin ardından Ayvalık çeşidinde internod uzaklıkları ölçülmüştür (Şekil 4.115 ve Şekil 4.116).

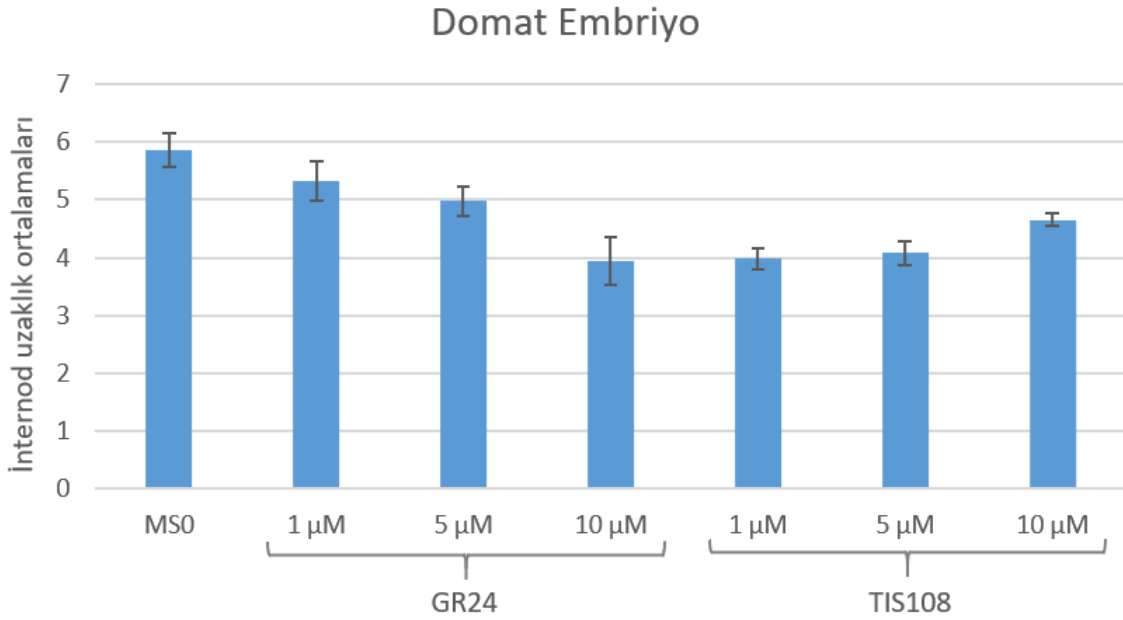


Şekil 4.115. Tohumlardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $6,05 \pm 0,51$ olarak belirlenmiştir. İçerisine 1 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $4,26 \pm 0,3$, 5 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,76 \pm 0,55$, 10 μM *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $5,95 \pm 0,68$ iken, 1 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,41 \pm 0,28$, 5 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $5,27 \pm 0,3$, 10 μM TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $5,81 \pm 0,35$ olarak tespit edilmiştir.

Domat çeşidi tohumlarında uygulama gruplarında internod uzaklıkları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle veri dağılımının

homojenitesi belirlenmiştir. Bu uygulamada verilerin homojen dağılmadığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,015<0,05). Bu nedenle veriler “log” fonksiyonu kullanılarak transforme edilmiş ve homojen hale getirilmiştir (Levene Testi; Sig:0,374>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası fark Sig:0,253>0,05 olduğu için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (df:6; F:1,308; p>0,05).



Şekil 4.116. Embriyolardan gelişen Domat çeşidine ait bitkilerde internod uzaklık ortalamaları (cm, hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir)

Kontrol besin ortamında kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,85 \pm 0,3$ olarak belirlenmiştir. İçerisine $1 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $5,31 \pm 0,33$, $5 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $4,98 \pm 0,25$, $10 \mu\text{M}$ *rac*-GR24 eklenmiş besin ortamlarında $3,94 \pm 0,42$ iken, $1 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında gelişen bitkilerde internod uzaklık ortalaması $3,97 \pm 0,17$, $5 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,07 \pm 0,19$, $10 \mu\text{M}$ TIS108 eklenmiş besin ortamlarında $4,64 \pm 0,1$ olarak tespit edilmiştir.

Domat çeşidi embriyolarında uygulama gruplarında internod uzaklıkları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle veri dağılımının homojenitesi belirlenmiştir. Bu uygulamada verilerin homojen dağıldığı görülmüştür (Levene Testi; Sig:0,108>0,05). Sonrasında “One Way ANOVA” testi ile gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası fark Sig:0,000<0,05 olduğu için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (df:6; F:7,973; p<0,05). Bu aşamadan sonra Tukey testi ile aralarında anlamlı fark çıkan grupların toplamda 3 farklı alt gruba bölündüğü gözlenmiştir. Bu gruplardan ilkinde *rac-GR24* 5 ve 10 µM ile TIS108 1, 5, 10 µM uygulamaları bulunmaktadır. İkinci grupta ise, *rac-GR24* 1 ve 5 µM uygulamaları ile TIS108 5 ve 10 µM uygulamaları vardır. Üçüncü grupta ise kontrol grubunun yanı sıra, *rac-GR24* 1 ve 5 µM uygulamaları ile TIS108 10 µM uygulaması vardır. Bu sonuca göre *rac-GR24* 10 µM ve TIS108 1 ve 5 µM uygulamaları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Domat tohumlarından yetişen bitkilerde internod uzaklık ortalamaları *rac-GR24* uygulamalarında kontrol grubuna oranla daha düşük kalmış ancak doz ile birlikte bir miktar artış görülmüştür. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Internod uzaması hem hücre bölünmesi hem de hücre uzamasına bağlı olarak gerçekleşir ancak, SL'in internod mesafesinin artışıdaki görevi hücre uzaması ile değil, hücre bölünmesi yoluyla hücre sayısını artırması ile ilişkilidir (de Saint Germain ve ark., 2013). Domat embriyolarından gelişen bitkilerde ise *rac-GR24* uygulamalarında internod uzaklık ortalamaları kontrol grubundan genel olarak düşüktür ve GR24 10 µM uygulamasındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır.

Domat tohumlarından yetişen bitkilerde internod uzaklık ortalamaları TIS108 uygulamalarında kontrol grubu ile benzerdir ve aralarında anlamlı bir fark yoktur. Embriyolardan gelişen bitkilerde ise 1 ve 5 µM dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir baskılanma meydana gelmiştir. Literatürde bulunan önceki çalışmalarda da benzer şekilde SL biyosentez veya sinyalizasyon mutantlarında internod mesafelerinin ya da bitki boylarının WT bitkilere oranla azaldığı, petunya (Napoli, 1996; Snowden ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007), bezelye (Beveridge ve ark., 1996, 1997; de Saint Germain ve ark., 2013), çeltik (Arite ve ark., 2007, 2012; Lin ve ark., 2009), mısır (Guan ve ark., 2012) ve *Lotus japonicus* (Liu ve ark., 2013) gibi bitkilerde gösterilmiştir.

4.5. Ayvalık ve Domat Çeşitlerinde Çelik Köklendirme Çalışmaları

Zeytin genellikle çelikleme yolu ile çoğaltılan bir bitkidir. Bu tez çalışmasında çelikle çoğaltımı sırasında kolay köklenen Ayvalık ile zor köklenen Domat çeşitlerinin köklenme başarıları üzerine SL'in etkileri araştırılmıştır. Bunun için çeliklerin kesik yüzeylerine 1, 5 ve 10 µM dozlarda *rac-GR24* ve TIS108 çeliklere uygulanmış ve uygulama yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Çalışma, her çeşit için 7 grup

ve her grupta da 100'er adet çelik ile yapılmıştır. Uygulama 10 hafta devam ettirilmiş ve bu sürenin sonunda öncelikle kallus oluşturan çelikler sayılmıştır (Şekil 4.117 ve Çizelge 4.7).



Şekil 4.117. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde kallus oluşturan bazı çelikler

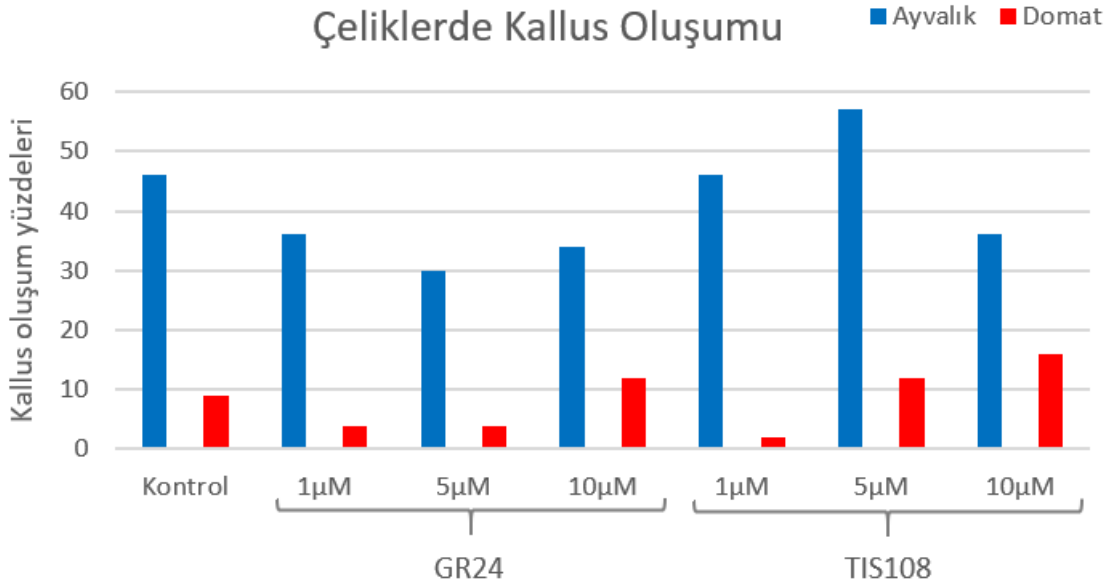
Çizelge 4.7. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde gözlenen kallus sayıları

	Kontrol	<u>rac-GR24</u>			<u>TIS108</u>		
Ayvalık		1µM	5µM	10µM	1µM	5µM	10µM
Toplam Çelik Sayısı	100	100	100	100	100	100	100
Kallus Oluşturan Çelik Sayısı	46	36	30	34	46	57	36
	Kontrol	<u>rac-GR24</u>			<u>TIS108</u>		
Domat		1µM	5µM	10µM	1µM	5µM	10µM
Toplam Çelik Sayısı	100	100	100	100	100	100	100
Kallus Oluşturan Çelik Sayısı	9	4	4	12	2	12	16

Çalışmada 10 haftanın sonunda Ayvalık çeşidi kontrol grubundaki çeliklerde kallus oluşturma oranı %46 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde kallus oluşturma oranı %36, 5 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %30, 10 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %34 iken, 1 µM TIS108 uygulanan çeliklerde kallus oluşturma oranı %46, 5 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %57, 10 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %36 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.118).

Domat çeşidinde ise kontrol grubundaki çeliklerde kallus oluşturma oranı %9 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde kallus oluşturma oranı %4, 5 µM *rac*-

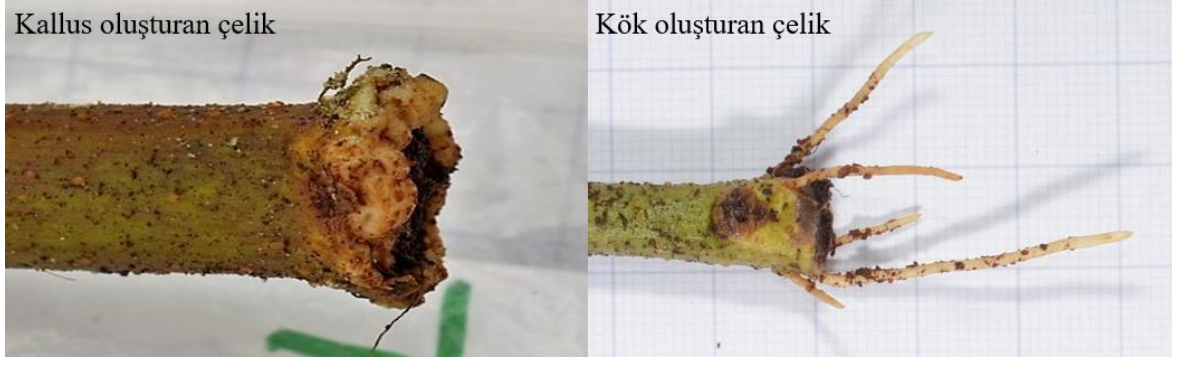
GR24 uygulanan çeliklerde %4, 10 μ M *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %12 iken, 1 μ M TIS108 uygulanan çeliklerde kallus oluşturma oranı %2, 5 μ M TIS108 uygulanan çeliklerde %12, 10 μ M TIS108 uygulanan çeliklerde %16 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.118).



Şekil 4.118. Ayvalık ve Domat çeliklerinde kallus oluşum oranları

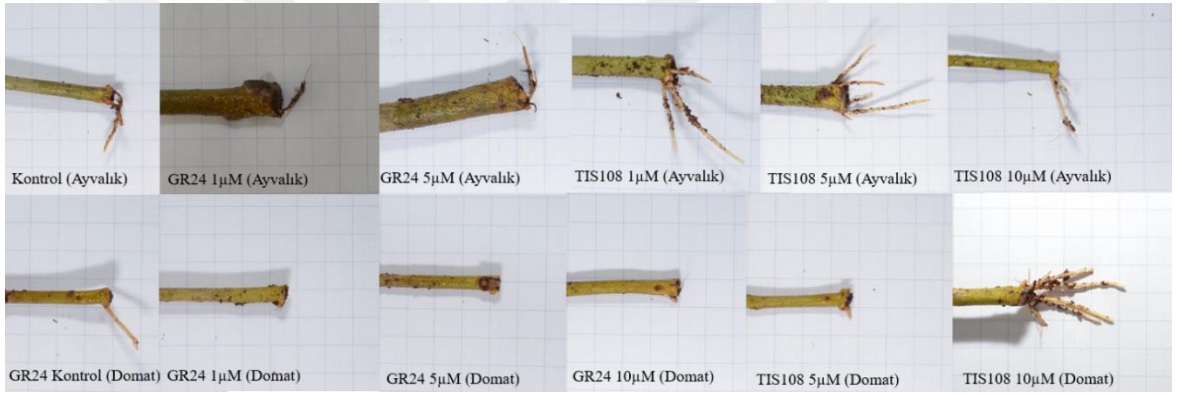
Çalışmada Ayvalık çeşidinde tüm *rac*-GR24 uygulamalarında çeliklerde kallus oluşma oranlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın 5 μ M TIS108 uygulamasının kallus oluşumunu arttırdığı belirlenmiş, 10 μ M TIS108'in ise baskılayıcı bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Domat çeşidinde ise, 1 ve 5 μ M *rac*-GR24, kontrol grubuna göre kallus oluşumunu azaltmış 10 μ M *rac*-GR24 ise arttırmıştır. Domat çeşidinde 5 ve 10 μ M TIS108 uygulamaları kontrole göre kallus oluşturan çelik sayısını arttırmıştır. Böylece, TIS108 uygulamalarında artan doza bağlı olarak kallus oluşturan çelik sayısının arttığı görülmüştür.

Bu sonuçlara göre kolay köklenen Ayvalık çeşidinde en başarılı sonuç 5 μ M TIS108 uygulanmış çeliklerden alınmış olup, çeliklerin %57'sinde kallus oluşmuştur. Diğer taraftan, zor köklenen Domat çeşidinde ise en başarılı sonuç 10 μ M TIS108 uygulanmış çeliklerden elde edilmiş olup, çeliklerin %16'sında kallus oluşmuştur. Çeliklerde kallus dokusundan daha sonra kökler oluşmaktadır (Şekil 4.119).



Şekil 4.119. Çeliklerin oluşturduğu kallus ve kök dokuları

Çalışmada daha sonra çeliklerden meydana gelen kökler sayılmıştır. Hem bir çelik üzerindeki kök sayısı, hem de çelik başına düşen kök sayıları da belirlenmiştir (Şekil 4.120 ve Çizelge 4.8)



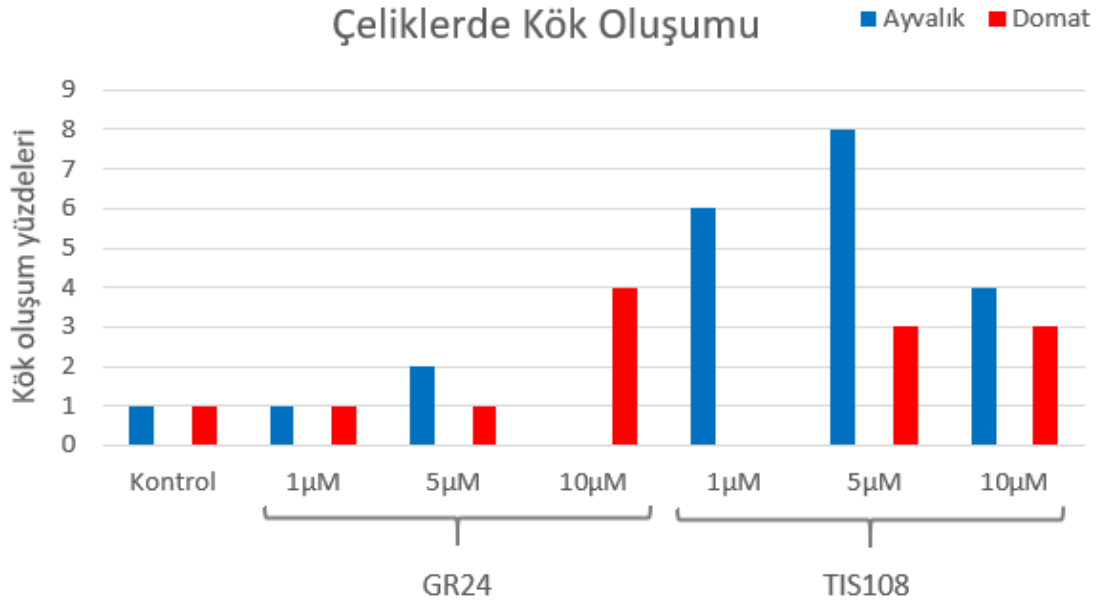
Şekil 4.120. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde kök oluşturan bazı çelikler

Çizelge 4.8. Ayvalık ve Domat çeşitlerinde gözlenen kök sayıları

Ayvalık	Kontrol	<u>rac-GR24</u>			<u>TIS108</u>		
		1µM	5µM	10µM	1µM	5µM	10µM
Toplam Çelik Sayısı	100	100	100	100	100	100	100
Köklenen Çelik Sayısı	1	1	2	0	6	8	4
Çeliklerdeki Kök Sayıları	2	1	2-1	0	4-2-1-1-1-1	5-5-3-2-2-1-1-1	3-2-2-1
Çelik Başına Düşen Kök Sayısı	2	1	1,5	0	1,66	2,5	2
Domat	Kontrol	<u>rac-GR24</u>			<u>TIS108</u>		
		1µM	5µM	10µM	1µM	5µM	10µM
Toplam Çelik Sayısı	100	100	100	100	100	100	100
Köklenen Çelik Sayısı	2	1	1	4	0	3	3
Çeliklerdeki Kök Sayıları	1-1	1	1	1-1-1-1	0	1-1-1	6-2-1
Çelik Başına Düşen Kök Sayısı	1	1	1	1	0	1	3

Çalışmada 10 haftanın sonunda Ayvalık çeşidi kontrol grubundaki çeliklerde kök oluşturma oranı %1 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde kök oluşturma oranı %1, 5 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %2, 10 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %0 iken, 1 µM TIS108 uygulanan çeliklerde kök oluşturma oranı %6, 5 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %8, 10 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %4 olarak tespit edilmiştir.

Domat çeşidi kontrol grubundaki çeliklerde kök oluşturma oranı %2 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde kök oluşturma oranı %1, 5 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %1, 10 µM *rac*-GR24 uygulanan çeliklerde %4 iken, 1 µM TIS108 uygulanan çeliklerde kök oluşturma oranı 0, 5 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %3, 10 µM TIS108 uygulanan çeliklerde %3 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.121).

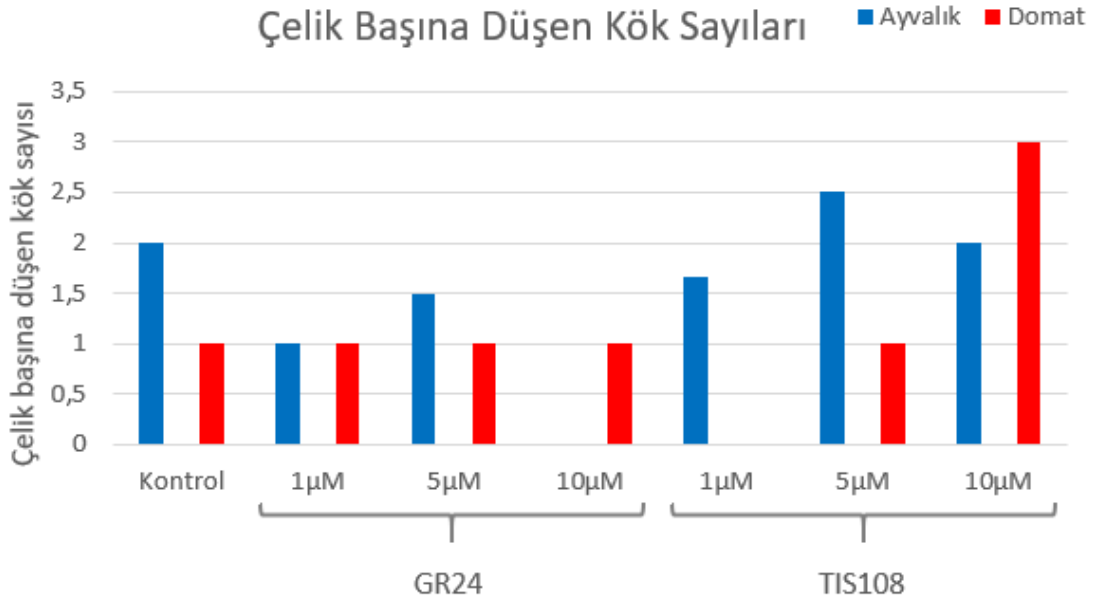


Şekil 4.121. Ayvalık ve Domat çeliklerinde kök oluşum oranları

Ayvalık çeşidinde *rac*-GR24 uygulamasında kök oluşum oranları kontrol grubu ile benzerdir. Yalnızca *rac*-GR24 10 µM uygulamasında hiç köklenme gözlenmemiştir. TIS108 uygulamasında ise kontrol grubuna göre kök oluşturma oranında artış görülmüştür. Domat çeşidinde *rac*-GR24 uygulamasında yalnızca 10 µM uygulamasında kök oluşturan çelik sayısı kontrol grubuna göre artmıştır. TIS108 uygulamasında ise 1 µM dozda köklenme görülmezken, 5 ve 10 µM uygulamalarında kontrol grubuna göre kök oluşum oranında artış görülmüştür.

Çalışmada Ayvalık çeşidi kontrol grubunda çelik başına düşen kök sayısı 2 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta çelik başına düşen kök sayısı 1, 5 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta 1,5 ve 10 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta 0 iken, 1 µM TIS108 uygulanan grupta çelik başına düşen kök sayısı 1,66, 5 µM TIS108 uygulanan grupta 2,5 ve 10 µM TIS108 uygulanan grupta 2 olarak tespit edilmiştir.

Domat çeşidi kontrol grubunda çelik başına düşen kök sayısı 1 olarak belirlenmiştir. 1 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta çelik başına düşen kök sayısı 1, 5 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta 1 ve 10 µM *rac*-GR24 uygulanan grupta 1 iken, 1 µM TIS108 uygulanan grupta çelik başına düşen kök sayısı 0, 5 µM TIS108 uygulanan grupta 1 ve 10 µM TIS108 uygulanan grupta 3 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.122).



Şekil 4.122. Ayvalık ve Domat çeliklerinde çelik başına düşen kök sayıları

Ayvalık çeşidinde çelik başına düşen kök sayıları incelendiğinde *rac*-GR24 1 ve 5 μ M uygulamalarında kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. *rac*-GR24 10 μ M uygulamasında ise hiç köklenme gözlenmemiştir. SL'in adventif köklenmeyi baskıladığı domates, *A. thaliana*, bezelye gibi bitkilerde gösterilmiştir (Kohlen ve ark., 2012; Rasmussen ve ark., 2012). Ayvalık zeytin çeşidinde elde edilen sonuçlara göre de *rac*-GR24 uygulaması ile çelik başına düşen kök sayısının azaldığı görülmüştür. SL'in bu baskılayıcı özelliğinin direkt mi yoksa indirekt mi olduğu belirsizdir (Kohlen ve ark., 2012). Bu özelliğin, adventif köklenmeyi teşvik eden oksin hormonunun (Pop ve ark., 2011), bitkinin alt kısımlarına taşınmasının SL sebebiyle azalması (Bennett ve ark., 2006; Crawford ve ark., 2010; Shinohara ve ark., 2013) nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir (Rasmussen ve ark., 2012). *A. thaliana* ve bezelyede ise adventif kök oluşması beklenen dokuda hücre bölünmesi ya da farklılaşmasının azalmasının, SL'in organogenezi kısıtladığına işaret ettiği belirtilmiştir (Rasmussen ve ark., 2012). TIS108 uygulamalarında ise 5 μ M uygulamasında kontrol grubuna oranla artış belirlenmiştir. Petunya, domates, *A. thaliana*, bezelye SL mutantlarında adventif köklenmenin arttığı görülmüştür (Napoli, 1996; Kohlen ve ark., 2012; Rasmussen ve ark., 2012). Ayrıca *Lotus japonicus* bitkisinde de max3 mutantında, WT bitkide gözlenmediği halde adventif köklenme gözlenmiştir (Liu ve ark., 2013). Domates bitkisinde de max4 mutantlarında kök taslağı dokusunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Kohlen ve ark., 2012). Domat zeytin çeşidinde ise *rac*-GR24 uygulamalarında sonuçlar kontrol grubu ile benzerdir ancak

yalnızca 10 μ M TIS108 uygulandığında elik başına düşen kök sayısının kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre SL inhibitörü olan TIS108'in Domat çeşidinde adventif köklenmeyi arttırmak için bir alternatif olup olamayacağının belirlenmesi için daha detaylı analizlere ihtiyaç vardır. Çünkü IBA uygulamaları ile Domat çeşidindeki elik köklenme sorunları halen çözülememiştir (İsfendiyaroğlu ve Özeke, 2008).

Bu sonuçlara göre hem kallus hem de kök oluşturma açısından Ayvalık çeşidi Domat çeşidine oranla daha iyi sonuçlar vermiştir. *rac*-GR24 ile TIS108 uygulamaları kıyaslandığında ise kallus ve kök oluşumu açısından TIS108'in daha olumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir.



BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Strigolaktonlar (SL) karotenoidlerden üretilen, hem bitki köklerinden rizosfere salınarak parazit bitki tohumları veya arbüsküler mikorizal funguslar için sinyal molekülü görevi gören metabolitler hem de endojen olarak görev yapan fitohormonlardır. SL'in içsel bir şekilde bitki hormonu olarak görev yaptığı ve bitkilerde gövde dallanmasını baskıladığı ilk olarak bezelye, çeltik ve *A. thaliana* bitkilerinde gösterilmiştir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). SL, bitkilerde dallanmayı kontrol etmek dışında primer kök uzunluğunun artması, adventif kök oluşumunun baskılanması, internod mesafesinin uzaması gibi birçok süreçte görev almaktadırlar (Ruyter-Spira ve ark., 2011; Guan ve ark., 2012; Kohlen ve ark., 2012; Rasmussen ve ark., 2012; de Saint Germain ve ark., 2013).

Zeytin (*Olea europaea* L.) bitkisi hem sofralık hem de yağlık olarak kullanılabilen ticari öneme sahip bir tarım ürünüdür ve Türkiye zeytin üretimi konusunda dünyada önde gelen ülkelerden biridir. SL, birçok bitkide çalışılmış olsa da ağaç türleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Literatürde zeytin bitkisi ve SL ilişkisi hakkında bir yayın bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye'nin yüksek kaliteli zeytinyağının üretildiği Ayvalık çeşidi kullanılmıştır. Ayvalık çeşidinde SL biyosentezi, algılanması ve sinyal iletiminden sorumlu olan genlerin moleküler karakterizasyonları yapılmış, bu genlerin farklı Ayvalık dokularındaki anlatımları belirlenmiştir. Ülkemizdeki önemli bir sofralık yeşil zeytin çeşidi olan Domat çeşidinin ise çelikle üretiminde köklenme sorunları olduğu bilinmektedir (Özkaya ve Çelik, 1994; Fabbri ve ark., 2004; Çetintaş Gerrakakis ve Özkaya, 2005; İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2008). Bu nedenle bu tez çalışmasında Ayvalık ve Domat çeşitleri ile doku kültürü ve çelik köklendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çeşitlerin hem *in vitro* şartlarda tohum ve embriyoların çimlenme ve kök oluşturma oranları ile gövde dal sayısı ve internod uzunlukları, hem de *in vivo* şartlarda çeliklerin köklenmesi üzerine bir SL analogu olan *rac*-GR24 ve SL inhibitörü TIS108'in etkileri belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca Ayvalık çeşidinde, SL biyosentezinin gerçekleştiği kökler kullanılarak SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu olan genlere (*D27*, *MAX3*, *MAX4*, *MAX1*, *D14* ve *MAX2*) ait transkript dizilimleri RACE yöntemi ile ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Buna göre *D27* için 801 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan 253 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. *MAX3* için ise 1881 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan

437 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. *MAX4* için ise 1603 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan 418 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. *MAX1* için ise 1688 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan 449 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. *D14* için ise 1013 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan 266 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. *MAX2* için de 2265 bç uzunluğunda bir mRNA tespit edilmiş ve bu mRNA'dan 677 aa'ten oluşan muhtemel bir protein kodlandığı tahmin edilmiştir. Bu mRNA dizileri diğer bitki türlerinde bilinen SL biyosentez, algılama ve sinyal iletiminden sorumlu gen dizileri ile yüksek oranda benzerlik göstermekte olup, muhtemel protein dizilerinde de aynı korunmuş domainler bulunmuştur.

Ayvalık çeşidine ait transkript dizilerinin belirlenmesinden sonra bu genlerin apikal ve lateral tomurcuk ile kök ve yaprak dokularındaki anlatımları SYBR Green I metodu ile Gerçek Zamanlı PZR ile ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada, SL biyosentezinden sorumlu *D27*, *MAX3*, *MAX4* ve *MAX1* genlerinin en fazla kök dokusunda ifade edildiği belirlenmiş olup bu sonuç, zeytin bitkisinde de diğer türlerde olduğu gibi SL biyosentezinin köklerde gerçekleştiğini göstermektedir (Beveridge ve ark., 1996; Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1997; Morris ve ark., 2001; Turnbull ve ark., 2002; Booker ve ark., 2005; Simons ve ark., 2007). SL algılanmasından sorumlu *D14* ve sinyal iletiminden sorumlu *MAX2* genlerinin anlatımları ise en fazla lateral tomurcuk dokusunda tespit edilmiş olup bu sonuç, SL'nin zeytin bitkisinde de diğer türlerde olduğu gibi gövdenin dallanmasını kontrol edebileceğini işaret etmektedir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008).

Çalışmada ayrıca yabanıl tip bir zeytin çeşidi olan *Sylvestris* çeşidinde SL biyosentezinden, algılanmasından ve sinyal iletiminden sorumlu olan genlerin genomik, transkript ve protein dizileri biyoinformatik yöntemler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak, *D27* için *Sylvestris* çeşidinde 2 farklı genomik dizi, 4 farklı transkript dizisi ve 4 farklı protein dizisi, *MAX3* için 1 farklı genomik dizi, 2 farklı transkript dizisi ve 2 farklı protein dizisi, *MAX4* için toplamda 2 farklı genomik dizi, 2 farklı transkript dizisi ve 2 farklı protein dizisi, *MAX1* için toplamda 2 farklı genomik dizi, 6 farklı transkript dizisi ve 3 farklı protein dizisi, *D14* için toplamda 4 farklı genomik dizi, 7 farklı transkript dizisi ve 5 farklı protein dizisi, *MAX2* için de toplamda 1 farklı genomik dizi, 1 farklı transkript dizisi ve 1 farklı protein dizisi elde edilmiştir. Bu proteinlerin aa sayıları *A. thaliana* ve domates gibi bitkiler ile benzer olup, aynı korunmuş domainleri taşıdıkları anlaşılmıştır. Ayrıca, genomik bölgeler kullanılarak SL genleri için promotor dizileri de analiz edilmiş

ve toplamda tespit edilen 70 motiftten, 21 tanesinin ışık yanıtı, 12 tanesinin hormon yanıtı ve 9 tanesinin stres yanıtı ile ilişkili oldukları belirlenmiştir.

Çalışmada SL analogu *rac*-GR24 ve SL inhibitörü TIS108'in doku kültürü şartlarında Ayvalık ve Domat çeşitlerine ait tohum ve embriyolardan yetiştirilen bitkilerin çimlenme oranları, kök boyları, dallanma sayıları ve internod uzaklıkları üzerine etkileri de belirlenmiştir.

Ayvalık tohumları ile kurulan *in vitro* deneyde kontrol grubuna oranla *rac*-GR24'ün çimlenme oranını artırmasına rağmen TIS108'in değiştirmedığı bulunmuştur. Ayvalık embriyoları ile kurulan *in vitro* deneyde ise her iki uygulamada çimlenme oranlarının kontrol grubuna göre daha az olduğu, ancak *rac*-GR24'ün artan doza bağlı olarak çimlenmeyi arttırdığı, TIS108'in ise azalttığı görülmüştür. Domat tohumları ile kurulan *in vitro* deneyde kontrol grubuna oranla 10 μ M *rac*-GR24 uygulandığında çimlenme artmış ve 10 μ M TIS108 uygulandığında çimlenme azalmıştır. Domat embriyoları ile kurulan *in vitro* deneyde ise yalnızca 5 μ M TIS108 uygulaması çimlenmeyi artırmıştır.

Ayvalık tohumlarından doku kültürü şartlarında elde edilen bitkilerin kök boylarının, *rac*-GR24 1 ve 10 μ M uygulamalarında ve TIS108'in tüm uygulamalarında kontrole göre daha kısa kaldıkları gözlenmiştir. Ayvalık embriyolarından gelişen bitkilerde ise hem *rac*-GR24 hem de TIS108'in uygulanan tüm konsantrasyonlarında kök boylarının kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Domat tohumlarından doku kültürü şartlarında elde edilen bitkilere 10 μ M *rac*-GR24 uygulandığında kontrole göre kök boyları artmış, 5 ve 10 μ M TIS108 uygulamaları da ise bu oran azalmıştır. Domat embriyolarından gelişen bitkilere *rac*-GR24 uygulandığında ise tüm konsantrasyonlarda kök boyları kontrole göre daha kısa olmuş, TIS108 uygulamalarında ise yalnızca 5 μ M konsantrasyonda artış görülmüştür.

In vitro koşullarda yetiştirilen Ayvalık bitkilerinde birey başına düşen yan dal sayısı üzerine *rac*-GR24'ün yalnızca 5 μ M konsantrasyonda baskılayıcı olduğu, TIS108'in ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda yan dal sayısını teşvik ettiği görülmüştür. Ayvalık embriyolarından gelişen bitkilerde ise her iki uygulamada da yan dal sayısının kontrol grubuna göre daha az olduğu ancak hem *rac*-GR24'ün hem de TIS108'in artan konsantrasyona bağlı olarak dallanmayı teşvik ettiği görülmüştür. Domat tohumlarından gelişen bitkilerde birey başına düşen yan dal sayısı yalnızca *rac*-GR24 10 μ M uygulamasında baskılanmış, TIS108 uygulamalarında ise yan dal sayısının tüm konsantrasyonlarda daha fazla olduğu görülmüştür. Domat embriyolarından gelişen bitkilerde ise her iki uygulamada da yan dal sayısının kontrol grubuna göre daha az olduğu

gözlenmiştir.

Ayvalık tohumlarından ve embriyolarından doku kültürü şartlarında gelişen bitkilerde kontrol grubuna oranla internod uzaklıkları hem *rac*-GR24 hem de TIS108 uygulamalarında benzer sonuçlar vermiş olup, aralarında istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir. Domat tohumlarından gelişen bitkilerde internod uzaklıklarının her iki uygulamada da daha az olduğu görülmüş olmasına rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Domat embriyolarından gelişen bitkilerde ise hem *rac*-GR24 hem de TIS108 uygulamalarında kontrol grubuna göre internod uzaklıkları azalmıştır. Bununla birlikte 10 μ M *rac*-GR24 ile 1 ve 5 μ M TIS108 uygulamalarındaki baskılama istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlara göre SL inhibitörü olan TIS108'in Domat çeşidi embriyolarından gelişen bitkilerde internod uzaklıklarını anlamlı bir şekilde baskılamış olması, SL mutantları ile yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olmasına rağmen 10 μ M TIS108 uygulaması bu durumun dışında kalmıştır (Napoli, 1996; Beveridge ve ark., 1996, 1997; Snowden ve ark., 2005; Arite ve ark., 2007, 2012; Simons ve ark., 2007; Lin ve ark., 2009; Guan ve ark., 2012; de Saint Germain ve ark., 2013; Liu ve ark., 2013). Ancak ilginç bir şekilde Domat çeşidi embriyolarından gelişen bitkilerde internod uzaklıkları 10 μ M *rac*-GR24 uygulaması ile de anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bunun nedeni Ruyter-Spira ve ark. (2011)'nin öne sürdükleri gibi *rac*-GR24'ün yüksek dozlarının toksisite etkisi yaratması olabilir. Bu sonuçlara göre genel olarak *rac*-GR24 ya da TIS108'in doku kültürü şartlarında zeytin tohum ve embriyo çimlenmesi, kök gelişimi ve yan dal sayısı ile internod mesafesi üzerine etkilerinin uygulanan konsantrasyona, bitki genotipine ve dokuya bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır.

Çalışmada son olarak *rac*-GR24 ve TIS108'in Ayvalık ve Domat çeliklerinde, kallus oluşturma ve köklenme başarıları üzerine etkileri belirlenmiştir. Ayvalık çeşidi çeliklerinde kontrol grubuna oranla kallus oluşumu *rac*-GR24 uygulamaları ile azalmış, 10 μ M TIS108 uygulaması dışındaki diğer konsantrasyonlarda artmıştır. Domat çeşidi çeliklerinde kontrol grubuna oranla kallus oluşumu 10 μ M *rac*-GR24 uygulamasında artmış, TIS108 uygulamalarında ise 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda artmıştır. Çelik başına düşen kök sayıları incelendiğinde ise Ayvalık çeşidinde kontrol grubuna göre *rac*-GR24 uygulamalarında çelik başına düşen kök sayısının azaldığı, TIS108 uygulamalarında ise 5 μ M konsantrasyonda arttığı görülmüştür. Domat çeşidinde ise kontrol grubuna göre *rac*-GR24 uygulamalarında çelik başına düşen kök sayısının değişmediği, TIS108 uygulamalarında ise 10 μ M konsantrasyonda arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre normalde IBA ile köklendirilen Ayvalık çeşidi çelikleri üzerine bu çalışmada uygulanan

rac-GR24 veya TIS108 konsantrasyonlarının etkili olmadığı anlaşılmıştır. Zor köklendiği bilinen Domat çeşidi çeliklerinde ise SL inhibitörü olan TIS108'in adventif köklenmeyi arttırdığı, ancak yine IBA uygulamalarına oranla daha az miktarlarda kaldığı görülmüştür. Bu nedenle çelik köklendirme çalışmalarında, farklı dozlarda SL'ın diğer hormonlar ile kombinasyonlarının denemesi yararlı olacaktır.

Yeni keşfedilen bir hormon olduğu için SL ile ilgili yürütülen çalışmaların çoğu halen model organizmalar ile yapılmaktadır. Bu nedenle zeytin gibi ekonomik önemi olan çok yıllık odunsu bir bitkide, SL ile ilgili moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve farklı koşullardaki etkilerinin belirlenmesi, tarım ve ormancılık faaliyetleri açısından önem arz etmektedir. SL ve inhibitörlerinin ekonomik önemi olan ağaçlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, gen transferi yöntemleri kullanılmadan verimin artırılması ve üretimin hızlandırılması için önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abe S., Sado a., Tanaka K., Kisugi T., Asami K., Ota S., Kim H.I., Yoneyama K., Xie X., Ohnishi T., Seto Y., Yamaguchi S., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T., 2014. Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in Arabidopsis and its methyl ester can directly interact with AtD14 *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111 (50): 18084-18089.
- Acebedo M.M., Lavee S., Liñán J., Troncoso A., 1997. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. Scientia Horticulturae, 69: 207–215.
- Agusti J., Herold S., Schwarz M., Sanchez P., Ljung K., Dun E.A., Brewer P.B., Beveridge C.A., Sieberer T., Sehr E.M., Greb T., 2011. Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (50): 20242-20247.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi, H., 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature, 435 (9): 824–827.
- Akiyama K., Hayashi H., 2006. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. Annals of Botany, 97: 925–931.
- Al-babili S., Bouwmeester H.J., 2015. Strigolactones, a Novel Carotenoid-Derived Plant Hormone. Annual Review of Plant Biology, 66: 24.1-24.26.
- Alder A., Holdermann I., Beyer P., Al-babili, S., 2008. Carotenoid oxygenases involved in plant branching catalyse a highly specific conserved apocarotenoid cleavage reaction. Biochemical Journal, 416: 289–296.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-babili, S., 2012. The Path from b-Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. Science, 335: 1348-1350.
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyozuka J., 2007. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. Plant Journal, 51: 1019–1029.

- Arite T., Umehara M., Ishikawa S., Hanada A., Maekawa M., Yamaguchi S., Kyozyuka J., 2009. D14, a strigolactone-Insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant and Cell Physiology*, 50 (8): 1416–1424.
- Arite T., Kameoka H., Kyozyuka J., 2012. Strigolactone Positively Controls Crown Root Elongation in Rice. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 165–172.
- Auldrige M.E., Block A., Vogel J.T., Dabney-Smith C., Mila I., Bouzayen M., Magallanes-Lundback M., DellaPenna D., McCarty D.R., Klee H.J., 2006. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal*, 14: 982–993.
- Awad A.A., Sato D., Kusumoto D., Kamioka H., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2006. Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*, produced by maize, millet and sorghum. *Journal of Plant Growth Regulation*, 48 (3): 221–227.
- Bainbridge K., Sorefan K., Ward S., Leyser O., 2005. Hormonally controlled expression of the *Arabidopsis* MAX4 shoot branching regulatory gene. *The Plant Journal*, 44: 569–580.
- Bao Y.Z., Yao Z.Q., Cao X.L., Peng J.F., Xu Y., Chen M.X., Zhao S.F., 2017. Transcriptome analysis of *Phelipanche aegyptiaca* seed germination mechanisms stimulated by fluridone, TIS108, and GR24. *PLoS ONE*, 12 (11): e0187539.
- Baz L., Mori N., Mi J., Jamil M., Kountche B.A., Guo X., Balakrishna A., Jia K.P., Vermathen M., Akiyama K., Al-Babili S., 2018. 3-Hydroxycarolactone, a Novel Product of the Strigolactone Biosynthesis Core Pathway. *Molecular Plant*, 11 (10): 1312-1314.
- Bennett T., Sieberer T., Willett B., Booker J., Luschnig, C., 2006. The *Arabidopsis* MAX Pathway Controls Shoot Branching by Regulating Auxin Transport. *Current Biology*, 16: 553–563.
- Beveridge C.A., Ross J.J., Murfet I.C., 1996. Branching in Pea. *Plant Physiology*, 110: 859-865.

- Beveridge C.A., Symons C.M., Murfet I.C., Ross J.J., Rameau C., 1997. The rms1 Mutant of Pea Has Elevated Indole-3-Acetic Acid Levels and Reduced Root-Sap Zeatin Riboside Content but Increased Branching Controlled by Graft - Transmissible Signal (s). *Plant Physiology*, 115: 1251-1258.
- Beveridge C.A., 2000. Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 193–203.
- Bhattacharya C., Bonfante P., Deagostino A., Kapulnik Y., Larini P., Occhiato E.G., Venturello P., 2009. A new class of conjugated strigolactone analogues with fluorescent properties : synthesis and biological activity. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7: 3413–3420.
- Bielecki R.L., 1982. Sugar Alcohols, In: Loewus F.A. ve Tanner W., Eds. *Plant Carbonhydrates I*. Springer, Heidelberg. 158-1982.
- Bonneau L., Huguet S., Wipf D., Pauly N., Truong H., 2013. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 199: 188–202.
- Booker J., Auldrige M., Wills S., McCarty D., Klee H., Leysser O., 2004. MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule. *Current Biology*, 14: 1232–1238.
- Booker J., Sleberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stirnberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., Leyser O., 2005. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell*, 8 (3): 443–449.
- Bouwmeester H.J., Matusova R., Zhongkui S., Beale M.H., 2003. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (4): 358–364.
- Boyer F., de Saint Germain A., Pillot J., Pouvreau J., Chen V.X., Ramos S., Stevenin A., Simier P., Delavault P., Beau J., Rameau C., 2012. Structure-Activity Relationship Studies of Strigolactone-Related Molecules for Branching

- Inhibition in Garden Pea : Molecule Design for Shoot Branching. *Plant Physiology*, 159: 1524–1544.
- Brachmann A., Parniske M., 2006. The Most Widespread Symbiosis on Earth. *PLoS Biology*, 4 (7): 1111–1112.
- Breuillin, F., Schramm J., Hajirezaei M., Ahkami A., Favre P., Druege U., Hause B., Bucher M., Kretzschmar T., Bossolini E., Kuhlmeier C., Martinoia E., Franken P., Scholz U., Reinhardt D., 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal*, 64: 1002–1017.
- Brewer P.B., Yoneyama K., Filardo F., Meyers E., Scaffidi A., Frickey T., Akiyama K., Seto Y., Dun E.A., Cremer J.E., Ken S.C., Waters M.T., Flematti G.R., Mason M.G., Weiller G., Yamaguchi S., Nomura T., Smith S.M., Yoneyama K., Beveridge C.A., 2016. LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (22): 6301–6306.
- Brooks D.W., Bevinakatti H.S., Powell D.R., 1985. The Absolute Structure of (+) -Strigol. *American Chemical Society*, 50 (20): 3779-3781.
- Bustin S., Huggett J. 2017. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14: 19–28.
- Butler L.G., 1995. Chemical Communication Between the Parasitic Weed *Striga* and Its Crop Host, In: Inderjit, Dakshini K.M.M., Einhellig F.A., Eds. *Allelopathy*. *American Chemical Society*, Washington, 158-168.
- Cavar S., Zwanenburg B., 2015. Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochemistry Reviews*, 14: 691–711.
- Cerezo S., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F., 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106: 337-344.
- Chaari A., Chaabouni A.C., Maalej M., Drira N., 2002. Meski Olive Variety Propagated by Tissue Culture. *Acta Horticulturae*, 871–874.

- Charnikhova, T.V., Gaus K., Lumbroso A., Sanders M., Vincken J., De Mesmaeker A., Ruyter-Spira C.P., Screpanti C., Bouwmeester H.J., 2017. Zealactones. Novel natural strigolactones from maize. *Phytochemistry*, 137: 123–131.
- Cook C.E., Whichard L.P., Turner B., Wall M.E., Egley G.H. (1966). Germination of witchweed (*striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154: 1189–1190.
- Cook C.E., Whichard L.P., Wall E. M., Egley G.H., Coggon P., Luhan P.A., Mcphail A.T., 1972. Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *Journal of the American Chemical Society*, 94 (17). 6198–6199.
- Covas M., Ruiz-Gutierrez V., de la Torre R., Kafatos A., Lamuela-Raventos R.M., Osada J., Owen R.W., Visioli F., 2006. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutrition Reviews*, 64 (10): 20-30.
- Crawford S., Shinohara N., Sieberer T., Williamson L., George G., Hepworth J., Müller D., Domagańska M.A., Leyser O., 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*, 137: 2905–2913.
- Cruz F., Julca I., Gomez-Garrido J., Loska D., Marcet-Houben M., Cano E., Galan B., Frias L., Ribeca P., Derdak S., Gut M., Sanchez-Fernandez M., Garcia J.L., Gut I.G., Vargas P., Alioto T. S., Gabaldon T., 2016. Genome sequence of the olive tree , *Olea europaea*. *GigaScience*. 5 (29): 1-12.
- Czarnecki O., Yang J., Wang X., Wang S., Muchero W., Tuskan G.A., Chen J., 2014. Characterization of MORE AXILLARY GROWTH Genes in *Populus*. *PLoS ONE*, 9 (7): e102757.
- Çetintaş Gerkkakis A., Özkaya M.T., 2005. Effects of Cutting Size, Rooting Media and Planting Time on Rooting of Domat and Ayvalik Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars in Shaded Polyethylene Tunnel (Spt). *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11 (3): 334-338.
- Davies F.T., Hartmann H.T., 1988. The Physiological Basis of Adventitious Root Formation. *Acta Horticulturae*, 227: 113-120.

- Dawyndt P., Meyer H.D., Baets B.D., 2006. UPGMA clustering revisited: A weight-driven approach to transitive approximation. *International Journal of Approximate Reasoning*, 42 (3): 174-191.
- De Cuyper C., Fromentin J., Yocgo R.E., Keyser A., Guillotin B., Kunert K., Boyer F., Goormachtig S., 2015. From lateral root density to nodule number, the strigolactone analogue GR24 shapes the root architecture of *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 66 (1): 137-146.
- de Saint Germain A., Ligerot Y., Dun E.A., Pillot J., Ross J.J., Beveridge C.A., Rameau C., 2013. Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins. *Plant Physiology*, 163: 1012-1025.
- Delaux P., Xie X., Timme R.E., Puech-Pages V., Dunand C., Lecompte E., Delwiche C.F., Yoneyama K., Becard G., Sejalón-Delmas N., 2012. Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytologist*, 450, 857–871.
- Demole E., Lederer E., Mercier D., 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 675- 685.
- Dong L., Ishak A., Yu J., Zhao R., Zhao, L., 2013. Identification and Functional Analysis of Three MAX2 Orthologs in *Chrysanthemum*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(5): 434–442.
- Dorak M.T., 2006. Real-time PCR. Taylor and Francis Group, New York. 362 p.
- Drummond R.S.M., Martínez-Sánchez M., Janssen B.J., Templeton K.R., Simons J.L., Quinn B.D., Karunairetnam S., Snowden K.C., 2009. *Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7 Is Involved in the Production of Negative and Positive Branching Signals in *Petunia*. *Plant Physiology*, 151: 1867-1877.
- Dubrovsky J.G., Soukup A., Napsucialy-Mendivil S., Jeknić Z., Ivanchenko M.G., 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, 103 (5): 807-817.
- Edgar R.C., 2004. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32 (5): 1792–1797.

- El-Antably H.M.M., Wareing P.F., Hillman J., 1967. Some Physiological Responses to D,L Abscisin (Dormin). *Planta*, 73: 74-90.
- Fabbri A., Bartolini G., Lambardi M., Kailis S., 2004. Olive Propagation Manual. CSIRO, Australia. 158s.
- Fernandes Serrano J.M., Serrano M.C., Amaral E., 2002. Effect of Different Hormone Treatments on Rooting of *Olea europaea* cv . *Galega vulgar* Cuttings. *Acta Horticulturae*, 586: 875–877.
- Fernandez-Aparicio M., Rispaill N., Prats E., Morandi D., Garcia-Garrido J.M., Dumas-Gaudot E., Duc G., Rubiales D., 2010. Parasitic plant infection is partially controlled through symbiotic pathways. *Weed search*, 50: 76-82.
- Flora L.L., Madore M.A., 1993. Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta*, 189: 484-490.
- Foo E., Turnbull C.G.N., Beveridge C.A., 2001. Long-Distance Signaling and the Control of Branching in the *rms1* Mutant of Pea. *Plant Physiology*, 126: 203-209.
- Foo E., Bullier E., Goussot M., Foucher F., Rameau C., Beveridge C.A., 2005. The Branching Gene *RAMOSUS1* Mediates Interactions among Two Novel Signals and Auxin in Pea. *The Plant Cell*, 17: 464–474.
- Foo E., Davies N.W., 2011. Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta*, 234: 1073–1081.
- Fukui K., Ito S., Asami T., 2013. Selective Mimics of Strigolactone Actions and Their Potential Use for Controlling Damage Caused by Root Parasitic Weeds. *Molecular Plant*, 6 (1): 88–99.
- Funnell K.A., 2014. Interpreting Plant Architectural Design. *Acta Horticulturae*, 1055: 49–51.
- Garcia J.L., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A., 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69: 95-100.

- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Hatfield. 571–607.
- Gobena D., Shimels M., Rich P.J., Ruyter-spira C., Bouwmeester, H., Kanuganti S., Mengiste T., Ejeta G., 2017. Mutation in sorghum LOW GERMINATION STIMULANT 1 alters strigolactones and causes Striga resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114 (17): 4471–4476.
- Goldwasser Y., Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., 2008. Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobancha aegyptiaca* seed germination. Plant Growth Regulation, 55: 21–28.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pages V., Dun E.A., Pillot J., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J., Bouwmeester H., Becard G., Beveridge C.A., Rameau C., Rochange S.F., 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature, 455 (11): 189–194.
- Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Steffens G.L., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C., 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. Nature, 281: 216–217.
- Guan J.C., Koch K.E., Suzuki M., Wu S., Latshaw S., Petruff T., Goulet C., Klee H.J., McCarty D.R., 2012. Diverse Roles of Strigolactone Signaling in Maize Architecture and the Uncoupling of a Branching-Specific Subnetwork. Plant Physiology, 160: 1303–1317.
- Guillotin B., Etemadi M., Audran C., Bouzayen M., Guillaume B., Comber J., 2017. SL-IAA27 regulates strigolactone biosynthesis and mycorrhization in tomato (var. MicroTom). New Phytologist, 213: 1124–1132.
- Gürbüz S., Kiran-Ciliz N., Yenigun O., 2004. Cleaner production implementation through process modifications for selected SMEs in Turkish olive oil production. Journal of Cleaner Production, 12: 613–621.

- Ha C.V., Leyva-González M.A., Osakabe Y., Tran U.T., Nishiyama R., Watanabe Y., Tanaka M., Seki M., Yamaguchi S., Dong N.V., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Herrera-Estrella L., Tran L.P., 2014. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: 851–856.
- Hamiaux C., Drummond R.S.M., Janssen B.J., Ledger S.E., Cooney J.M., Newcomb R.D., Snowden K.C., 2012. DAD2 Is an α / β Hydrolase Likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. *Current Biology*, 22: 2032–2036.
- Hauck C., Müller S., Schildknecht H., 1992. A Germination Stimulant for Parasitic Flowering Plants from *Sorghum bicolor*, a Genuine Host Plant. *Journal of Plant Physiology*, 139: 474-478.
- Hayward A., Stirnberg P., Beveridge C., Leyser O., 2009. Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiology*, 151: 400-412.
- Hrnčirik K., Fritsche S., 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 540-549.
- Humphrey A.J., Beale M.H., 2006. Strigol: Biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry*. 67: 636–640.
- Hürkan K., Sezer F., Özbilen A., Taşkın K.M., 2018. Identification of reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction based gene expression studies on various Olive (*Olea europaea* L.) tissues. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93 (6): 644-651.
- Ilgar R., 2016. Çanakkale İlinde Zeytin Yetiştiriciliği ve Yaşanan Sorunlar. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi*, 32: 19-32.
- Ishikawa S., Maekawa M., Arite T., Onishi K., Takamure I., Kyoizuka J., 2005. Suppression of Tiller Bud Activity in Tillering Dwarf Mutants of Rice. *Plant and Cell Physiology*, 46 (1): 79-86.

- Istanbouli A., Neville P., 1977. Etude de la 'dormance' des semences d'olivier (*Olea europaea* L.). Mise en evidence d'une dormance embryonnaire. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie D, 284: 2503-2506.
- Istanbouli A., Neville P., 1979. Etude de la 'dormance' des semences d'olivier (*Olea europaea* L.). III. Influence des enveloppes sur la germination. Annales Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale, 13 (1): 151-165.
- Ito S., Kitahata N., Umehara M., Hanada A., Kato A., Ueno K., Mashiguchi K., Kyozyuka J., Yoneyama K., Yamaguchi S., Asami T., 2010. A New Lead Chemical for Strigolactone Biosynthesis Inhibitors. Plant and Cell Physiology, 51 (7): 1143-1150.
- Ito S., Umehara M., Hanada A., Kitahata N., Hayase H., Yamaguchi S., Asami T., 2011. Effects of triazole derivatives on strigolactone levels and growth retardation in rice. PLoS ONE, 6 (7): 1–5.
- Ito S., Umehara M., Hanada A., Yamaguchi S., Asami T., 2013. Effects of strigolactone-biosynthesis inhibitor TIS108 on *Arabidopsis*. Plant Signalling and Behaviour, 8 (5): e24193.
- Ito S., Yamagami D., Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Sasaki Y., Yajima S., Kyozyuka J., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Shirasu K., Yamaguchi S., Asami T., 2017. Regulation of Strigolactone Biosynthesis by Gibberellin Signaling. Plant Physiology, 174: 1250-1259.
- İsfendiyaroğlu M., Özeker E., 2008. Rooting of *olea europaea* “domat” cuttings by auxin and salicylic acid treatments. Pakistan Journal of Botany. 40 (3): 1135–1141.
- İsfendiyaroglu M., Özeker E., Baser S. 2009. Rooting of “Ayvalik” olive cuttings in different media. Spanish Journal of Agricultural Research, 7 (1): 165-172.
- İsfendiyaroğlu M., Özeker E., 2012. Domat' Zeytini (*Olea europaea* L.) Çeliklerinin Kök Rejenerasyonu: Yaralama Etkileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49 (2): 159-165.
- Jamil M., Rodenburg J., Charnikhova T., Bouwmeester H.J., 2011. Pre-attachment *Striga hermonthica* resistance of New Rice for Africa (NERICA) cultivars based on low strigolactone production. New Phytologist, 192: 964–975.

- Jia K., Baz L., Al-babili S., 2018. From carotenoids to strigolactones. *Journal of Experimental Botany*, 69 (9): 2189–2204.
- Jiang L., Liu X., Xiong G., Liu H., Chen F., Wang L., Meng X., Liu G., Yu H., Yuan Y., Yi W., Zhao L., Ma H., He Y., Wu Z., Melcher K., Qian Q., Xu H.E., Wang Y., Li J., 2013. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature*, 1-5.
- Johnson A.W., Rosebery G., Parker C., 1976. A novel approach to Striga and Orobanche control using synthetic germination stimulants. *Weed Research*, 16: 223–227.
- Johnson A.W., Gowda G., Hassanali A., Knox J., Monaco S., Razavi Z., Rosebery G., 1981. The Preparation of Synthetic Analogues of Strigol. *Journal of the Chemical Society*, 1734-1743.
- Johnson X., Brcich T., Dun E.A., Goussot M., Haurogne K., Beveridge C.A., Rameau C., 2006. Branching Genes Are Conserved across Species. Genes Controlling a Novel Signal in Pea Are Coregulated by Other Long-Distance Signals. *Plant Physiology*, 142: 1014-1026.
- Kagiyama M., Hirano Y., Mori T., Kim S., Kyojuka J., Seto Y., Yamaguchi S., Hakoshima T., 2013. Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes to Cells*, 18: 147–160.
- Kaleci N., Orhan Z., 2010. Farklı Anaçlar Üzerine Aşılanan Domat Zeytin Çeşidinin Fidan Özellikleri ve Besin Alımı Düzeylerinin Belirlenmesi. *Zeytin Bilimi*, 1 (2): 43-48.
- Kapulnik Yoram., Delaux P., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya C., Sejalón-Delmas N., Combier J., Becard G., Belausov E., Beeckman T., Dor E., Hershenhorn J., Koltai H., 2011. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta*, 233: 209–216.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz C.D., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647–1649.

- Khetkam P., Xie X., Kisugi T., Kim H.I., Yoneyama K., Uchida K., Yokota T., Nomura T., Yoneyama K., 2014. 7 α - and 7 β -Hydroxyorobanchyl acetate as germination stimulants for root parasitic weeds produced by cucumber. *Journal of Pesticide Science*, 39 (3): 121–126.
- Kıralan M., Bayrak A., 2013. Oxidative and Antiradical Stabilities of Two Important Virgin Olive Oils from Ayvalik and Memecik Olive Cultivars in Turkey, *International Journal of Food Properties*, 16: 649-657.
- Kim S.K., Ademitirin V.O., Thes C., Dossou R., 2002. Yield losses in maize due to *Striga hermonthica* in West and Central Africa. *International Journal of Pest Management*, 48 (3): 211-217.
- Kim H.I., Xie X., Kim H.S., Chun J.C., Yoneyama K., Nomura T., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2010. Structure–activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobancha minor* seed germination stimulation. *Journal of Pesticide Science*, 35 (3): 344-347.
- Kim H.I., Kisugi T., Khetkam P., Xie X., Yoneyama K., Uchida K., Yokota T., Nomura T., McErlean C.S.P., Yoneyama K., 2014. Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry*, 103:85-88.
- Kisugi T., Xie X., Kim H.I., Yoneyama K., Aika S., Akiyama K., Hayashi H., Uchida K., Yokota T., Nomura T., Yoneyama K., 2013. Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry*, 87: 60–64.
- Kohlen W., Charnikhova T., Liu Q., Bours R., Domagalska M.A., Beguerie S., Verstappen F., Leyser O., Bouwmeester H., Ruyter-Spira C., 2011. Strigolactones Are Transported through the Xylem and Play a Key Role in Shoot Architectural Response to Phosphate Deficiency in Nonarbuscular Mycorrhizal Host *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155: 974-987.
- Kohlen W., Charnikhova T., Lammers M., Pollina T., Toth P., Haider I., Pozo M.J., de Maagd R.A., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H.J., Lopez-Raez J.A., 2012. The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SlCCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 196: 535-547.

- Koltai H., Dor E., Hershenhorn J., Joel D.M., Weininger S., Lekalla S., Shealtiel H., Bhattacharya C., Eliahu E., Resnick N., Barg R., Kapulnik Y., 2010. Strigolactones' Effect on Root Growth and Root-Hair Elongation May Be Mediated by Auxin-Efflux Carriers. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29: 129-136.
- Koren D., Resnick N., Gati E.M., Belausov E., Weininger S., Kapulnik Y., Koltai H., 2013. Strigolactone signaling in the endodermis is sufficient to restore root responses and involves SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2) activity. *New Phytologist*, 198:866-874.
- Kretzschmar T., Kohlen W., Sasse J., Borghi L., Schlegel M., Bachelier J.B., Reinhardt D., Bours R., Bouwmeester H.J., Martinoia E., 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483: 341–346.
- Lagarda A., Martin G.C., Polito V.S., 1983. Anatomical and morphological development of Manzanillo olive seed in relation to germination. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 741-743.
- Lambardi M., Benelli C., De Carlo A., Fabbri A., Grassi S., Lynch P.T., 2002. Medium- and Long-Term in vitro Conservation of Olive Germplasm (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 586: 109–112.
- Lambardi M., Ozudogru E.A., Roncasaglia R., 2012. In Vitro Propagation of Olive (*Olea europaea* L .) by Nodal Segmentation of Elongated Shoots, In: Lambardi M., Ozudogru E., Jain S., Eds. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (vol 994). Humana Press, Totowa, NJ. 33–44.
- Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van der Peer Y., Rouze P., Rombauts S., 2002. PlantCARE , a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 325–327.
- Leva A.R., Petruccelli R., Bartolini G., 1994. Mannitol “in vitro” Culture of *Olea Europaea* L. (cv. Maurino). *Acta Horticulturae*, 356: 43-46

- Liang J., Zhao L., Challis R., Leyser O., 2010. Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Journal of Experimental Botany*, 61 (11), 3069–3078.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y., 2009. DWARF27, an Iron-Containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud Outgrowth. *The Plant Cell*, 21: 1512–1525.
- Liu W., Kohlen W., Lillo A., den Camp R.O., Ivanov S., Hartog M., Limpens E., Jamil M., Smaczniak C., Kaufmann K., Yang W., Hooiveld G.J.E.J., Charnikhova T., Bouwmeester H.J., Bisseling T., Geurts R., 2011. Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2. *The Plant Cell*, 23: 3853–3865.
- Liu J., Novero M., Charnikhova T., Ferrandino A., Schubert A., Ruyter-Spira C., Bonfante P., Lovisolo C., Bouwmeester H.J., Cardinale F., 2013. *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7* modulates plant growth, reproduction, senescence, and determinate nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 64 (7): 1967–1981.
- Liu J., He H., Vitali M., Visentin I., Charnikhova T., Haider I., Schubert A., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H.J., Lovisolo C., Cardinale F., 2015. Osmotic stress represses strigolactone biosynthesis in *Lotus japonicus* roots : exploring the interaction between strigolactones and ABA under abiotic stress. *Planta*, 241: 1435–1451.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25: 402–408.
- López-Ráez J.A., Charnikhova T., Gomez-Roldan V., Matusova R., Kohlen W., de Vos R., Verstappen F., Puech-Pages V., Becard G., Mulder P., Bouwmeester H., 2008. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*, 178 (4), 863–874.
- López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A.K., Sergeant J., Verstappen F., Bugg T.D.H., Thompson A.J., Ruyter-Spira C., Bouwmeester

- H., 2010. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis?. *New Phytologist*, 187: 343-354.
- Lynch P.T., Siddika A., Johnston J.W. Trigwell S.M., Mehra A., Benelli C., Lambardi M., Benson E.E., 2011. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science*, 181: 47–56.
- Mangnus E.M., Zwanenburg B., 1992. Tentative Molecular Mechanism for Germination Stimulation of *Striga* and *Orobancha* Seeds by Strigol and Its Synthetic Analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1066–1070.
- Mashiguchi K., Sasaki E., Shimada Y., Nagae M., Ueno K., Nakano T., Yoneyama K., Suzuki Y., Asami T., 2009. Feedback-Regulation of Strigolactone Biosynthetic Genes and Strigolactone-Regulated Genes in *Arabidopsis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73 (11): 2460-2465.
- Matthys C., Walton A., Struk S., Stes E., Boyer F., Gevaert K., Goodmachtig S., 2016. The Whats, the Wheres and the Hows of strigolactone action in the roots. *Planta*, 243: 1327-1337.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F.W.A., Franssen M.C.R., Beale M.H., Bouwmeester H.J., 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant physiology*, 139: 920–934.
- Mitchell A.L., Attwood T.K., Babbitt P.C., Blum M., Bork P., Bridge A., Brown S.D., Chang H., El-Gebali S., Fraser M.I., Gough J., Haft D.R., Huang H., Letunic I., Lopez R., Luciani A., Madeira F., Marchler-Bauer A., Mi H., Natale D.A., Necci M., Nuka G., Orengo C., Pandurangan A.P., Paysan-Lafosse T., Pesseat S., Potter S.C., Qureshi M.A., Rawlings N.D., Redaschi N., Richardson L.J., Rivoire C., Salazar G.A., Sangrador-Vegas A., Sigrist C.J.A., Sillitoe I., Sutton G.G., Thanki N., Thomas P.D., Tossatto S.C.E., Yong S., Finn R.D., 2019. InterPro in 2019 : improving coverage , classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47: 351–360.
- Mitrakos K., Diamantoglou S., 1984. Endosperm dormancy breakage in olive seeds. *Physiologia Plantarum*, 62: 8–10.

- Morris S.E., Turnbull C.G.N., Murfet I.C., Beveridge C.A., 2001. Mutational analysis of branching in pea. Evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant physiology*, 126: 1205–1213.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Müller S., Hauck C., Heidelberg U., 1992. Germination Stimulants Produced by *Vigna unguiculata Walp* cv Saunders Upright. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11: 77-84.
- Nakamura H., Xue Y., Miyakawa T., Hou F., Qin H., Fukui K., Shi X., Ito E., Ito S., Park S., Miyauchi Y., Asano A., Totsuka N., Ueda T., Tanokura M., Asami T., 2013. Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nature Communications*, 4: 1–10.
- Napoli C., 1996. Highly Branched Phenotype of the *Petunia dadl-7* Mutant 1s Reversed by Grafting. *Plant Physiology*, 111: 27–37.
- Ongaro V., Bainbridge K., Williamson L., Leyser O., 2008. Interactions between Axillary Branches of *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 1(2): 388–400.
- Orak H.H., Isbilir S.S., Yagar H., 2012. Determination of Antioxidant Properties of Lyophilized Olive Leaf Water Extracts Obtained from 21 Different Cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21 (4): 1065–1074.
- Özelbaykal, S., Gezerel, Ö., 2005. The Effects of the Different Doses of IBA (Indol Butiric Acid) on the Rooting Performances in the Reproduction of “Gemlik” and “Domat” Olive Trees by Using the Green Twig Procedure in the Ecology of Çukurova Region. *Journal Central European Agriculture*, 6: 481–484.
- Özkaya M.T., Çelik M., 1994. The Effect of Rooting Environment and Combination of Auxin Polyamine on the Rooting Ability of Turkish Olive Cultivars Gemlik and Domat. *Acta Horticulturae*, 356: 31-34.
- Özkaya M.T., Çelik M., 1999. The Effects of Various Treatments on Endogenous Carbonhydrate Content of Cuttings in Easy-to-Root and Hard-to-Root Olive Cultivars. *Acta Horticulturae*, 474: 51-54.

- Parniske M., 2005. Cue for the branching connection. *Nature*, 435: 750-751.
- Parniske M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews*, 6: 763-775.
- Peixe A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso H., Macedo E., 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113: 1-7.
- Perri E., Parlatti M.V., Rugini E., 1994. Isolation and Culture of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivar Protoplasts. *Acta Horticulturae*, 356: 51-53.
- Pop T.I., Pamfil D., Bellini C., 2011. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39 (1): 307-316.
- Prandi C., McErlean C.S.P., 2019. The Chemistry of Strigolactones, In: Koltai H., Prandi C., Eds. *Strigolactones - Biology and Applications*. Springer, Cham, Switzerland. 163-198.
- Press M.C., Scholes J.D., Riches C.R., 2001. Current status and future prospects for management of parasitic weeds (*Striga* and *Orobancha*). In: CR Riches, Ed, *The World's Worst Weeds*. British Crop Protection Council, Brighton, UK. 71–90.
- Proust H., Hoffmann B., Xie X., Yoneyama K., Schaefer D.G., Yoneyama K., Nogue F., Rameau C., 2011. Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 138: 1531–1539.
- Rahman N., Awan A.A., Nabi G., Ali Z., 2002. Root Initiation in Hard Wood Cuttings of Olive Cultivar Coratina Using Different Concentration of IBA. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1 (5): 563-564.
- Raskin I., 1992. Salicylate, A New Plant Hormone, *Plant Physiology*, 99: 799-803.
- Rasmussen A., Mason M.G., De Cuyper C., Brewer P.B., Herold S., Agusti J., Geelen D., Greb T., Goormachtig S., Beeckman T., Beveridge C.A., 2012. Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant physiology*, 158: 1976–1987.

- Rasmussen A., Depuydt S., Goormachtig S., Geelen D., 2013. Strigolactones fine-tune the root system. *Planta*, 238: 615-626.
- Rejskova A., Patkova L., Stodulkova E., Lipavska H., 2007. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Physiology*, 164:174-184.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: Basu C., Ed. *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology*, vol 1275. Humana Press, New York. 31-56.
- Rostami A.A., Shasavar A., 2009. Effects of Seed Scarification on Seed Germination and Early Growth of Olive Seedlings. *Journal of Biological Sciences*, 9 (8): 825-828.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J., Estelle M., 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes and Development*, 12: 198–207.
- Rugini E., 1986. Olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj Y.P.S., Ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Heidelberg. 253- 267.
- Ruyter-Spira C., Kohlen W., Charnikhova T., van Zeijl A., van Bezouwen L., de Ruijter N., Cardoso C., Lopez-Raez J.A., Matusova R., Bours R., Verstappen F., Bouwmeester H., 2011. Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones?. *Plant Physiology*, 155: 721–734.
- Ruyter-Spira C., Al-Babili S., van der Krol S., Bouwmeester H., 2013. The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science*, 18 (2): 72–83.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12): 5463–5467.
- Sarıçam S., Müştak H.K., 2015. Filogenetik Ağaçlandırma Metotları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26 (2): 58–64.

- Sarmiento R., Garcia J.L., Mazuelos C., Linan J., Troncoso A., 1994. Effect of the Form and Concentration of N on the Growth and Mineral Composition of Olive Seedlings. *Acta Horticulturae*, 356: 156-161.
- Sasaki A., Itoh H., Gomi K., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Jeong D., An G., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M., 2003. Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. *Science*, 299: 1896-1898.
- Sato D., Awad A.A., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2005. Confirmation and Quantification of Strigolactones. Germination Stimulants for Root Parasitic Plants *Striga* and *Orobanche*, Produced by Cotton. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 69 (1): 98-102.
- Scaffidi A., Waters M.T., Ghisalberti E.L., Dixon K.W., Flematti G.R., Smith S.M., 2013. Carlactone-independent seedling morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 76: 1-9.
- Scaffidi A., Waters M.T., Sun Y.K., Skelton B.W., Dixon K.W., Ghisalberti E.L., Flematti G.R., Smith S.M., 2014. Strigolactone Hormones and Their Stereoisomers Signal through Two Related Receptor Proteins to Induce Different Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165: 1221–1232.
- Schwartz S.H., Qin X., Loewen M.C., 2004. The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates That a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (45): 46940–46945.
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A., 2006a. 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*, 1 (6): 2742-2745.
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A., 2006b. 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*, 1 (6), 2555–2562.
- Seto Y., Kameoka H., Yamaguchi S., Kyojuka J., 2012. Recent Advances in Strigolactone Research : Chemical and Biological Aspects. *Plant and Cell Physiology*, 53 (11): 1843–1853.

- Seto Y., Sado A., Asami K., Hanada A., Umehara M., Akiyama K., Yamaguchi S., 2014. Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (4): 1640-1645.
- Shibli R.A., Shatnawi M., Abu-Ein K.H., Al-juboory K.H., 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 88: 243–256.
- Shinohara N., Taylor C., Leyser O., 2013. Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLOS Biology*, 11 (1): 1-14.
- Siame B.A., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G., Butler L.G., 1993. Isolation of Strigol, Host Plants Germination Stimulant for *Striga asiatica*, from of various crops in tropical and subtropical countries. *American Chemical Society*, 41: 1486–1491.
- Simons J.L., Napoli C.A., Janssen B.J., Plummer K.M., Snowden K.C., 2007. Analysis of the DECREASED APICAL DOMINANCE Genes of *Petunia* in the Control of Axillary Branching. *Plant Physiology*, 143: 697–706.
- Skoog F., Tsui C., 1948. Chemical Control of Growth and Bud Formation in Tobacco Stem Segments and Callus Cultured *in vitro*. *American Journal of Botany*. 35: 782-787.
- Skowrya D., Craig K.L., Tyers M., Elledge S.J., Harper J.W. 1997. F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell*, 91: 209–219.
- Snowden K.C., Simkin A.J., Janssen B.J., Templeton K.R., Loucas H.M., Simons J.L., Karunairetnam S., Gleave A.P., Clark D.G., Klee H.J., 2005. The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 Gene Affects Branch Production and Plays a Role in Leaf Senescence, Root Growth, and Flower Development. *The Plant Cell*, 17: 746–759.

- Sorefan K., Booker J., Haurogne K., Goussot M., Bainbridge K., Foo E., Chatfield S., Ward S., Beveridge C., Rameau C., Leyser O., 2003. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes and Development*, 17: 1469–1474.
- Sotomayor Leon E.M., Duran Altisent J.M., 1994. Breaking of Dormancy in Olive (*Olea europaea* L.) Seeds. *Acta Horticulturae*, 356: 137-142.
- Souza R.A.V., Braga F.T., Setotaw T.A., Neto J.V., de Azavedo P.H., de Azavedo V.H., Cançado G.M.A., 2013. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured in vitro. *Ciencia Rural Santa Maria*, 43 (2): 290-296.
- Stanga J.P., Smith S.M., Briggs W.R., Nelson D.C., 2013. SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 Controls Seed Germination and Seedling Development in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 163: 318–330.
- Stirnberg P., Sande K., Leyser H.M.O., 2002. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 129: 1131–1141.
- Stirnberg P., Furner I.J., Leyser H.M.O., 2007. MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *The Plant Journal*, 50: 80–94.
- Sun H., Tao J., Liu S., Huang S., Chen S., Xie X., Yoneyama K., Zhang Y., Xu G., 2014. Strigolactones are involved in phosphate- and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65 (22): 6735–6746.
- Thimann K.V., Skoog F., 1993. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19 (7): 714-716.
- Thomann A., Dieterle M., Genschik P., 2005. Plant CULLIN-based E3s : Phytohormones come first. *FEBS Letters*, 579: 3239–3245.
- Turnbull C.G.N., Booker J.P., Leyser H.M.O., 2002. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 32: 255–262.

- Türkoğlu N., Durmuş M., 2005. A Study on Root Formation of Four Olive Varieties by Application of Hormone. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4 (5): 455-457.
- Tütüncü M., Çömlekçioğlu S., Şimşek Ö., İzgü T., Küden A.B., 2016. Bazı Zeytin Çeşitlerinin Köklenme Olanaklarının Araştırılması. VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, Cilt 1: Meyvecilik, 379-383.
- Ueno K., Furumoto T., Umeda S., Mizutani M., Takikawa H., Batchvarova R., Sugimoto, Y., 2014. Heliolactone , a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry*, 108: 122–128.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S., 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455: 195-201.
- Umehara M., Cao M., Akiyama K., Akatsu T., Seto Y., Hanada A., Li W., Takeda-Kamiya N., Morimoto Y., Yamaguchi S., 2015. Structural Requirements of Strigolactones for Shoot Branching Inhibition in Rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 56 (6): 1059–1072.
- Ünver T., Wu Z., Sterck L., Turktas M., Lohaus R., Li Z., Yang M., He L., Deng T., Escalante F.J., Llorens C., Roig F.J., Parmaksiz I., Dundar E., Xie F., Zhang B., Ipek A., Uranbey S., Erayman M., Ilhan E., Badad O., Ghazal H., Lightfoot D.A., Kasarla P., Colantonio V., Tombuloglu H., Hernandez P., Mete N., Çetin O., Montagu M.V., Yang H., Gao Q., Dorado G., de Peer Y.V., 2017. Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (44): e9413-e9422.
- Vogel J.T., Walter M.H., Giavalisco P., Lytovchenko A., Kohlen W., Charnikhova T., Simkin A.J., Goulet C., Strack D., Bouwmeester H.J., Fernie A.R., Klee H.J., 2010. SLCCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal*, 61: 300–311.

- Voyiatzis D.G., Porlings I.C., 1986. Quantitative Changes of Endogenous Growth Substances in Olive Seeds Subjected to Low Temperature for Breaking Their Dormancy. *Acta Horticulturae*, 286:113-116.
- Voyiatzis D.G., Porlings I.C., 1987. Temperature requirements for the germination of olive seeds (*Olea europaea* L.). *Journal of Horticultural Science*. 62 (3): 405-411.
- Voyiatzis D.G., 1995. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. *Physiologia Plantarum*, 95: 444–448.
- Waldie T., McCulloch H., Leyser O., 2014. Strigolactones and the control of plant development : lessons from shoot branching. *The Plant Journal*.79: 607–622.
- Wang L., Wang B., Jiang L., Liu X., Li X., Lu Z., Meng X., Wang Y., Smith S.M., Li J., 2015. Strigolactone Signaling in Arabidopsis Regulates Shoot Development by Targeting D53-Like SMXL Repressor Proteins for Ubiquitination and Degradation. *The Plant Cell*, 27: 3128–3142.
- Ward S.P., Salmon J., Hanley S.J., Karp A., Leyser O., 2013. Using Arabidopsis to Study Shoot Branching in Biomass Willow. *Plant Physiology*, 162: 800-811.
- Waters M.T., Brewer P.B., Bussell J.D., Smith S.M., Beveridge C.A., 2012a. The Arabidopsis Ortholog of Rice DWARF27 Acts Upstream of MAX1 in the Control of Plant Development by Strigolactones. *Plant Physiology*, 159: 1073–1085.
- Waters M.T., Nelson D.C., Scaffidi A., Flematti G.R., Sun Y.K., Dixon K.W., Smith S.M., 2012b. Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development*, 139: 1285–1295.
- Wen C., Zhao Q., Nie J., Liu G., Shen L., Cheng C., Xi L., Ma N., Zhao L., 2016. Physiological controls of chrysanthemum DgD27 gene expression in regulation of shoot branching. *Plant Cell Reports*, 35: 1053–1070.
- Wiesman Z., Lavee S., 1994. Vegetative growth retardation, improved rooting and viability of olive cuttings in response to application of growth retardants. *Plant Growth Regulation*, 14:83-90.

- Xie D-X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J.G., 1998. *COL*: An *Arabidopsis* Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science*, 280: 1091-1094.
- Xie X., Kusumoto D., Takeuchi Y., Yoneyama K., Yamada Y., Yoneyama K., 2007. 2'-Epi-orobanchol and Solanacol, Two Unique Strigolactones, Germination Stimulants for Root Parasitic Weeds, Produced by Tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8067-8072.
- Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Yokota T., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2008a. Isolation and identification of alectrol as (+) -orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry*, 69: 427–431.
- Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Takeuchi Y., Sugimoto Y., Yoneyama K., 2008b. Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Letters*, 49: 2066–2068.
- Xie X., Yoneyama K., Harada Y., Fusegi N., Yamada Y., Ito S., Yokota T., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2009a. Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 70: 211–215.
- Xie X., Yoneyama K., Kurita J., Harada Y., Yamada Y., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2009b. 7-Oxo-orobanchyl Acetate and 7-Oxo-orobanchol as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants from Flax (*Linum usitatissimum*). *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 73 (6): 1367-1370.
- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K., 2010. The Strigolactone Story. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93-117.
- Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Uchida K., Ito S., Akiyama K., Hayashi H., Yokota T., Monura T., Yoneyama K., 2013. Confirming Stereochemical Structures of Strigolactones Produced by Rice and Tobacco. *Molecular Plant*, 6 (1): 153–163.
- Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Akiyama K., Asami T., Yoneyama K., 2016. Structure- and stereospecific transport of strigolactones from roots to shoots. *Journal of Pesticide Science*, 41 (2): 1–4.

- Xie X., Kisugi T., Yoneyama K., Nomura T., Akiyamam K., Uchida K., Yokota T., McErlean C.S.P., YoneyamaK., 2017. Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize. *Journal of Pesticide Science*, 42 (2): 58–61.
- Xie X., Mori N., Yoneyama K., Yoneyama K., Nomura T., Uchida K., Yoneyama K., Akiyama K., 2019. Lotuslactone, a non-canonical strigolactone from *Lotus japonicus*. *Phytochemistry*, 157: 200–205.
- Yamada Y., Furusawa S., Nagasaka S., Shimomura K., Yamaguchi S., Umehara M., 2014. Strigolactone signaling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency. *Planta*, 240: 399–408.
- Yao R., Ming Z., Yan L., Li S., Wang F., Ma S., Yu C., Yang M., Chen L., Chen L., Li Y., Yan C., Miao D., Sun Z., Yan J., Sun Y., Wang L., Chu J., Fan S., He W., Deng H., Nan F., Li J., Rao Z., Lou Z., Xie D., 2016. DWARF14 is a non-canonical hormone receptor for strigolactone. *Nature*, 536: 469-473.
- Yasui M., Ota R., Tsukano C., Takemoto Y., 2017. Total synthesis of avenaol. *Nature Communications*, 8: 674.
- Yokota T., Sakai H., Okuno K., Yoneyama K., Takeuchi Y., 1998. Alectrol and Orobanchol, Germination Stimulants for *Orobanche Minor*, from Its Host Red Clover. *Phytochemistry*, 49 (7): 1967-1973.
- Yoneyama K., Takeuchi Y., Yokota T., 2001. Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiologia Plantarum*, 112: 25–30.
- Yoneyama K., Yoneyama K., Takeuchi Y., Sekimoto H., 2007. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, 225: 1031–1038.
- Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuchi Y., Ogasawara S., Akiyama K., Hayashi H., Yoneyama K., 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist*, 179: 484-494.

- Yoneyama K., Xie X., Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama K., 2011. Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 65: 495–504.
- Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Nakatani Y., Akiyama K., McErlean C.S.P., 2018a. Which are the major players , canonical or non-canonical strigolactones ?. *Journal of Experimental Botany*, 69 (9): 2231–2239.
- Yoneyama K., Mori N., Sato T., Yoda A., Xie X., Okamoto M., Iwanaga M., Ohnishi T., Nishiwaki H., Asami T., Yokota T., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T., 2018b. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 218: 1522–1533.
- Yu C., Chen Y., Lu C., Hwang J., 2006. Prediction of Protein Subcellular Localization. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64: 643–651.
- Zacchini M., De Agazio M., 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum*, 48 (4): 589–592.
- Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J., 2001. Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive (*Olea europaea*) Fruit Protein Content, Composition, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4267-4270.
- Zhang Y., van Dijk A.D.J., Scaffidi A., Flemmati G.R., Hofmann M., Charnikhova T., Verstappen F., Hepworth J., van der Krol S., Leyser O., Smith S.M., Zwanenburg B., Al-Babili S., Ruyter-Spira C., 2014. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 10: 1028-1033.
- Zhao L., Zhou X.E., Wu Z., Yi W., Xu Y., Li S., Xu T., Liu Y., Chen R., Kovach A., Kang Y., Hou L., He Y., Xie C., Song W., Zhong D., Xu Y., Wang Y., Li J., Zhang C., Melcher K., Xu H.E., 2013. Crystal structures of two phytohormone signal-transducing α/β hydrolases: karrikin-signaling KAI2 and strigolactone-signaling DWARF14. *Cell Research*, 23: 436–439.

- Zheng K., Wang X., Weighill D.A., Guo H., Xie M., Yang Y., Yang J., Wang S., Jacobson D.A., Guo H., Muchero W., Tuskan G.A., Chen J., 2016. Characterization of DWARF14 Genes in *Populus*. *Scientific Reports*, 6: 1–11.
- Zheng Y., Kumar N., Gonzalez P., Etxeberria E., 2018. Strigolactones restore vegetative and reproductive developments in Huanglongbing (HLB) affected, greenhouse-grown citrus trees by modulating carbohydrate distribution. *Scientia Horticulturae*, 237: 89–95.
- Zhou F., Lin Q., Zhu L., Ren Y., Zhou K., Shabek N., Wu F., Mao H., Dong W., Gan L., Ma W., Gao H., Chen J., Yang C., Wang D., Tan J., Zhang X., Guo X., Wang J., Jiang L., Liu X., Chen W., Chu J., Yan C., Ueno K., Ito S., Asami T., Cheng Z., Wang J., Lei C., Zhai H., Wu C., Wang H., Zheng N., Wan J., 2013. D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*, 504: 406–410.
- Zohary D., Hopf M., Weiss E., 2012. *Domestication of Plants in the Old World* (4th ed.). Oxford University Press, United States. 251s.
- Zou J., Zhang S., Zhang W., Li G., Chen Z., Zhai W., Zhao X., Pan X., Xie Q., Zhu L., 2006. The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal*, 48: 687–696.
- Zwanenburg B., Mwakaboko A.S., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D., 2009. Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science*, 65: 478–491.
- Zwanenburg B., Pospisil T., Zeljkovic C., 2016. Strigolactones : new plant hormones in action. *Planta*, 243: 1311–1326.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aslıhan ÖZBİLEN

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 10.03.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004-2009)

Yüksek Lisans Öğrenimi : İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (2010-2011)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı (2011-2013)

Doktora Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (2013-2019)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Güngör T., Cömert Önder F. , Sezer F., Özbilen A., Taşkin K.M., Ay M., "Synthesis of SMZ Derivatives and Investigation of Effects on Germination, Root and Plant Growth of *Arabidopsis thaliana* L.", TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY, 10.3906/kim-1901-27, 2019

Hürkan K., Sezer F., Özbilen A., Taşkin K.M., "Identification of reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction based gene expression studies on various Olive (*Olea europaea* L.) tissues", Journal of Horticultural Science and Biotechnology, vol.93, pp.644-651, 2018

Özbilen A., "Angiospermelerde Genomik Damgalama", The International Journal of Innovative Approaches in Science Research, cilt.1, ss.47-56, 2017

Taşkin K.M., Özbilen A., Sezer F., Hürkan K., Güneş Ş. , "Structure and expression of dna methyltransferase genes from apomictic and sexual *Boecheira* species", Computational Biology and Chemistry, vol.67, pp.15-21, 2017

Sezer F. , Yüzbaşıoğlu G. , Özbilen A., Taşkin K.M., "Genome-wide identification and expression analysis of swi1 genes in *Boecheira* species", Computational Biology and Chemistry, vol.62, pp.75-81, 2016

Taşkin K.M., Özbilen A., Sezer F., Çördük N., Erden D., "Determination of the expression levels of DNA methyltransferase genes during a highly efficient regeneration system via shoot organogenesis in the diploid apomict *Boecheira divaricarpa*", Plant Cell Tissue and Organ Culture, vol.121, pp.335-343, 2015

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Sezer F., Özbilen A., Sapmaz U., Taşkin K.M., "The Strigolactone and Karrikin Signaling Pathways in Prunus Species; An *in silico* Analysis of the D14 a/b Hydrolase Protein Family, Dwarf14 (D14) and Karrikin İnsensitive2 (KAI2) Genes", 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İzmir, TÜRKİYE, 5-8 Eylül 2018, pp.127-127

Taşkin K.M., Özbilen A., Sezer F., Hürkan K., "Expression analysis of the genes involved in strigolactone biosynthesis in olive", 2nd International Congress on Strigolactones, Torino, İTALYA, 27-30 Mart 2017, pp.98-98

Taşkin K.M., Özbilen A., Sezer F., Hürkan K., "Molecular characterization of olive Strigolactone biosynthesis genes", 2nd International Congress on Strigolactones, Torino, İTALYA, 27-30 Mart 2017, pp.106-106

Özbilen A., Sezer F., Hürkan K., Taşkin K.M., "Zeytin (*Olea europaea* L.) Çelik Köklenmesi ve İn Vitro Tohum Çimlenmesi Üzerine Strigolaktonların Etkileri", VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Adana, TÜRKİYE, 5-7 Ekim 2017

Hürkan K., Sezer F., Özbilen A., Taşkin K.M., "Zeytin (*Olea europaea* L.) Dokularında Real-Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Gen Anlatım Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Referans Genlerin Belirlenmesi", VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Adana, TÜRKİYE, 5-7 Ekim 2017

Özbilen A., Taşkin K.M., "DNA Methyltransferase Activities During in vitro Conditions of Diploid Apomict *Boechera divaricarpa*", 8th PhD School on Plant Development, Retzbach, Zellingen, ALMANYA, 7-9 Ekim 2015, pp.26-26

Eroğlu Ö., Özbilen A., Taşkin K.M., "Apomikt ve Seksüel *Boechera* Türleri Genomlarında SUVH Histon Metiltransferaz Genlerinin Karakterize Edilmesi", 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, TÜRKİYE, 18-19 Aralık 2015, ss.240-240

Özbilen A., Taşkin K.M., "The Identification of an Imprinted Gene YUC10 in Sexual and Apomict *Boechera* Species", International Workshop on Green Biotechnology, Kocaeli, TÜRKİYE, 21-23 Eylül 2015, pp.69-69

Özbilen A., Taşkin K.M., "Apomikt *Boechera Divaricarpa* Doku Kültürlerinde DNA Metiltransferaz Gen Anlatımlarının Belirlenmesi", 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Eskişehir, TÜRKİYE, 23-27 Haziran 2014, ss.324-324

Özbilen A., Taşkin K.M., "In Silico and Molecular Characterization of Some Paternally Expressed Imprinted Genes in Sexual and Apomict *Boechera* Species", European Frontiers of Plant Reproduction Research 2013, Oslo, NORVEÇ, 2-4 Ekim 2013, pp.64-65

Sezer F., Özbilen A., Güneş Ş. , Özcan N., Türe D. , Konuk E., Taşkin K.M., "Keten (*Linum usitatissimum*) Est Veri Tabanlarında Korunmuş Mikrona ve Hedef Genlerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi", 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İzmir, TÜRKİYE, 3-7 Eylül 2012, ss.722-723

c) Katıldığı Projeler

"Zeytin (*Olea europaea* L.) Fitosterol Biyosentezini Kontrol Eden Moleküler Mekanizmaların ve İçeriklerinin Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması", TÜBİTAK Projesi, 118O405, Bursiyer, 2019, Devam Ediyor

"Zeytin (*Olea europaea* L.) Strigolakton Biyosentezine Katılan Genlerin Belirlenmesi ve Bitki Büyüme Düzenleyicisi Olarak Etkilerinin İncelenmesi", TÜBİTAK Projesi, 215O543, Bursiyer, 2019, Tamamlandı

"Zeytin'de E Vitamini Biyosentez Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu", TÜBİTAK Projesi, 113O724, Araştırmacı, 2014, Tamamlandı

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi 2011- Devam ediyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi : aslihanozbilen@hotmail.com - aozbilen@comu.edu.tr