

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA L.*) TOKOFEROL
BİYOSENTEZİNDE ROL ALAN GENLERİN
KARAKTERİZASYONU**

Fatih SEZER

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 03/07/2015

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

ÇANAKKALE

Fatih SEZER tarafından Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN yönetiminde hazırlanan ve 03/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Zeytin (*Olea europaea* L.) Tokoferol Biyosentezinde Rol Alan Genlerin Karakterizasyonu” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Başkan

Prof. Dr. Murat ŞEKER

Üye

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Üye

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Üye

Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 1130724 numaralı projeden desteklenmiştir.

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.

Fatih SEZER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesi ile eğitimim ve çalışmamın her aşamasında desteği bulunan danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN' a bana bu konuda çalışma fırsatı tanıdığı, çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemediği için teşekkür ederim.

Tez konumun ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde büyük katkıları olan sayın hocam Prof. Dr. Murat ŞEKER'e ve tez savunma sınavıma gelerek bizi onurlandıran, kendimi her zaman öğrencisi gibi hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunarak tezimin geliştirilmesinde katkıları bulunan sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimimi 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım zeytin örneklerini aldığım Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğüne ve arazi çalışmasında yardımları bulunan Mehmet Ali GÜNDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Damla ERDEN, Gözde YÜZBAŞIOĞLU, Aslıhan ÖZBİLEN, Didem TÜRE, Kaan HÜRKAN, İlknur Nezahat ÇILDIR ve Tuğba ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan ve her zaman yanımda olan gerek manevi gerek maddi desteğini esirgemeyen annem Ayşe SEZER, babam Engin SEZER'e ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatih SEZER

Çanakkale, Temmuz 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

PDS1	Phytoene Desaturation 1
HPT1	Homogentisate Phytyltransferase 1
VTE3	Vitamin E Deficient 3
TCYC	Tokoferol Siklaz
GTMT	Gama Tokoferol Metiltransferaz
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	'Rapid Amplification of cDNA Ends'
Bç	Baz Çifti
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	Distile Su
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
M	Molar
ml	Mililitre
°C	Santigrat Derece
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Rotation Per Minute (Devir/Dakika)
U.V	Ultra Viyole
HPLC-FLD	Post-Kolon Floresan Türevlendirme ile Yüksek Performans Sıvı Kromatografi

ÖZET

ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA L.*) TOKOFEROL BİYOSENTEZİNDE ROL ALAN GENLERİN KARAKTERİZASYONU

Fatih SEZER

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

03/07/2015, 80

Zeytin (*Olea europaea L.*) ekonomik açıdan önemli, yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan, yüksek E vitamini içeriğine sahip ve insan sağlığı açısından faydaları birçok çalışmaya konu olmuş bir Akdeniz bitkisidir. Sadece bitkilerde üretilen E vitamini tokoferoller olarak bilinen ve yüksek antioksidan özellikleri olan metabolitlerdir. Çoğunlukla yağ bitkileri tarafından üretilen E vitamininin kalp damar hastalıkları ve kanser gibi insan sağlığı açısından önemli hastalıklarda olumlu etkileri vardır. Tokoferollerin biyosentezinde bir grup metil transferaz ve siklaz enzimleri rol almaktadır. Zeytin türünde yakın zamanda transkriptomik çalışmalarla bazı süreçlerde rol alan genlere ait diziler ortaya çıkarılmış olmasına karşın henüz bu türde E vitamini biyosentezinden sorumlu genler tanımlanmamıştır. Bu tez çalışmasında zeytin tokoferol biyosentezinde rol alan genlerin tam uzunluktaki transkriptleri RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi ile elde edilmiştir. İlgili genlerin anlatımları meyve gelişiminin değişik evrelerinde real time PZR ile belirlenmiş ve aynı süreçlerde HPLC metodu ile tokoferol miktarları ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada *HPT1*, *VTE3*, *TCYC* ve *GTMT* genlerinin zeytin meyvesi erken gelişim dönemlerinde anlatımlarının daha yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Biyosentez yolunda görev alan PDS1 genlerinin anlatımları ise zeytin gelişiminden etkilenmemiştir. HPLC analizleri de benzer şekilde erken dönemdeki meyvelerden elde edilen zeytinyağında daha yüksek konsantrasyonlarda E vitamini miktarının olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Tokoferol, E vitamini, *Olea europaea L.*, Gerçek zamanlı PZR, RACE.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN OLIVE (*OLEA EUROPAEA L.*) TOCOPHEROL SYNTHESIS

Fatih SEZER

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Biological Science

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

03/07/2015, 80

Olive (*Olea europaea L.*) is an economically important, widely cultivated mediterranean fruit crop containing high amount of vitamin E that its beneficial effects on human health have been investigated. Vitamin E constitutes of metabolites with high antioxidant effects, known as tocopherols. Vitamin E is mostly synthesized by oil plants and reported for its beneficial effects on human diseases like coronary heart disease and cancer. A group of methyltransferase and cyclase enzymes takes role in tocopherol biosynthesis. Although, many genes related to diverse processes have recently been discovered via transcriptomic research in olive, no genes involved in vitamin E biosynthesis have not been characterized yet. Therefore in this dissertation the full length transcripts of genes involved in tocopherol biosynthesis were obtained with RACE method. Levels of gene expression through fruit development was compared by Real Time PCR and tocopherol content was analysed with HPLC in Olive. Our Expression studies showed that expression levels of *HPT1*, *VTE3*, *TCYC* and *GTMT* genes were higher in early maturation steps. However *PDS1* expression was not affected by olive fruit maturation. Similarly HPLC analysis showed higher concentrations of vitamin E in early maturation steps.

Keywords: Tocopherol, Vitamin E, *Olea europaea L.*, Real Time PCR, RACE.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	i
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
BÖLÜM – 1 GİRİŞ.....	1
1. 1. E Vitamini	1
1. 2. Tokoferollerin Keşfi	1
1. 3. Kimyasal Yapısı	2
1. 4. Tokoferollerin Biyolojik Fonksiyonu.....	3
1. 5. Tokoferollerin Bitkilerdeki Fonksiyonu.....	3
1. 6. Tokoferol Biyosentezi	4
1. 7. Tez Çalışmasının Hedefleri	8
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM	13
3. 1. Bitki Materyali	13
3. 2. Örneklerin Alınması	13
3. 3. Olgunluk indeksinin hesaplanması.....	13
3. 4. RNA İzolasyonu	14
3. 5. RNA miktarlarının ölçülmesi	15
3. 6. Çalışmada kullanılan primerlerin seçilmesi	15
3. 7. DNaz Uygulaması	18
3. 8. 3' RACE Çalışmaları için cDNA Sentezi	18
3. 9. 3' RACE Çalışmaları.....	19
3. 10. 5' RACE Çalışmaları için cDNA Sentezi	21
3. 11. 5' RACE Çalışmaları.....	22
3. 12. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	24
3.12.1 Elektrofrezide kullanılan tamponların hazırlanması.....	24
3.12.1.1. 10XTAE tamponu.....	24

3.12.1.2. Ethidium bromide stok çözeltisi	25
3.12.1.3. 1XTAE tamponu.....	25
3. 13. Jelden PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	25
3. 14. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	26
3. 15. Dizi Analizi	26
3. 16. Biyoinformatik Analizler	26
3. 17. Gerçek Zamanlı PZR Deneyleri	27
3. 18. HPLC Analizi	32
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4. 1. Bitki Materyali	33
4. 2. RNA izolasyonu	34
4. 3. Transkriptlerin elde edilmesi.....	35
4. 4. 3' RACE Çalışmaları.....	39
4. 5. 5' RACE Çalışmaları.....	43
4. 6. Tokoferol genlerinin dizi analizi	46
4. 7. Filogenetik Analizler	51
4. 8. Gen Anlatımı Çalışmaları.....	59
4. 9. Standart Eğri Deneylerinin Kurulması	59
4. 10. Verimlilik Değerlerinin Hesaplanması.....	59
4. 11. Gen Anlatımı Çalışmalarının Gerçekleştirilmesi	64
4. 12. HPLC Deneyleri	67
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	73
EKLER.....	I
EK 1. <i>OePDS1</i> ve model türelere ait <i>PDS1</i> dizilerinin ile karşılaştırılması	I
EK 2. <i>OeHPT1</i> ve model türelere ait <i>HPT1</i> dizilerinin ile karşılaştırılması.....	IV
EK 3. <i>OeVTE3</i> ve model türelere ait <i>VTE3</i> dizilerinin ile karşılaştırılması.....	VII
EK 4. <i>OeTCYC</i> ve model türelere ait <i>TCYC</i> dizilerinin ile karşılaştırılması	IX
EK 5. <i>OeGTMT</i> ve model türelere ait <i>GTMT</i> dizilerinin ile karşılaştırılması.....	XII
EK 6. GAPDH2 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları	XIV
EK 7. PDS1 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları.....	XIV
EK 8. HPT1 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları	XV
EK 10. TCYC geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları	XVI
EK 11. GTMT geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları.....	XVI

ÖZGEÇMİŞ	XVII
----------------	------

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları.....	2
Şekil 1.2. Tokoferol bileşiklerinin kimyasal yapıları	2
Şekil 1.3. <i>PDS1</i> aktivitesi ile homojentisat oluşumunu sağlayan reaksiyon	4
Şekil 1.4. <i>HPT1</i> aktivitesi ile 2-methyl-6phytyl-1,4-benzoquinol oluşumu.....	5
Şekil 1.5. <i>VTE3</i> enzimi aktivitesi 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol oluşumu	6
Şekil 1.6. Tokoferol siklaz aktivitesi ile gamma tokoferole sentezi.....	7
Şekil 1.7. Gama tokoferolün α tokoferole dönüştürülmesi.....	7
Şekil 1.8. Tokoferol biyosentez yolu	8
Şekil 3.1. Race çalışmalarında kullanılan primerlerin genel yerleşimleri.	20
Şekil 3.2. Kantitatif PZR çalışmasında kullanılan örnek plate düzeni	30
Şekil 3.3. Kantitatif PZR verimliliklerinin belirlenmesinde kullanılan plate düzeni	31
Şekil 4.1. Gen anlatımı çalışmasında kullanılan meyve örnekleri.....	33
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. .	35
Şekil 4.3. <i>A. thaliana</i> tokoferol genlerinin blastn analizi sonuçları.....	37
Şekil 4.4. 3' RACE PZR ürünleri.....	40
Şekil 4.5. Saflaştırılmış 3' RACE ürünleri ile yapılmış kontrol PZR reaksiyonları.	42
Şekil 4.6. 5' RACE tekniğinin temel prensibi.....	43
Şekil 4.7. 5' RACE çalışması ile elde edilen nested gradient PZR ürünleri.	45
Şekil 4.8. 5' RACE çalışması ile elde edilen nested gradient PZR ürünleri.....	45
Şekil 4.9. <i>PDS1</i> genine en yüksek benzerlik gösteren protein dizileri	46
Şekil 4.10. <i>HPT1</i> genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi	47
Şekil 4.11. <i>VTE3</i> genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi.....	48
Şekil 4.12. <i>TCYC</i> genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi	49
Şekil 4.13. <i>GTMT</i> genine ait en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi	49
Şekil 4.15 Zeytin tokoferol biyosentez genleri üzerindeki korunmuş bölgeler.....	50
Şekil 4.16. <i>PDS1</i> protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç.....	53
Şekil 4.17. <i>HPT1</i> protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç.....	54
Şekil 4.18. <i>VTE3</i> protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç.....	55
Şekil 4.19. <i>TCYC</i> protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç.	57
Şekil 4.20. <i>GTMT</i> protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç.....	58
Şekil 4.16. <i>GAPDH2</i> geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri	60

Şekil 4.17. <i>HPT1</i> geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri	61
Şekil 4.18. <i>VTE3</i> geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri.....	62
Şekil 4.19. <i>TCYC</i> geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri	63
Şekil 4.20. <i>GTMT</i> geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri	64
Şekil 4.21. <i>PDS1</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	65
Şekil 4.22. <i>HPT1</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları.	65
Şekil 4.23. <i>VTE3</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	66
Şekil 4.24. <i>TCYC</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları.	66
Şekil 4.25. <i>GTMT</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları.	67
Şekil 4.26. Zeytin meyvelerinin gelişimi boyunca tokoferol miktarlarında değişimler	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Zeytin örneklerinin alındığı tarihler	13
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer dizileri	16
Çizelge 3.3. Dnaz Reaksiyonu bileşenleri	18
Çizelge 3.4. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları	19
Çizelge 3.5. 3' RACE çalışmasında uygulanan cDNA sentezi programı	19
Çizelge 3.6. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları	20
Çizelge 3.7. 3' RACE çalışmaları I. PZR koşulları	21
Çizelge 3.8. Nested PZR için kullanılan PZR programı	21
Çizelge 3.9. 5' RACE cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları	22
Çizelge 3.10. 3' RACE çalışmasında uygulanan cDNA sentezi programı	22
Çizelge 3.11. Optimum PZR bileşenleri ve konsantrasyonları	23
Çizelge 3.12. RACE çalışmalarında uygulanan ilk PZR koşulları	23
Çizelge 3.13. Nested PZR için kullanılan PZR programı	24
Çizelge 3.14. DNaz Reaksiyonu bileşenleri	28
Çizelge 3.15. Kantitatif PZR çalışmalarında kullanılan cDNA sentezi karışımı	28
Çizelge 3.16. Kantitatif PZR çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı	29
Çizelge 4.1. RNA örneklerinin florometrik yöntemle ölçülen konsantrasyonları	34
Çizelge 4.3. SRA veritabanlarından elde edilen dizilerin blastn analizi sonuçları	38
Çizelge 4.4. <i>A. thaliana</i> tokoferol biyosentez genlerinin genel bilgileri	39
Çizelge 4.5. RACE çalışmaları sonucu beklenen PZR ürünü büyüklükleri	41

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1. 1. E Vitamini

E vitamini, tokoferoller olarak adlandırılan ve sadece bitkiler tarafından üretilen bir grup molekülden oluşur. Yüksek antioksidan özelliğine sahip tokoferollerin moleküler yapılarında ve biyolojik fonksiyonlarında farklılıklar gösteren dört formu mevcuttur. Bunlar α tokoferol, β tokoferol, γ tokoferol ve δ tokoferol olarak bilinirler. Yağ bitkilerinde en çok görülen α tokoferol ve γ tokoferol tipleridir. Günümüzde α tokoferol ve γ tokoferol yüksek antioksidan özellikleri ile tanınmaktadır (Kamal-Eldin ve Appelqvist, 1996; Seker ve ark., 2007).

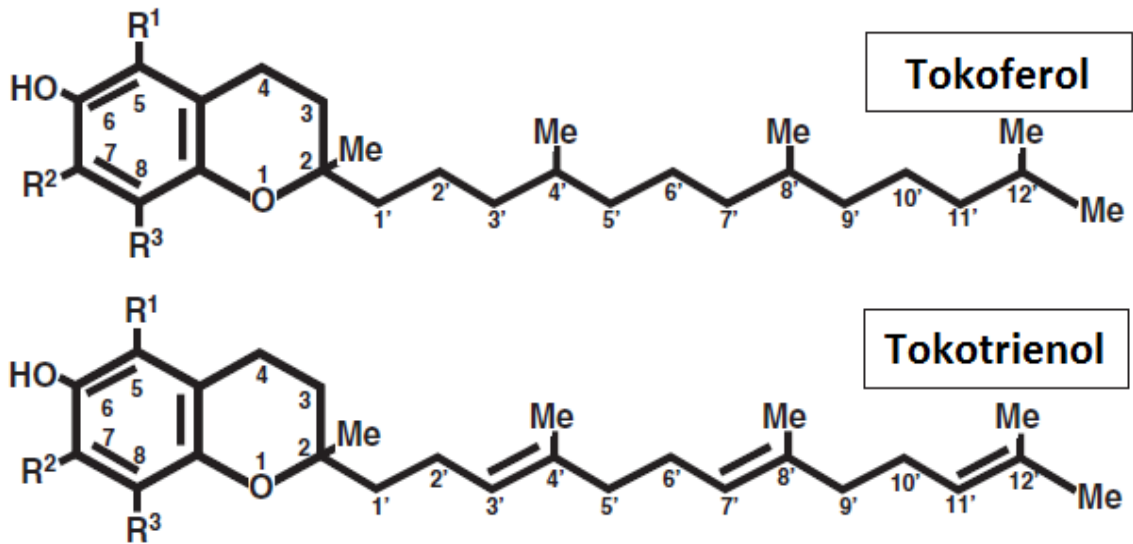
E vitamininin insan sağlığına etkileri birçok çalışmaya konu olmuş ve çeşitli insan hastalıkları üzerine olumlu etkileri ortaya çıkarılmıştır. Özellikle kalp ve damar rahatsızlıkları açısından koruyucu etkisi bir çok çalışma ile bildirilmiştir (Rimm ve ark., 1993; Jha ve ark., 1995; Pryor, 2000). Son yıllarda E vitamininin bazı kanser türlerini arttırdığına yönündeki çalışmalar tartışmalara yol açmıştır (Gaziano ve ark., 2009; Lippman ve ark., 2009; Klein ve ark., 2011). Bu konuda yürütülen son çalışmalarda γ tokoferol'ün bir çok kanser türünde önleyici etkisinin olduğu, ama α tokoferol içeriği yüksek ilaçların kanser üzerinde bir etkisinin olmadığını belirtilmiştir (Yang ve ark., 2012). Bu moleküllerin ayrıca hayvan diyetine katılmasının et kalitesi üzerine olumlu etkileri de belirtilmiştir (Liu ve ark., 1995).

1. 2. Tokoferollerin Keşfi

Vitamin E hakkında ilk çalışma 1922 yılında Evans ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar farelere özel bir diyet uyguladıklarında embriyoların anne karnında öldüğünü fakat diyete marul ve buğday eklendiğinde embriyoların normal gelişimlerine devam ettiklerini göstermişlerdir. Çalışmada, bu durumdan sorumlu molekülün yağda çözünen bir metabolit olduğu belirlemiş ve “faktör x” veya “anti-sterility faktörü” olarak isimlendirilmiştir (Evans ve Bishop, 1922). Bu yeni metabolit vitamin D'yi bulan aynı araştırmacılar tarafından keşfedildiği için vitamin E olarak adlandırılmaya başlamıştır (Evans, 1925; Evans ve Burr, 1925). Aynı grup daha sonraki yıllarda buğday tohumu yağından E vitamini saflaştırmayı başarmıştır (Emerson ve ark., 1936).

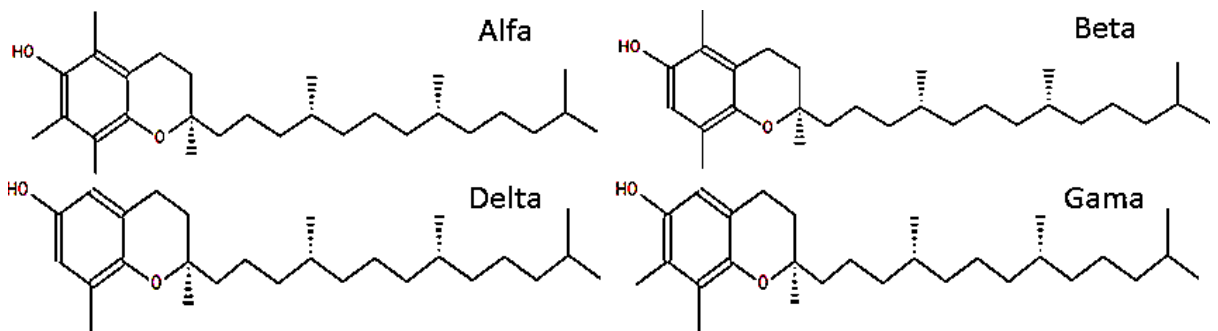
1. 3. Kimyasal Yapısı

E vitamini bileşikleri tokoferol ve tokotrienollerı içeren kimyasallardır. Tüm E vitamini formları bir kroman grubu ile fitil yan zincir içerirler. Tokoferol ve tokotrienoller yan zincirleri ile birbirinden ayrılmaktadır. α , β , γ ve δ formları bulunan tokoferol ve tokotrienoller toplam 8 farklı E vitamini bileşığı içerirler. Tokoferoller doymuş yan zincir yapıları ile doymamış yan zincir içeren tokotrienollerden ayrılmaktadır (Şekil 1.1) (Sen ve ark., 2006). Bu yapılarından dolayı tokoferollerin yan zincirleri doğrusal iken tokotrienollerin doğrusal değildir.



Şekil 1.1. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları

Tokoferoller 4 farklı form halinde bulunur kromanol halkaya eklenen metil grupları ile birbirinden ayrılmaktadır (Şekil 1.2). Tüm tokoferol bileşikleri yağda çözünür yapıdadır ve farklı aktivite seviyelerinde antioksidan özelliktedirler (Munné-Bosch ve Alegre, 2002).



Şekil 1.2. Tokoferol bileşiklerinin kimyasal yapıları

1. 4. Tokoferollerin Biyolojik Fonksiyonu

Tokoferoller antioksidan özellikleri ile bilinmektedir (Burton ve Traber, 1990). Oksijen radikalleri canlı sistemlerde en çok önem arz eden serbest radikallerdendir. Bunlar içerisinde ise en sık görülenleri süperoksit iyonları ve hidroksil radikalleridir. Bu serbest radikaller canlı sistemlerde DNA, protein ve yağlarda yıkıcı etkiler gösterirler. Bunlardan biri olan lipid peroksidasyonu yağların serbest radikallerin varlığında yıkımını tanımlamaktadır. Antioksidan aktivite gösteren tokoferol gibi kimyasallar serbest radikalleri baskılayarak etkilerini durdururlar. Lipit peroksidasyonu yağ birikimi görülen zeytin meyveleri ve doğrudan zeytinyağında yağ yıkımını azaltarak yağların kararlılığını artırırlar (Burton ve Traber, 1990; Packer ve ark., 2001; Ogata ve ark., 2014).

1. 5. Tokoferollerin Bitkilerdeki Fonksiyonu

Tokoferollerin bitki bünyesindeki dağılımları incelendiğinde diğer dokulara oranla tohumlarda daha yüksek oranlarda birikim gösterdiği görülmüştür (Maeda ve DellaPenna, 2007). Tokoferol üretemeyen mutant *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde tohumların canlılığında azalma görülmüştür ve aynı mutantlarda lipid peroksidasyonunda artış ile beraber kök, sürgün ve kotiledon gelişiminde kusurlar bildirilmiştir (Sattler ve ark., 2004). *Vte2* geninde oluşturulan bu mutasyon sonucunda embriyolar normal gelişmiş ve tohumlar beklenen boyuta ulaşmış olmasına rağmen çimlenen fideler depo lipidlerini etkin bir şekilde metabolize edememiş ve enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu ürünlerinde artış gösterdiği rapor edilerek tokoferollerin tohumlarda, çimlenmede ve çimlenme sonrası fidede enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunu kontrol altında tuttuğu önerilmiştir (Sattler ve ark., 2004).

Tokoferoller hücrelerde yağda çözünebilir yapılarının da yardımı ile hücre zarındaki fosfolipid tabakalarda yer almakta ve antioksidan aktiviteleri sebebi ile hücre zarına kararlılık kazandıran moleküllerden biri olduğu düşünülmektedir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002). Bunun yanında hücre zarının kararlılığının sağlanmasında diğer antioksidanlar ve hücre zarı kompozisyonunun da etkinliği önemli faktörlerdir. Bu sebeple E vitamininin bu süreçteki tek başına hücre zarı kararlılığına katkısını incelemek mümkün olamamıştır (Munné-Bosch ve Alegre, 2002).

α Tokoferol üzerine yapılan çalışmalar bu molekülün hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminde rol aldığını göstermiştir (Boscoboinik ve ark., 1991a). α tokoferolün hücrelerde

protein kinaz C (PKC) proteinini baskılayarak gen anlatımında değişimlere sebep olduğu gösterilmiştir (Boscoboinik ve ark., 1991b; Sharma ve Vinayak, 2012). PKC bir protein ailesidir ve memelilerde hücre içi birçok süreci kontrol ettikleri bildirilmiştir (Mellor ve Parker, 1998).

Kloroplastlar ışık ve oksijeni yüksek ortamlarda çalışırlar. Bu sürecin doğal bir yan ürünü olan reaktif oksijen türleri ise yüksek konsantrasyonlarda fotosentetik mekanizmalarda hasara sebep olmaktadır. Bu süreçte kloroplast tilakoid zarlarında bulunan tokoferol reaktif oksijenlerin detoksifiye edilmesinde görev alarak yüksek ışığın oluşturduğu stresin kontrol altında tutulmasında görev alır (Miret ve Munné-Bosch, 2015). Tokoferoller ayrıca su ve tuz gibi diğer abiyotik stres koşullarında da koruyucu olarak görev almaktadır. Stres koşullarında tokoferol miktarlarında artış görölürken, tokoferol üretmeyen bitki hatlarının çeşitli abiyotik stres koşullarına daha hassas olduğu görölmüştür. (Munné-Bosch, 2005; Abbasi ve ark., 2007; Ellouzi ve ark., 2013)

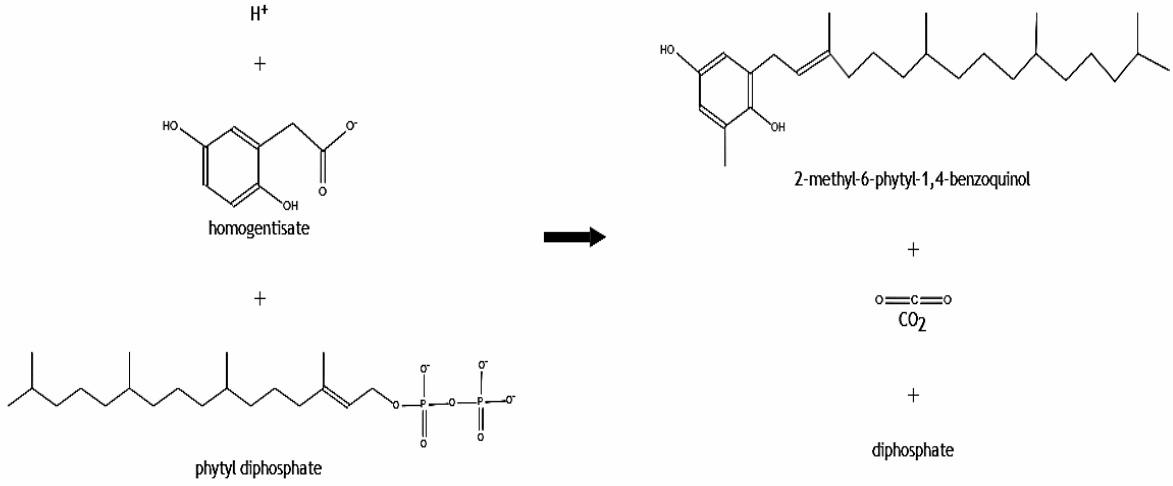
1. 6. Tokoferol Biyosentezi

şikimat yolağı mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan ve fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi bazı aromatik aminoasitlerin ve sentezinin gerçekleştiği bir biyosentetik yolaktır (Herrmann ve Weaver, 1999). Tokoferollerin biyosentezinde ilk ürün 4-4-hidroksifenil pirüvik asit (p-HPPA) bu yoldan sentezlenir. hidroksifenil pirüvik asit dioksigenaz enzimi p-HPPA'yı okside ederek homojentisatı oluşturur (şekil 1.3). Bu enzim sitosolde bulunur ve sulcotrione, isoxasol gibi herbisitlerin hedefidir (Garcia ve ark., 1999). Homojentisat aynı zamanda tüm tokoferol ve plastokinonların öncölüdür (Lushchak ve Semchuk, 2012).



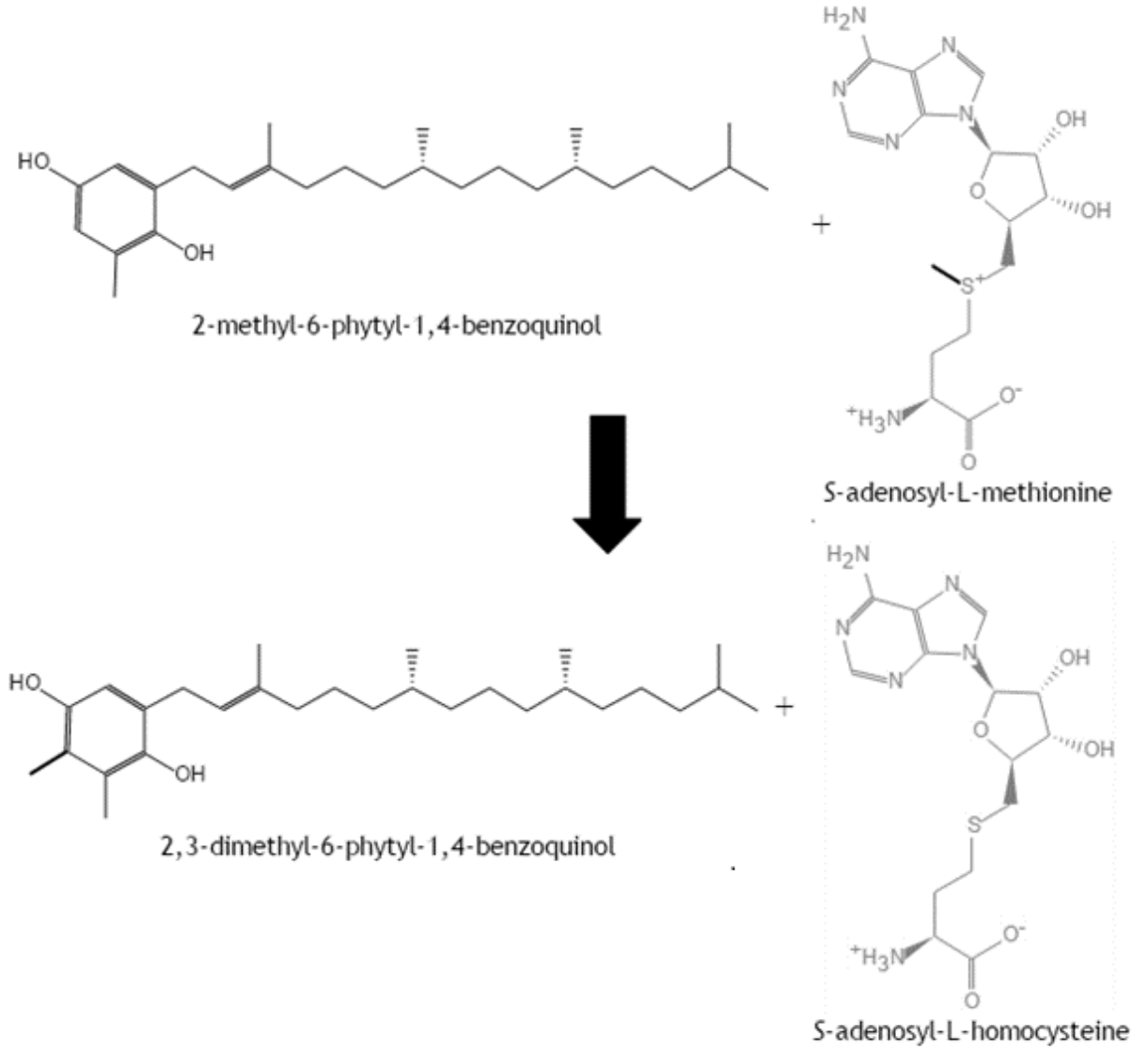
şekil 1.3. *PDS1* aktivitesi ile homojentisat oluşumunu sağlayan reaksiyon

Homojentisat phyltransferase aktivitesi ile oluşan 2-methyl-6phytyl-1,4-benzoquinol farklı tip tokoferollerin sentezi için kaynak oluşturur (şekil 1.4).



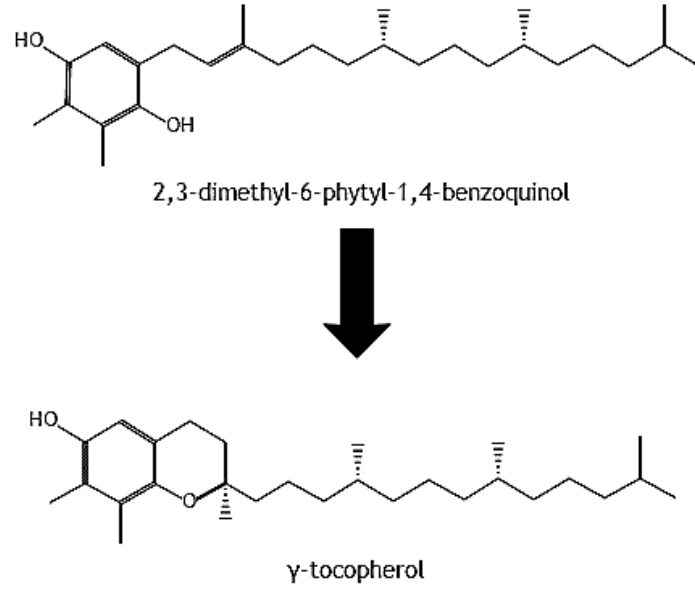
şekil 1.4. *HPT1* aktivitesi ile 2-methyl-6phytyl-1,4-benzoquinol oluşumu

Bu aşamadan sonra her tokoferol grubu bir siklaz ve çeşitli metiltransferaz enzimlerinin aktivitesi ile oluşturulur. *VTE3* geni bu aşamada 2-methyl-6phytyl-1,4-benzoquinol molekülüne bir metil grubu bağlayarak gamma tokoferolün öncülü olan 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol bileşiğinin sentezini sağlar (şekil 1.5).



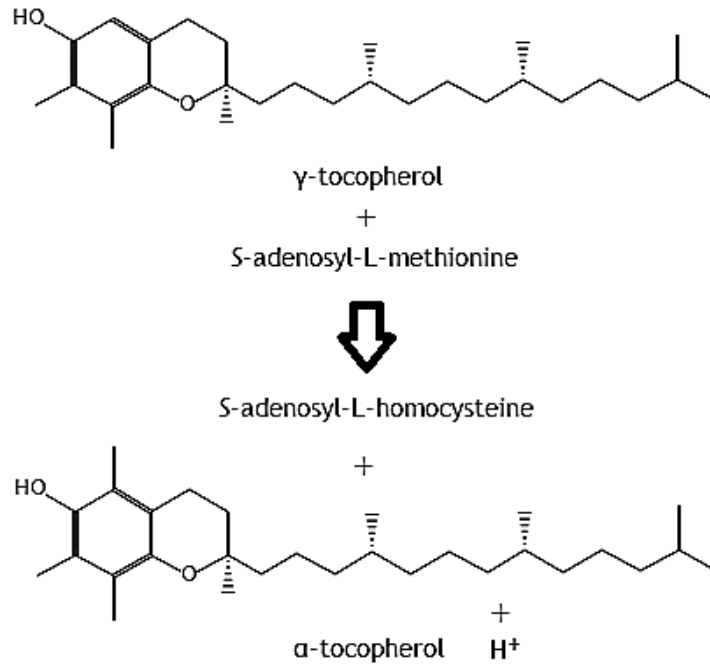
Şekil 1.5. VTE3 enzimi aktivitesi 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol oluşumu

2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol sonrasında TOCOPHEROL CYCLASE enzimi ile gamma tokoferole dönüştürülür (Şekil 1.6).

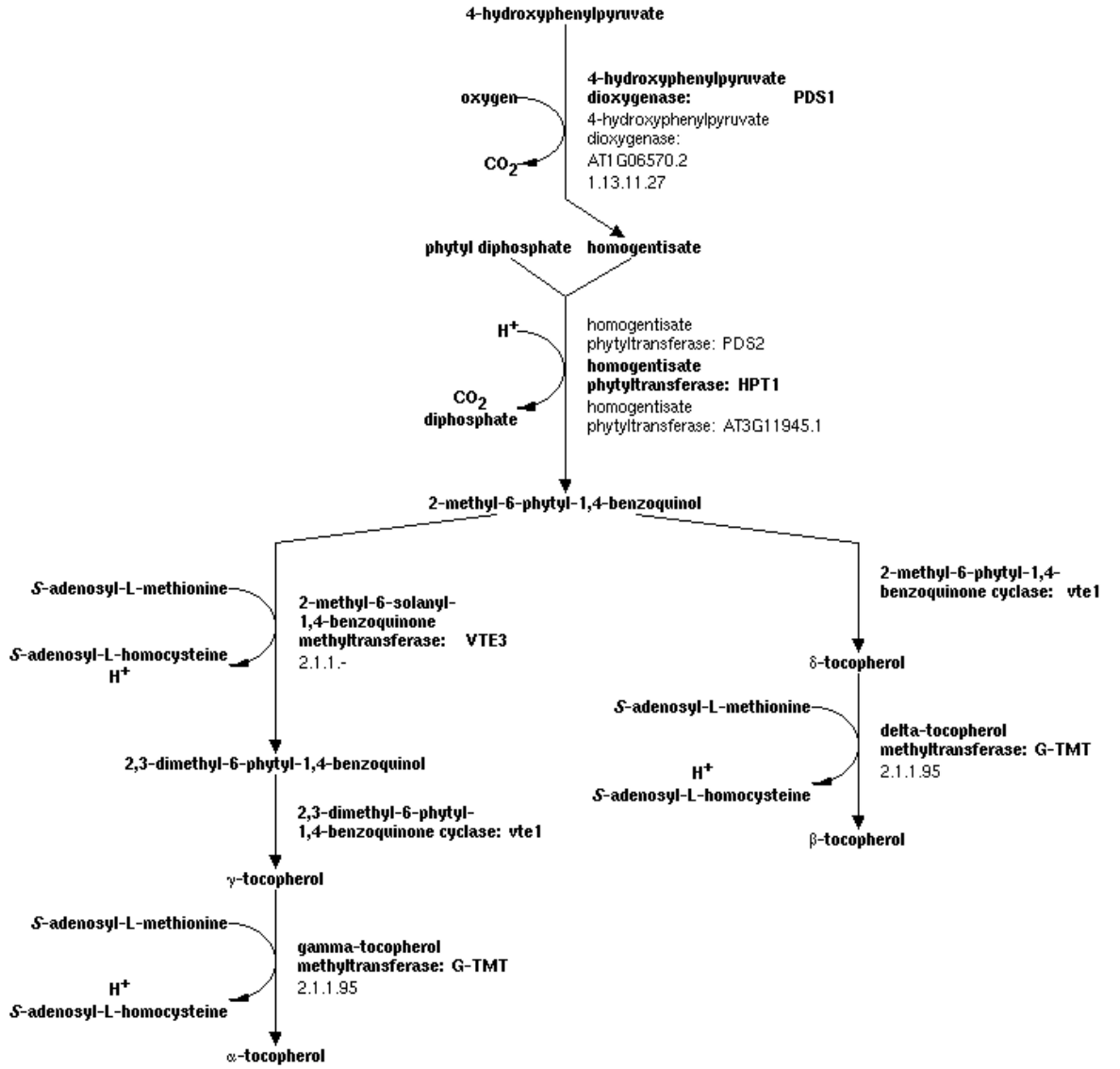


Şekil 1.6. Tokoferol siklaz aktivitesi ile gamma tokoferole sentezi

Alfa tokoferolün biyosentezinde son basamak gamma tokoferole bir metil grubunun takılmasıdır ve bu reaksiyon gama tokoferol metiltransferaz enzimi tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Gama tokoferolün α tokoferole dönüştürülmesi



Şekil 1.8. Tokoferol biyosentez yolu (Plant Metabolic Pathway Database, <http://www.plantcyc.org>) (Zhang 2005).

1.7. Tez Çalışmasının Hedefleri

Tokoferol biyosentez yolu *Arabidopsis thaliana* gibi model türlerde araştırılmış olsa da önemli bir doğal E vitamini kaynağı olan zeytinde bu genlerin yapısı ve kontrolü ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Bu amaçla tez çalışmasında zeytin tokoferol biyosentezinden görev alan genlerin yapılarının ve çalışma şekillerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Çalışmada;

1) Tokoferol biyosentezinde rol aldığı öncesinde bildirilmiş *PDS1*, *HPT1*, *VTE3*, *TCYC*, *GTMT* genlerinin RACE yöntemi ile tam uzunluktaki mRNA dizilerinin zeytinden

elde edilmesi,

2) Bu genlerin yapılarının analizlerinin gerçekleştirilmesi,

3) Bu genlerin zeytin meyvelerindeki anlatımlarının zeytin meyve gelişimleri sürecinde belirlenmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zeytin ekonomik öneme sahip bir bitki olmasına karşın, moleküler biyolojisi üzerine henüz az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda zeytin gelişiminde rol alan genlerin ortaya çıkarılması amacı ile cDNA kütüphanelerinin dizilenmesi yolu ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan Ozdemir Ozgenturk ve ark. (2010) çalışmalarında zeytin yaprak ve olgunlaşmamış meyvelerden cDNA kütüphaneleri oluşturarak zeytin EST dizileri elde etmişlerdir. Çalışmada zeytin yaprak ve olgunlaşmamış meyvelerden total RNA izole edilmiş, ardından mRNA'lar izole edilip cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. Klonlanan cDNA'lar içerisinde rastgele seçilen 3840 klon PZR ile çoğaltılıp, dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda 3734 EST dizisi elde edilmiş, bu dizilerin muhtemel fonksiyonları belirlenmiş ve NCBI EST (National Center for Biotechnology Information, expressed sequence tag) bilgi bankasına yüklenmiştir. Ayrıca Alagna ve ark. (2009) iki farklı zeytin çeşiti (Carotina ve Tendellone) ile transkriptom çalışması yapmışlardır. Bunlardan Carotina, İtalya'da yaygın olarak yetiştirilen ve karakteristik olarak fenolik içeriği yüksek bir çeşittir. Tendellone ise oleuropein birikimi düşük olan doğal bir mutanttır. Araştırmacılar bu çalışmaları ile zeytin meyve gelişimi sırasında anlatıma uğrayan genlere ait transkriptleri ortaya çıkarmışlardır. Zeytin meyvelerinden iki çeşitte 4 kütüphane oluşturulmuş ve 261.485 cDNA klonunun dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda 75.570 benzersiz cDNA dizisi elde edilmiştir. Elde edilen diziler için bir zeytin EST veritabanı oluşturulmuş ve veriler buraya yüklenmiştir (<http://140.164.45.140/oleaestdb/index.php>). Galla ve ark. (2009) Leccino cinsine ait zeytin meyvelerinde olgunlaşma öncesi ve sonrası 3 dönemde transkriptom çalışmasını ve ilgili genlerin muhtemel fonksiyonlarını rapor etmişlerdir. Blast2GO programını kullanarak elde edilen dizilerin olası işlevleri tartışılmıştır. Muñoz-Mérida ve ark. (2013) çalışmalarında 4 farklı zeytin çeşitine ait (Picual, Arbequina ve Lechin de Sevilla) meyve, gövde, yaprak, tohum ve tomurcuklarda transkriptom çalışması gerçekleştirmiş ve Roche 454 dizileme teknolojisi ile yaklaşık 2 milyon okuma elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen dizilerin muhtemel fonksiyonları belirlenmiştir. Dunder ve ark. (2013) ise tomurcuklarda yaptıkları çalışma ile var ve yok yıllarında anlatımları farklılık gösteren cDNA'ları incelenmiştir. Ayrıca yeni nesil dizileme teknikleri ile zeytin türüne ait

mikroRNA'ların belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapılmıştır (Donaire ve ark., 2011; Yanik ve ark., 2013b).

Tokoferol biyosentezini kontrol eden mekanizmaların bitkiler arasında korunmuş olduğu farklı türlerde ilgili genlerin araştırılması ile ortaya çıkarılmıştır (Tsegaye ve ark., 2002; Cheng ve ark., 2003; Koch ve ark., 2003). Bu sebeple çalışmamızda *A. thaliana* gibi model organizmalar ve diğer türlerdeki genlere ait veriler kullanılmıştır. Bu genlerden biri olan 4-hydroxyphenylpyruvik asit dioxygenase enzimi p-HPPA'yı okside ederek phytyl diphosphate homojentisatı oluşturur. Bu gen *A. thaliana* bitkisinde *pds1* mutant hattının incelenmesi ile ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar ilgili mutasyonun p-hidroksifenil pirüvat dioksigenaz (HPPDase) aktivitesine engel olduğunu rapor etmişlerdir. *Pds1* mutant bireylerine HPPDase geninin ürünü olan homojentisic asit uygulandığında ise bitkiler normal gelişimlerini gösterebilmiştir. Ayrıca yabancı tip *A. thaliana* bireylerine ait HPPDase geni *pds1* mutantlarına aktarıldığında ise ilgili fonksiyonun geri döndüğü görülmüştür. Bu yolla *AT1G06570* geninin tokoferol sentezindeki rolü aydınlatılmıştır (Norris ve ark., 1998).

A. thaliana türünde Homojentisat phytyltransferase enziminin aminoasit dizilimleri biyoinformatik olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada ortaya çıkarılan *VTE-2 (HPT1)* geninin tohumlarda aşırı anlatımı sağlandığında tokoferol miktarlarında artış gözlenmiştir (Venkatesh ve ark., 2006). Ayrıca yapılan çalışmalar Homojentisat Phytyltransferase aktivitesinin *A. thaliana* türünde tokoferol sentezi için limitleyici faktör olduğunu ortaya çıkarmıştır (Collakova ve DellaPenna, 2003).

VTE3 geni *A. thaliana* türünde tokoferol üretemeyen mutant hatlar içerisinde araştırılmış ve genetik haritalama yolu ile keşfedilmiştir. İlgili lokusa ait bölge dizilenmiş ve ayrıca bu bölge için mutant olan t-DNA hatlarında incelenerek lokusun 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Cheng ve ark., 2003).

Tokoferol üretemeyen *A. thaliana* hatları ile yapılan çalışmalarda siklaz aktivitesi göstermeyen *vte1* hattında *AT4G32770* geninde bir mutasyon taşıdığı anlaşılmıştır. İlgili genin ürünü *E.coli* bakterisine anlatım vektörleri aracılığı ile aktarıldığında bu hatlarda tokoferol siklaz aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Porfirova ve ark., 2002a; Cheng ve ark., 2003).

Gamma-tocopherol methyltransferase aktivitesi sonucu γ -tokoferol α -tokoferole dönüşmektedir. Bir grup mutant *A. thaliana* hattı incelenirken yüksek γ -tokoferol birikimine sahip ve α -tokoferol üretemeyen bitkiler bulunmuştur. Araştırmacılar bu yolla 2 hat ortaya çıkarmış ve bu hatları *vte4-1* ve *vte4-2* olarak adlandırmışlardır. *VTE4* geninin yabanıl formu mutant hatlarda aşırı anlatıma uğratıldığında ilgili aktivitenin geri döndüğü bildirilmiştir (Bergmüller ve ark., 2003).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Bitki Materyali

Çalışmada Ege bölgesine ait bir çeşit olan Ayvalık çeşiti kullanılmıştır. Ayvalık çeşiti yağlık ve sofralık olarak yaygın olarak yetiştirilmektedir. Kökeni Edremit olarak bilinmektedir. Yuvarlağa yakın oval meyveleri vardır. 100 meyve ağırlığı 498.44 olarak belirlenmiş ve nem oranı % 51.63; et oranı % 85.38 dır (Seker ve ark., 2007; Gündoğdu, 2011).

3. 2. Örneklerin Alınması

Çalışmada kullanılan Zeytin ağaçları Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğüne ait Gömeç yetiştirme merkezinden temin edilmiş ve örnekler yağlık Ayvalık çeşitinden alınmıştır. Bitki dokusu olarak meyveler toplanmıştır. Örnekler sağlıklı bir zeytin ağacından 15 gün aralıklar ile 5 dönemde araziden steril falkon tüplerine alınmış ve anında sıvı azot ile dondurulmuştur (Çizelge 3.1). Laboratuvara taşınan örnekler kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmada sadece mezokarp dokuları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Zeytin örneklerinin alındığı tarihler

Dönem	Örnek alınan tarih
1	07 Ekim 2013
2	21 Ekim 2013
3	4 Kasım 2013
4	18 Kasım 2013
5	02 Aralık 2013

3. 3. Olgunluk indeksinin hesaplanması

Meyve olgunluklarının hesaplanması amacıyla rastgele alınan 100 adet meyve Morelló ve ark. (2004)'larının rapor ettikleri olgunluk skalasına göre 1 ve 7 aralığında derecelendirilmiştir. Sonrasında olgunluk derecelerinin aritmetik ortalaması alınarak döneme ait meyvelerin olgunluk indeksleri hesaplanmıştır.

3. 4. RNA İzolasyonu

Zeytin meyvelerinden total RNA izolasyonu için öncelikle -80 °C'de saklanmış meyveler ısınmalarına izin verilmeden sıvı azot içerisinde havan ve havaneli vasıtası ile parçalanmıştır. Kullanılacak havan ve dokuyla temas eden diğer cam, metal ve porselen eşyalar %1'lik DEPC (Applichem - A0881,0100) çözeltisinde 1 gece boyunca inkübe edilmiş ve ardından 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Kullanılan mikrosantrifüj tüpleri ve mikropipet uçları gibi plastik malzemeler Rnaz içermeyen, steril paketlerde temin edilmiştir. Çalışmada, RNA izolasyonları Trizol (Ambion -15596-026) solüsyonu ve bitki dokularına özel RNA izolasyon kiti (PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen – 12183025) ile gerçekleştirilmiştir.

➤ Zeytin meyveleri önceden soğutulmuş soğuk havanlara alındıktan sonra mezokarp dokuları havaneli ile ezilmiştir. Sonrasında tohumu içeren endokarp çalışmadan uzaklaştırılmıştır.

➤ 100 mg ezilmiş mezokarp dokusu sıvı azotta soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

➤ Mikrosantrifüj tüplerindeki dokuların üzerine 1 ml Trizol (Ambion - 15596-026) solüsyonu eklenmiş, alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

➤ İnkübasyon sonrasında örneklere 200 µl kloroform (Sigma Aldrich – 1731042) eklenmiş ve 15 saniye elde karıştırılmış ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

➤ Sonrasında örnekler 12.000 g kuvvetinde 15 dakika santrifüj edilmiştir.

➤ Santrifüj sonrası üst sıvı faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve aktarılan üst faza eşit hacimde (400 µl) %70 etanol eklenip vorteks ile karıştırılmıştır.

➤ 700 µl örnek filtre kolonuna aktarılmış ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.

➤ Santrifüj sonrasında alt kısımda kalan sıvı atıldıktan sonra örneklere 700 µl yıkama tamponu I eklenmiştir.

➤ 12.000 g'de 15 saniye yapılan santrifüjün ardından filtre kolonu toplama tüpünden ayrılmış ve filtre kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

- Örnekler 500 µl yıkama tamponu II eklenmiş, 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Yıkama solüsyonu II ile yapılan yıkama toplam 2 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır.
- Örnekler 3 dakika maksimum hızda (14.000 rpm) santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılmış ve filtre kolonları mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
- Filtre kolonuna 50 µl Rnaz içermeyen steril saf su eklendikten sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Örnekler 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3. 5. RNA miktarlarının ölçülmesi

RNA miktarlarının ölçülmesi amacı ile Qubit florometre cihazı (Invitrogen, Q32866) kullanılmıştır. Ölçümler cihazın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 199 µl reaksiyon tamponu 1 µl RNA Reagent (Invitrogen - Q10211) ile karıştırılmıştır. Sonrasında 1 µl karışım uzaklaştırılarak yerine 1 µl RNA örneği eklenmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler cihazda okutulmuş ve ng/ µl cinsinden konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3. 6. Çalışmada kullanılan primerlerin seçilmesi

RACE ve gen anlatımı çalışmalarında kullanılacak primerler primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) ve NCBI primer design tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak seçilmiştir. Gerçek zamanlı (Real Time) PZR çalışmalarında kullanılacak primerlerde PZR ürünü boyutu 70 – 150 bp aralığında, erime sıcaklığı 65 °C seçilmiş ve primer3 kantitatif PZR ön ayarları kullanılmıştır.

Çalışmada genlere ait primerler mevcut mRNA veritabanları kullanılarak seçilmiştir. Bu amaçla ilk olarak NCBI zeytin Short read archive (SRA) veritabanlarındaki mevcut transkriptom okumaları bilgisayar ortamına fastq formatında kaydedilmiş ve Geneious (www.geneious.com) R8 (Kearse ve ark., 2012) yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Transkriptom okumaları içerisinde %0.05'den yüksek hata içerme ihtimali olan okumalar Geneious yazılımına ait filtre aracı ile çalışmadan çıkarılmıştır. Daha sonra ilgili gene ait

diğer bitki türlerinde önceden ortaya çıkarılmış referans diziler NCBI veritabanında Blastn ile araştırılmıştır. Çalışmada daha sonra Geneious R8 yazılımında bulunan “map to references” komutu kullanılarak zeytin transkriptom okumaları referans dizilere karşı haritalanmıştır. Referans olarak zeytin dizilerine en yakın benzerlik sonuçlarını veren *Solanaceae* familyasına ait diziler kullanılmıştır. Bu diziler ilgili genlere ait *Arabidopsis* dizilerinin NCBI referans mRNA veritabanlarında *Solanaceae* ailesi kısıtlanarak blastlanması ile elde edilmiştir. Haritalama sonrasında birleştirilen diziler primerlerin seçilmesinde kalıp olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlere ait nükleotid dizileri çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5’-3’)	Bağlanma sıcaklığı	Kullanım amacı
PDS1_Forward_primer	TTCCGCTACCACGGGGTTTA	60.5	3’ RACE
PDS1_Reverse_primer	GGGCAGTGAAGAGGAATTGGA	61.2	5’ RACE
PDS1_Nested_Forward primer	AACTGGTGGGGTACAACAACCTT	60.1	3’ RACE
PDS1_Nested_Reverse primer	AAGATAGGAGGCGTGGACGG	61.0	5’ RACE
HPT1_Forward_primer	TGCATTGAGTCCAAGATGCAG	59.5	3’ RACE
HPT1_Reverse_primer	CTCCCGATGCCAATGGAAGA	60.5	5’ RACE
VTE3_Forward_primer	CCCATGTCTACGAACCCAC	62.5	5’ RACE
VTE3_Reverse_primer	AGGCTAAGAAGAAGGAGCCC	60.5	3’ RACE
VTE3_Nested_Forward primer	TTTTGGACCAATCCTCTTCAGTTG	62	5’ RACE
VTE3_Nested_Reverse primer	ATGCTGAGGACCTCCCTTCA	61.2	3’ RACE

Çizelge 3.2'nin devamı

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı	Kullanım amacı
TCyclase_Forward_primer	AGCATCAGTTCATTCTACTCCC	62.9	5' RACE
TCyclase_Reverse_primer	CCCTAATGTTTCAGAAGCCGGT	61.2	3' RACE
TCyclase_Nested_Forward primer	TCTGAGATTCTTCAGTGTATTGGCA	62.5	5' RACE
TCyclase_Nested_Reverse primer	GATGTTACGGAGGCTCCCAG	62.5	3' RACE
GTMT_Forward_primer	CAGGACAAATAGTTGATGTGGGT	60.9	3' RACE
GTMT_Reverse_primer	CACTCTCCATGGACCAAACCA	61.2	5' RACE
GTMT_Nested_Forward primer	AGGTAGTTCAAGTACTTGCGC	62.1	3' RACE
GTMT_Nested_Reverse primer	TGCCCATCCTGAAATGGTTGATT	60.9	5' RACE
S-PDS1_Forward	CGATGCCACCAACACCTC	65.9	Anlatım çalışmaları
S-PDS1_Reverse	GGAGATTTACAGAGCGGAGAAGA	65.0	Anlatım çalışmaları
S-HPT1_Forward	ACACAATCTTGAATCCGAACCTTC	65.4	Anlatım çalışmaları
S-HPT1_Reverse	TGCTCAATGCTGTTCTTACTG	65.0	Anlatım çalışmaları
S-VTE3_Forward	TGGACCAATCCTCTCAGTTGA	65.4	Anlatım çalışmaları
S-VTE3_Reverse	GCTGATGTGTGGATGCTCTTC	65.6	Anlatım çalışmaları
S-Tcyc_Forward	GCCTCCTCTAGTCTGTTCAATCT	64.4	Anlatım çalışmaları
S-Gtmt_Forward	GGTTGTGGTATAGGAGGTAGTTCA	65.3	Anlatım çalışmaları
S-Gtmt_Reverse	TTGAGCAGCAGCAAGAGC	65.1	Anlatım çalışmaları

Çizelge 3.2'nin devamı

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı	Kullanım amacı
GAPDH2 Forward	CCTTCCGTGTGCCTACTGTT	64.4	Anlatım çalışmaları
GAPDH2 Reverse	GATGGCTGCCTTGATTTTCAT	64.3	Anlatım çalışmaları
OligoDT Anchor Primer	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTT TTTTTTTTTTT	-	3' RACE
Adaptor Primer	GACTCGAGTCGACATCG	58.4	3' RACE

3. 7. DNaz Uygulaması

Çalışmada cDNA sentezi öncesinde total RNA örneklerine 37⁰ C'de 30 dakika süre ile DNaz uygulanarak DNA kontaminasyonu engellenmiştir (Çizelge 3.3). Reaksiyonlar toplam 10 µl hacimde kurulmuş ve 5 µg total RNA kullanılmıştır. Bu süre sonrasında DNaz enzimi 65 ⁰C'de 10 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir. Çalışmada daha sonra örnekler bekletilmeden cDNA sentezine devam edilmiştir.

Çizelge 3.3. Dnaz Reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
10 x Reaksiyon tamponu	1 µl	1 x
RNA	5000 ng	500 ng / µl
DNase I (1 u/µl)	1 µl	0.1 u / µl
Distile su	Son hacime tamamlayacak kadar	-
Son hacim	10 µl	-

3. 8. 3' RACE Çalışmaları için cDNA Sentezi

Çalışmada mRNA'ların 3' uçlarının elde edilmesi amacı ile RACE yöntemi Scotto-Lavino ve ark. (2007a)'larının önerdikleri protokol uyarlanarak uygulanmıştır. Bu amaçla ilk olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için toplamda 5 µg total RNA kullanılmıştır. Sentez öncesinde ilk olarak total RNA sekonder yapıların açılması için, 11.25

μ l steril distile su ile içerisinde 80°C 'de 3 dakika inkübe edilmiş ve bekletilmeden buz üzerinde 5 dakika soğutulurak santrifüj ile 5 saniye çöktürülmüştür. Ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA buz üzerine alınarak üzerine cDNA sentezinde kullanılan bileşenler eklenmiştir (Çizelge 3.4). Reaksiyona ters transkriptaz enzimi en son bileşen olarak eklenmiştir. Çalışmada mRNA moleküllerini 3' uçlarından çoğaltacak oligo-dT adaptör primerleri kullanılmıştır. cDNA sentezi için thermal cycler cihazı (Biorad PTC200) kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Reaksiyon sonrasında RNA kalıbını yok etmek amacı ile 20 dakika 37°C 'de $1\ \mu\text{l}$ RNaz enzimi uygulanmıştır. Son olarak elde edilen cDNA kalıpları TE tamponu ile $1\ \text{ml}$ 'ye tamamlanmış ve kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
5X reaksiyon tamponu	$4\ \mu\text{l}$	1X
10 mM dNTP	$1\ \mu\text{l}$	1.3 mM
$10\ \mu\text{M}$ Oligo-dT adaptör primeri	$0.5\ \mu\text{l}$	50 ng
40 unit/ μl RNaz inhibitörü	$0.25\ \mu\text{l}$	10 ünite
DTT (0.1 M)	$2\ \mu\text{l}$	12.9 mM
Toplam	$7.5\ \mu\text{l}$	

Çizelge 3.5. 3' RACE çalışmasında uygulanan cDNA sentezi programı

Basamak	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (Dakika)
1.	25	5
2.	42	60
3.	50	10
4.	70	15

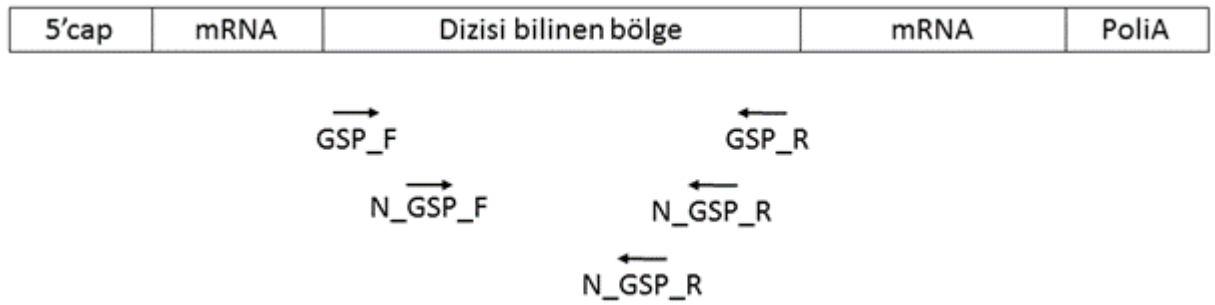
3. 9. 3' RACE Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında $25\ \text{ng}$ cDNA moleküllerinin kalıp olarak kullanıldığı birbirini takip eden 2 farklı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gerçekleştirilmiştir. I. PZR reaksiyonunda gen spesifik primerler (GSP) kullanılırken, 2. PZR reaksiyonlarında nested gen spesifik (N_GSP) kullanılmıştır. Bu primerlerden GSP ilgili genin 3' bölgesine bağlanacak şekilde seçilmiştir (Şekil 3.1). N_GSP ise ilk PZR sonrasında elde edilen ürünlerin kalıp olarak kullanıldığı II. PZR

reaksiyonlarında kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 3.6). GSP primerleri ile yapılan I. PZR reaksiyonlarında ilk döngüde 30 dakikalık bir uzama basamağı uygulanmış (Çizelge 3.7) ve bu reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. I. PZR sonunda yeterli ürün elde edilmediği takdirde, N_GSP primerleri ile II. PZR kurulmuştur. Çalışma sonunda PZR ürünleri jelden PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrohen, K2100-12) kullanılarak geri kazanılmış ve dizi analizleri hizmet alımı yolu ile özel bir firmalardan (Medsantek, Macrogen) gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonlarında hata yapma oranı az olan “New England Biolabs Q5 High fidelity” (NEB, M0491L) enzim kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X High Fidelity PZR Tamponu	2.5	1X
25mM MgCl ₂ solüsyonu	2.5	2 mM
2mM dNTP mix	2.5	0.2 mM
10pmol/µl reverse primer	1	0.4 pmol
10pmol/µl forward primer	1	0.4 pmol
Kalıp cDNA	2.5	
Nuclease-freewater	2.75	
High Fidelity PZR Enzyme Mix	0.25	2.5 unit
Toplam hacim	25 µl	



Şekil 3.1. Race çalışmalarında kullanılan primerlerin genel yerleşimleri. GSP: gen spesifik primer, N_GSP: Nested gen spesifik primer

Çizelge 3.7. 3' RACE çalışmaları I. PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 dakika	1
72 °C	2 dakika	
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 saniye	39
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1
4 °C	30 dakika	1

Çizelge 3.8. Nested PZR için kullanılan PZR programı

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 saniye	39
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1
4 °C	30 dakika	1

3. 10. 5' RACE Çalışmaları için cDNA Sentezi

mRNA'ların 5' uçlarının elde edilmesi amacı ile RACE yöntemi Scotto-Lavino ve ark. (2007b)'larının önerdikleri protokol uyarlanarak uygulanmıştır. Bu amaçla ilk olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için toplamda 5 µg total RNA kullanılmıştır. Sentez öncesinde ilk olarak total RNA sekonder yapıların açılması için, 11.25 µl steril distile su ile içerisinde 80 °C'de 3 dakika inkübe edilmiş ve bekletilmeden buz üzerinde 5 saniye soğutularak santrifüj ile 5 saniye çöktürülmüştür. Ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA buz üzerine alınarak üzerine cDNA sentezinde kullanılan bileşenler eklenmiştir (Çizelge 3.9). Reaksiyona ters transkriptaz enzimi en son bileşen olarak eklenmiştir. Çalışmada yalnızca ilgili geni çoğaltacak gen spesifik primerler kullanılmıştır. cDNA sentezi için thermal cycler cihazı (Biorad PTC200) kullanılmıştır (Çizelge 3.10). Reaksiyon sonrasında RNA kalıbını yok etmek amacı ile 20 dakika 37 °C'de 1 µl RNaz enzimi uygulanmıştır. Son olarak elde edilen cDNA kalıpları kullanılıncaya kadar +4 °C'de

saklanmıştır.

Çizelge 3.9. 5' RACE cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
5X reaksiyon tamponu	4 µl	1X
10 mM dNTP	1 µl	1.43 mM
DTT (0.1 M)	2 µl	2.88 mM
Toplam	7 µl	

Çizelge 3.10. 3' RACE çalışmasında uygulanan cDNA sentezi programı

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

3. 11. 5' RACE Çalışmaları

1. Reaksiyondan primerlerin uzaklaştırılması amacı ile PZR purifikasyon kiti (Invitrogen, K3100-01) kullanılarak saflaştırılmıştır. PZR saflaştırma yönteminin ayrıntıları 3.13. numaralı başlıkta verilmiştir. Saflaştırma sonrası son hacim 15 µl'ye ayarlanmıştır.

2. Saflaştırılmış cDNA reaksiyonuna 4 µl tailing buffer, 1.2 µl CoCL₂, 4 µl dATP ve 10 ünite terminal transferaz enzimi eklenmiştir.

3. Reaksiyon 37 °C'de 5 dakika ve sonrasında 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

4. Reaksiyon TE tamponu ile 500 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.11. Optimum PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X High Fidelity PZR Buffer	2.5	1X
25mM MgCl ₂ solüsyonu	2.5	2 mM
2mM dNTP mix	2.5	0.2 mM
10pmol/µl reverse primer	1	0.4 pmol
10pmol/µl forward primer	1	0.4 pmol
Kalıp cDNA	2.5	
Nuclease-freewater	2.75	
High Fidelity PZR Enzyme Mix	0.25	2.5 unit
Toplam hacim	25 µl	

5. Sonrasında çizelge 3.11’de verilen bileşenlere göre PZR reaksiyonu kurulmuştur. N_GSP_R primerleri ile yapılan PZR reaksiyonlarında ilk döngüde 30 dakikalık bir uzama basamağı uygulanmıştır. Bu reaksiyona ait PZR koşulları çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. RACE çalışmalarında uygulanan ilk PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 saniye	1
72 °C	2 dakika	
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 saniye	39
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1
4 °C	30 dakika	1

6. İlk PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Elde edilen PZR ürünleri dizi analizi için yeterli konsantrasyonda değilse N_GSP2_R primerleri ile nested PZR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri çizelge 3.11’de verilmiştir. Kullanılan PZR programı ise çizelge 3.13’de verilmiştir.

Çizelge 3.13. Nested PZR için kullanılan PZR programı

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	30 saniye	
55 °C	30 saniye	39
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1
4 °C	30 dakika	1

7. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi sonrası jelden saflaştırılmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan agaroz jel elektroforezi ve jelden PZR ürünlerinin saflaştırılması yöntemlerinin ayrıntıları 3.12. ve 3.13. numaralı başlıklarda verilmiştir.

3. 12. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri %1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir. 0.5 g agaroz tartılmış ve 50ml 1XTAE tampon içinde 120 °C'de çözdürülmüştür. 60 °C'ye kadar soğutulan jele 5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Jel tankına dökülen jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış ve jel 1XTAE tampon bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PZR ürünleri ve ladder (Fermentas DNA ladder SM0311, SM0633) 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 6.5V/cm'de 80 dakika gerçekleştirilmiştir. Jel ultra violet transilluminator (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

3.12.1 Elektroforezde kullanılan tamponların hazırlanması

3.12.1.1. 10X TAE Tamponu

48.44 g Tris base, 3.72 g EDTA 900ml dH₂O içinde çözdürülmüş ve tamponun pH'ı asetik asit (11.4 ml) ile 8.0'e ayarlanmıştır. Tamponun son hacmi dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmış otoklavda 121 °C, 15 dakikada steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.12.1.2. Ethidium bromide stok çözeltisi

100 mg ethidium bromide 10 ml steril dH₂O içinde karıştırılarak çözdürülmüştür. Çözelti ışık almayan bir şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.12.1.3. 1X TAE tamponu

100 ml 10XTAE tamponu 900 ml steril dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

3. 13. Jelden PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elektroforez sonrası UV altında görüntülenen PZR ürünlerine ait bantlar steril bir bisturi ile kesilerek jelden alınmıştır. Sonrasında ilgili PZR ürünleri DNaz-RNaz free mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Ardından Purelink PZR Purification kit (İnvitrogen – K3100-01) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre ilgilenilen büyüklükteki DNA bantları jelden izole edilmiştir:

- Saflaştırılacak DNA bantları kesildikten sonra jel parçası hassas terazide tartılmıştır.
- Jel parçasına hacminin üç katı kadar jel çözdürme tamponu ilave edilmiştir.
- Örnek sonrasında 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda en az 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Jel parçası çözüldükten sonra ek 5 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- Örnek jel Ekstraksiyon kolon'a yüklendikten sonra 12000 rpm.' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Alt sıvı atıldıktan sonra 700 µl yıkama tamponu eklenerek, 1200 rpm.' de 1 dakika santrifüj edilip alt sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Sonrasında örnekler 3 dakika en yüksek hızda (14.000 rpm) santrifüj edilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon kolonu steril bir mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirilmiştir.
- Kolon merkezine 50 µL TE tamponu eklenerek, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Ardından dizi analizinin gerçekleştirilene kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3. 14. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Non spesifik PZR ürünleri içermeyen örneklerde veya RACE çalışmalarında cDNA'nın saflaştırılmasında, reaksiyon artıklarından ürünü arındırmak üzere Purelink PZR Purification kit (İnvitrogen – K3100-01) kullanılmıştır.

- Bağlama tamponu saflaştırılacak ürüne 1:4 (örnek:bağlama tamponu) oranında eklenerek karıştırılmış ve örnek kolona yüklenmiştir.

- Örnek 10.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve sonrasında alt sıvı uzaklaştırılmıştır.

- Kolona 650 µL yıkama tamponu eklenmiş, 10.000 rpm'de bir dakika boyunca santrifüj edilmiş ve alt sıvı uzaklaştırılmıştır.

- Sonrasında örnek 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir.

- Kolon daha sonra mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve merkezine 50 µl TE tamponu eklenip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dakika maksimum hızda (14.000 rpm) santrifüj edilmiştir.

- Sonrasında saflaştırılan PZR örneği 4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Saflaştırılan PZR ürünlerinin kalitesi agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve dizi analizi gerçekleştirilene kadar 4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

3. 15. Dizi Analizi

Saflaştırılan PZR ürünlerinin dizi analizi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Her gene ait 3' ve 5' RACE ürünleri n_GSP primerler ile çift yönlü okutulmuştur. Medsantek ve Makrogen firmalarınca gerçekleştirilen dizi analizi ABI 3100 Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Geneious yazılımında incelenmiştir. Elde edilen dizilere ait kromatogramlar incelenmiş ve yazılıma ait filtre aracı ile %0.05'den yüksek hata payı olan bölgeler filtre edilmiştir. Genlere ait okumalar sonrasında Geneious yazılımına ait de novo assembly aracı ile varsayılan parametreler seçilerek birleştirilmiştir.

3. 16. Biyoinformatik Analizler

Dizi analizi sonucunda elde edilen dizilerin tokoferol genlerine benzerliklerinin belirlenmesi amacı ile diziler NCBI Blastn aracı (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) varsayılan parametreleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Ayrıca blastx aracı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ile ilgili transkriptlerin protein dizileri NCBI protein veritabanlarında araştırılmış ve tokoferol genlerine benzerlikleri açısından e value, dizilerin kapsama ve benzerlik oranları incelenmiştir.

Protein dizilerinde mevcut olan korunmuş fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi amacı ile NCBI korunmuş bölge veritabanına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) ait “CD search” aracı varsayılan parametrelerinde kullanılmıştır.

Tokoferol biyosentezinden sorumlu model türlere ait protein dizileri ile bu çalışma ile elde edilen protein dizileri Geneious R8 yazılımı hizalama aracı ile hizalanmıştır.

Elde edilen protein dizileri veritabanlarında bulunan diğer tokoferol biyosentezinden sorumlu proteinler ile karşılaştırılarak filogenetik ağaçların çizilmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla Blastp analizi ile zeytin tokoferol biyosentez genlerinin en az %70’ini kapsayan ve en az %70 benzerlik gösteren proteinlere ait diziler fasta formatında elde edilmiştir. Bu diziler Mega 6 (Tamura ve ark., 2013) yazılımında hizalandıktan sonra “Neighbour Joining” tekniği ile 1000 bootstrap değeri kullanılarak filogenetik ağaçların çizilmesinde kullanılmıştır (Felsenstein, 1985; Saitou ve Nei, 1987).

3. 17. Gerçek Zamanlı PZR Deneyleri

Zeytin meyvelerinin olgunlaşması sırasında tokoferol biyosentez genlerinin anlatımlarındaki değişimlerin incelenmesi amacı ile 5 farklı dönemde ayvalık çeşitine ait örnekler alınmıştır. Çalışmada meyve mezokarp dokularından total RNA izole edilmiş ve DNaz uygulanmıştır. Daha sonra ise cDNA sentezi “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems – 4368814) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada cDNA sentezi öncesinde total RNA örneklerine 37⁰ C’de 30 dakika süre ile DNaz uygulanarak DNA kontaminasyonu engellenmiştir. Reaksiyonlar toplam 10 µl hacimde kurulmuş ve 1 µg total RNA kullanılmıştır (Çizelge 3.14.). Bu süre sonrasında DNaz enzimi 65 ⁰C’de 10 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir. Çalışmada daha sonra örnekler bekletilmeden cDNA sentezine devam edilmiştir.

Çizelge 3.14. DNaz Reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
10 x Reaksiyon tamponu	1 µl	1 x
RNA	1000 ng	100 ng / µl
DNase I (1 u/µl)	1 µl	0.1 u / µl
Distile su	Son hacime tamamlayacak kadar	-
Son hacim	10 µl	-

RNA örneklerinin DNaz ile muamelesinden sonra çizelge 3.15.'te verilen reaksiyon komponentleri ayrı bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırılmıştır.

Çizelge 3.15. Kantitatif PZR çalışmalarında kullanılan cDNA sentezi karışımı

Reaksiyon bileşeni	Miktar
Reaksiyon tamponu	2 µl
Reverse transcriptase	1 u
Rnaz inhibitörü	1 µl
Nükleaz içermeyen distile su	2.2 µl
Toplam hacim	6.2 µl

Sonrasında DNaz uygulanan RNA örneği ve cDNA reaksiyon karışımı birleştirilerek çizelge 3.16.'da verilen programa göre inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.16. Kantitatif PZR çalışmasında kullanılan cDNA sentezi programı

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

İnkübasyon sonrası örnekler +4 °C’de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Kantitatif PZR deneylerinin gerçekleştirilmesi amacıyla 1 µl cDNA, 5 µl ‘Sybr Green master mix’ ve 4 µl nükleaz içermeyen su 48 kuyucuklu platelerde karıştırılmıştır. Her plate 1 endojen kontrol ve 2 hedef gen içermektedir. Her platede analiz edilen bu genlere ait 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar bulunmaktadır. Platelerde ayrıca negatif ters transkriptaz kontrolü ve negatif kontrol reaksiyonları eklenmiştir. Örnek plate düzeni Şekil 3.2’de verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	7 Ekim U Gapdh2	21 Ekim U Gapdh2	4 Kasım U Gapdh2	18 Kasım U Gapdh2	02 Aralık U Gapdh2	7 Ekim U HPT1	7 Ekim U HPT1	7 Ekim U HPT1
B	7 Ekim U Gapdh2	21 Ekim U Gapdh2	4 Kasım U Gapdh2	18 Kasım U Gapdh2	02 Aralık U Gapdh2	21 Ekim U HPT1	21 Ekim U HPT1	21 Ekim U HPT1
C	7 Ekim U Gapdh2	21 Ekim U Gapdh2	4 Kasım U Gapdh2	18 Kasım U Gapdh2	02 Aralık U Gapdh2	4 Kasım U HPT1	4 Kasım U HPT1	4 Kasım U HPT1
D	7 Ekim U PDS1	21 Ekim U PDS1	4 Kasım U PDS1	18 Kasım U PDS1	02 Aralık U PDS1	18 Kasım U HPT1	18 Kasım U HPT1	18 Kasım U HPT1
E	7 Ekim U PDS1	21 Ekim U PDS1	4 Kasım U PDS1	18 Kasım U PDS1	02 Aralık U PDS1	02 Aralık U HPT1	02 Aralık U HPT1	02 Aralık U HPT1
F	7 Ekim U PDS1	21 Ekim U PDS1	4 Kasım U PDS1	18 Kasım U PDS1	02 Aralık U PDS1	N Gapdh2	N Gapdh2	N Gapdh2

Şekil 3.2. Kantitatif PZR çalışmasında kullanılan örnek plate düzeni

Kantitatif PZR sonuçlarının normalizasyonunda zeytin meyve gelişimi ve olgunlaşması süreçlerinde test edilmiş *GAPDH* genine ait primerler literatürde uygun genler olarak belirlenmiştir (Nonis vd., 2012). *GAPDH* genine özgü primerlerden 92 bç uzunluğunda bir ürün oluşturmaktadır.

Gen anlatımı çalışmalarında deneyler 3 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen deneyler için seçilen her primer çifti için standart eğri deneyleri ile verimlilik belirlenmiş ve sadece % 90-110 aralığındaki verimlilik değerleri olan primerler ve reaksiyon koşulları kullanılmıştır.

Çalışmada uygulanan her PZR sonrasında bir melt curve basamağı uygulanmış ve non spesifik ürünlerin veya primer dimerlerinin varlığı incelenmiştir (Ek 6-11).

Verimliliklerin hesaplanmasında 6 farklı cDNA dilüsyon noktasında reaksiyonlar kurulmuş (Şekil 3.3) ve her bir dilüsyon için elde edilen Ct değerleri ile tahmini kopya sayıları kullanılarak 2 boyutlu bir grafik çizilmiştir. Ct değerlerinin bulunduğu noktalar ile kalıp DNA'nın temsili kopya sayılarının logaritması ile 2 boyutlu bir doğru excellde çizilmiştir. Excell programında bu noktaları en iyi temsil eden doğrunun eğimi excell eğim

fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Çizilen eğrinin eğimi ile $(-1+10^{(-1/eğim)}) \times 100$ formülüne göre verimlilik yüzdeleri belirlenmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Dilüsyon 1 U Gapd...	Dilüsyon 1 U Gapd...	Dilüsyon 1 U PDS1	Dilüsyon 1 U PDS1	Dilüsyon 1 U HPT1	Dilüsyon 1 U HPT1	Dilüsyon 1 U VTE3	Dilüsyon 1 U VTE3
B	Dilüsyon 2 U Gapd...	Dilüsyon 2 U Gapd...	Dilüsyon 2 U PDS1	Dilüsyon 2 U PDS1	Dilüsyon 2 U HPT1	Dilüsyon 2 U HPT1	Dilüsyon 2 U VTE3	Dilüsyon 2 U VTE3
C	Dilüsyon 3 U Gapd...	Dilüsyon 3 U Gapd...	Dilüsyon 3 U PDS1	Dilüsyon 3 U PDS1	Dilüsyon 3 U HPT1	Dilüsyon 3 U HPT1	Dilüsyon 3 U VTE3	Dilüsyon 3 U VTE3
D	Dilüsyon 4 U Gapd...	Dilüsyon 4 U Gapd...	Dilüsyon 4 U PDS1	Dilüsyon 4 U PDS1	Dilüsyon 4 U HPT1	Dilüsyon 4 U HPT1	Dilüsyon 4 U VTE3	Dilüsyon 4 U VTE3
E	Dilüsyon 5 U Gapd...	Dilüsyon 5 U Gapd...	Dilüsyon 5 U PDS1	Dilüsyon 5 U PDS1	Dilüsyon 5 U HPT1	Dilüsyon 5 U HPT1	Dilüsyon 5 U VTE3	Dilüsyon 5 U VTE3
F	Dilüsyon 6 U Gapd...	Dilüsyon 6 U Gapd...	Dilüsyon 6 U PDS1	Dilüsyon 6 U PDS1	Dilüsyon 6 U HPT1	Dilüsyon 6 U HPT1	Dilüsyon 6 U VTE3	Dilüsyon 6 U VTE3

Şekil 3.3. Kantitatif PZR verimliliklerinin belirlenmesinde kullanılan plate düzeni

İfadelerin karşılaştırılmasında karşılaştırmalı Ct yöntemi kullanılmış ABI step ONE cihazı ile okumalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Data assist (V 3.01) (Applied biosystems) yazılımında analiz edilmiştir. Bu amaçla ABI step ONE cihazından .txt formatında dışa aktarılan veriler kullanılmıştır. Data assist yazılımına yüklenen veriler $\Delta\Delta Ct$ metodu ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında GAPDH2 geni endojen kontrol olarak belirlenmiş ve karşılaştırmalar 7 ekim örneklerine göre yapılmıştır. Sonrasında yazılım tarafından aşağıdaki veriler her örnek ve gen için hesaplanmıştır.

Ortalama Ct: Teknik tekrarların ortalaması

ΔCt : Ortalama Ct – Normalizasyon faktörü (Endojen kontrol)

$2^{\Delta Ct}$: Kat değişimlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi amacı ile $2^{\Delta Ct}$ değerlerine

tek yönlü anova testi uygulanmıştır (Field, 2007). Sonrasında Tukey testi ile anlamlı değişim gösteren gruplar belirlenmiştir (Tukey, 1951).

3. 18. HPLC Analizi

Her döneme ait rastgele 5 ağaçtan toplanmış 100 adet meyve örneği havanda ezilmiş ve 50 gram mezokarp dokusu 50 ml'lik falkon tüplerinde 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısımda kalan zeytinyağı ayrı tüplere alınmış ve analizlerin yapılacağı tarihe kadar -20 °C'de saklanmıştır. HPLC analizleri TUBİTAK MAM Gıda analizleri laboratuvarında akredite edilmiş E vitamini analizleri HPLC-FLD tekniği kullanılarak hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda mg/litre cinsinden konsantrasyonlar belirlenmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4. 1. Bitki Materyali

Çalışmada Ege bölgesine ait bir çeşit olan Ayvalık çeşiti kullanılmıştır. Ayvalık çeşiti yağlık ve sofralık olarak yaygın olarak yetiştirilmektedir. Kökeni Edremit olarak bilinmektedir. Yuvarlağa yakın oval meyveleri vardır. 100 meyve ağırlığı 498.44 olarak belirlenmiş ve nem oranı % 51.63; et oranı % 85.38 dır (Seker ve ark., 2007; Gündoğdu, 2011).

Çalışmada kullanılan zeytin ağaçları Zeytin ağaçları Edremit Zeytincilik Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğünden temin edilmiştir. Meyveler araziden rastgele seçilmiş 5 farklı ağaçlardan ilk olarak 7 Ekim 2013 tarihinde toplanmıştır. Çalışmada daha sonra 21 Ekim 2013, 4 Kasım 2013, 18 Kasım 2013 ve 2 Aralık 2013 tarihlerinde meyve toplanmıştır (Şekil 4.1). Bu sonuçlar bize toplanan meyve örneklerin hastalık taşımadıklarını, hasar görmediklerini ve gelişimlerinin beklenen fizyolojik şartlar altında olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. Gen anlatımı çalışmasında kullanılan meyve örnekleri

4. 2. RNA izolasyonu

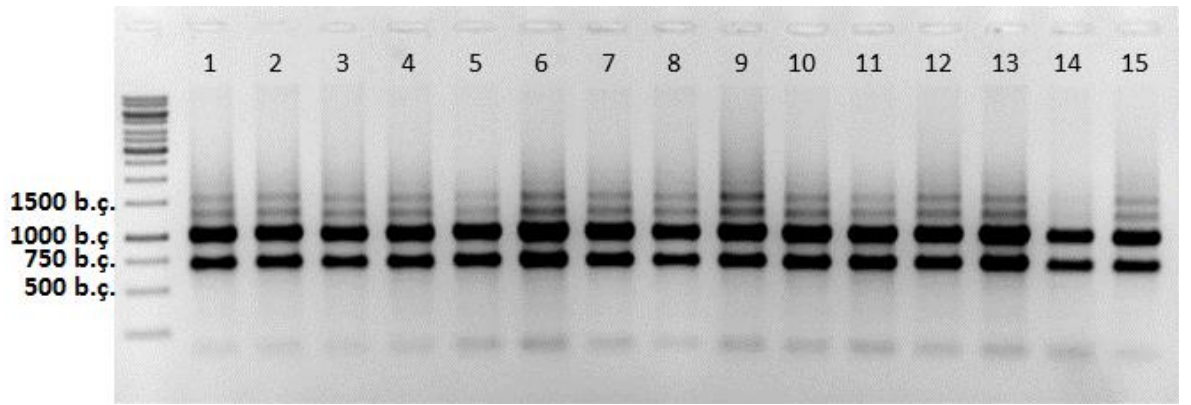
Çalışmada RACE ve kantitatif anlatım çalışmaları için mezokarp dokularından izole edilen total RNA'ların kalitesi (parçalanma ihtimali) %1.5 lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.2). Araziden toplanan meyveler RNA parçalanmasına izin vermemek için anında sıvı azot ile dondurulmuş ve her bir döneme ait 100 mg zeytin mezokarp dokusu havan ile sıvı azot kullanılarak parçalanmış ve ticari firma tarafından önerilen yönteme göre total RNA izole edilmiştir. Jel görüntülerinde izolasyonun başarısı rRNA moleküllerine ait bantların varlığı ile anlaşılmıştır. Buna göre her bir döneme ait RNA örneklerinin beklenildiği gibi 28S, 18S rRNA bantlarını içerdiği ve RNA örneklerinin sağlam olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.2). Çalışmada ayrıca total RNA miktarı florometrik olarak belirlenmiş ve miktarların ortalama 300-1200 nanogram / mikrolitre arasında değiştiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. RNA örneklerinin florometrik yöntemle ölçülen konsantrasyonları

RNA örneği	Biyolojik tekrar	Konsantrasyon (ng/µl)
7 Ekim	1.	344
7 Ekim	2.	460
7 Ekim	3.	422
21 Ekim	1.	962
21 Ekim	2.	1180
21 Ekim	3.	910
4 Kasım	1.	604
4 Kasım	2.	478
4 Kasım	3.	534
18 Kasım	1.	784

Çizelge 4.1'in devamı

RNA örneği	Biyolojik tekrar	Konsantrasyon (ng/µl)
18 Kasım	2.	928
18 Kasım	3.	716
2 Aralık	1.	908
2 Aralık	2.	354
2 Aralık	3.	608



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1-3 7 Ekim örnekleri, 4-6. kuyucuk 21 Ekim örnekleri, 7-9. kuyucuk 4 Kasım örnekleri, 10-12. kuyucuk 18 Kasım örnekleri, 13-15. kuyucuk 2 Aralık örnekleri.

cDNA sentezinde her RNA kalıbından 1000 ng kullanılmıştır. RNA jel fotoğrafları incelendiğinde örneklerde degradasyon gözlenmemiştir.

4. 3. Transkriptlerin elde edilmesi

Tokoferol biyosentezinde görev alan genlerin mRNA dizilerinin elde etmek için kullanılacak primerler biyoinformatik olarak seçilmiştir. Bu amaç için zeytin türüne ait kısa okuma dizileri SRA veri tabanlarından indirilerek bu okumalarda ilgili genlere ait bölgeler araştırılmıştır.

Bu analiz sırasında ilgili genlere ait referans mRNA dizileri “The Arabidopsis Information Resources” (TAIR) web sayfasından (<http://www.arabidopsis.org>) elde edilmiştir. Bu genler *PDS1 AT1G06570* (Tsegaye ve ark., 2002), *HPT1 AT2G18950* (Collakova ve DellaPenna, 2003), *VTE3 AT3G63410* (Cheng ve ark., 2003), *TCYC AT4G32770* (Porfirova ve ark., 2002b), *GTMT AT1G64970* (Bergmüller ve ark., 2003)’dir. *A. thaliana* bitkine ait bu dizilerin zeytin transkriptomlarında benzerleri NCBI BLASTn programı ile hem nükleotid veritabanlarında hemde NCBI nükleotid veritabanlarında araştırılmıştır. BLASTn analizinde sorgu dizisi olarak tokoferol biyosentezinde görev aldığı bilinen genlerin mRNA dizileri kullanılmış ve veri bankası olarak da mevcut zeytin transkriptleri tercih edilmiştir. BLASTn analizi programın varsayılan parametreleri değiştirilmeden gerçekleştirilmiştir. Blastn sonucunda elde edilen dizilerin *A. thaliana* dizilerine benzerlik oranları çizelge 4.3 ve şekil 4.3’de verilmiştir.

A. thaliana dizilerinin mevcut zeytin referans transcript veritabanlarında yapılan blastn sonuçları en yüksek kapsama oranı % 3 ve tüm sonuçlarda 0.1’in üzerinde E değerleri görülmüştür (Şekil 4.3). Bu sonuçlar tokoferol biyosentezinden sorumlu genlerin mevcut zeytin mRNA veribankalarında tanımlanmadığını göstermiştir.

Bunun yanında yeni nesil dizileme teknikleri ile elde edilmiş ham okuma verilerini içeren SRA veribankaları yapılan blastn analizi ise tüm genlere ait kısmi diziler ortaya çıkarmıştır. Bu diziler ~300 - 450 baz çifti uzunluğundadır ve benzerlik oranları %71 ve % 80 aralığındadır.

Bu analizler sonrasında nükleotid veribankalarında çalışmada hedeflenmiş genlerin zeytindeki benzerlerine ait sadece yeni nesil DNA dizilerinin bulunduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.3, Çizelge 4.3).

A

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 66348 H retrotransposon qypsy-type, complete sequence	31.9	31.9	2%	1.4	82%	KM577595.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea mRNA for putative class I small heat shock protein (hsp18.3 gene), cultivar Celli	31.9	31.9	2%	1.4	80%	FN554869.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 75817 D retrotransposon qypsy-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	90%	KM577565.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 75275 D retrotransposon qypsy-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	100%	KM577562.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite ZIT078 sequence	30.1	30.1	1%	5.1	95%	KC569449.1	

B

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
<input type="checkbox"/> Olea europaea chloroplast omega-3 fatty acid desaturase (fad7) gene, complete cds; nuclear g	35.6	35.6	1%	0.12	100%	JX867255.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea chloroplast omega-3 fatty acid desaturase (FAD7) mRNA, part	35.6	35.6	1%	0.12	100%	HQ889832.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea chloroplast omega-3 fatty acid desaturase mRNA, complete cds; nuclear gene f	35.6	35.6	1%	0.12	100%	DQ788674.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 74884 F retrotransposon qypsy-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	95%	KM577584.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 76182 F retrotransposon copia-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	83%	KM577485.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 75184 F retrotransposon copia-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	95%	KM577479.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite ZIT106 sequence	30.1	30.1	0%	5.1	100%	KC569458.1	

C

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
<input type="checkbox"/> Olea europaea hydroperoxide lyase (hpl) mRNA, complete cds	37.4	37.4	2%	0.034	83%	EU513350.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea microsatellite DNA, clone IAS-pOe23	33.7	33.7	1%	0.42	91%	AJ748729.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 73493 F retrotransposon qypsy-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	90%	KM577582.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 75929 F retrotransposon copia-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	90%	KM577482.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 74714 C retrotransposon copia-type, complete sequence	30.1	30.1	1%	5.1	90%	KM577420.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite ZIT466 sequence	30.1	30.1	1%	5.1	88%	KC569414.1	

D

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 71713 E retrotransposon copia-type, complete sequence	35.6	35.6	1%	0.12	92%	KM577465.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 84585 A retrotransposon copia-type, complete sequence	35.6	35.6	1%	0.12	92%	KM577371.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 85255 A retrotransposon copia-type, complete sequence	33.7	33.7	1%	0.42	88%	KM577385.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea clone GAPU71B microsatellite sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	FJ492755.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU071b sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376384.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU71B sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376383.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU71B sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376382.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU71B sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376381.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU71B sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376380.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea subsp. europaea microsatellite GAPU71B sequence	33.7	33.7	1%	0.42	82%	EU376379.1	

E

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 95168 B retrotransposon qypsy-type, complete sequence	33.7	33.7	1%	0.42	88%	KM577544.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea isolate 84261 A retrotransposon copia-type, complete sequence	31.9	31.9	3%	1.4	79%	KM577364.1	
<input type="checkbox"/> Olea europaea chloroplast omega-3 fatty acid desaturase (fad7) gene, complete cds; nuclear ge	30.1	30.1	2%	5.1	82%	JX867255.1	

Şekil 4.3. *A. thaliana* tokoferol genlerinin blastn analizi sonuçları. A) *PDS1*, B) *HPT1*, C) *VTE3*, D) *TCYC*, D) *GTMT*

Çizelge 4.3. SRA veritabanlarından elde edilen dizilerin blastn analizi sonuçları

<i>A.thaliana</i> geni	Zeytin dizisi	Kapsama (%)	Benzerlik (%)	E değeri
PDS1	SRR014465.23750.2	60	72	2e-24
HPT1	SRR014466.27908.2	66	78	3e-52
VTE3	SRR014465.1530.2	99	80	9e-91
TCYC	SRR014464.39615.2	72	75	1e-51
GTMT	SRR014463.15842.2	78	71	1e-26

Bu dizilerin çoğunun illumina gibi yeni nesil DNA dizileme teknikleri ile elde edildiği ve bu nedenle her bir okumanın ortalama 120 baz uzunluğunda olduğu anlaşılmıştır. Okumaların kısa olması, cDNA örneklerinin diğer zeytin çeşitlerinden (Ozdemir Ozgenturk ve ark., 2010; Donaire ve ark., 2011; Dundar ve ark., 2013; Muñoz-Mérida ve ark., 2013; Yanik ve ark., 2013a; Leyva-Perez Mde ve ark., 2015) elde edilmiş olması nedeni ile alternatif biyoinformatik yaklaşımlar uygulanmıştır. Bu amaç ile NCBI veritabanında depolanmış zeytin transkriptomları bilgisayar ortamına fastq adı verilen bir format olarak indirilerek bir kütüphane elde edilmiştir. Bu kütüphane Geneious R8. Program içerisine aktarılmıştır. Kütüphanede 762.010,626 sayıda DNA fragmenti içermektedir. FASTQ transkriptom okumalarının kalite bilgilerini de içeren bir formattır (Cock ve ark., 2010). Bu nedenle Geneious v8.1 programında okuma kalitesi Q25 düzeyinin altında olanlar elekten geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Q25 değeri yeni nesil okumalarda bir bazın hatalı olma ihtimalinin %0.05 olma ihtimalini ifade eder.

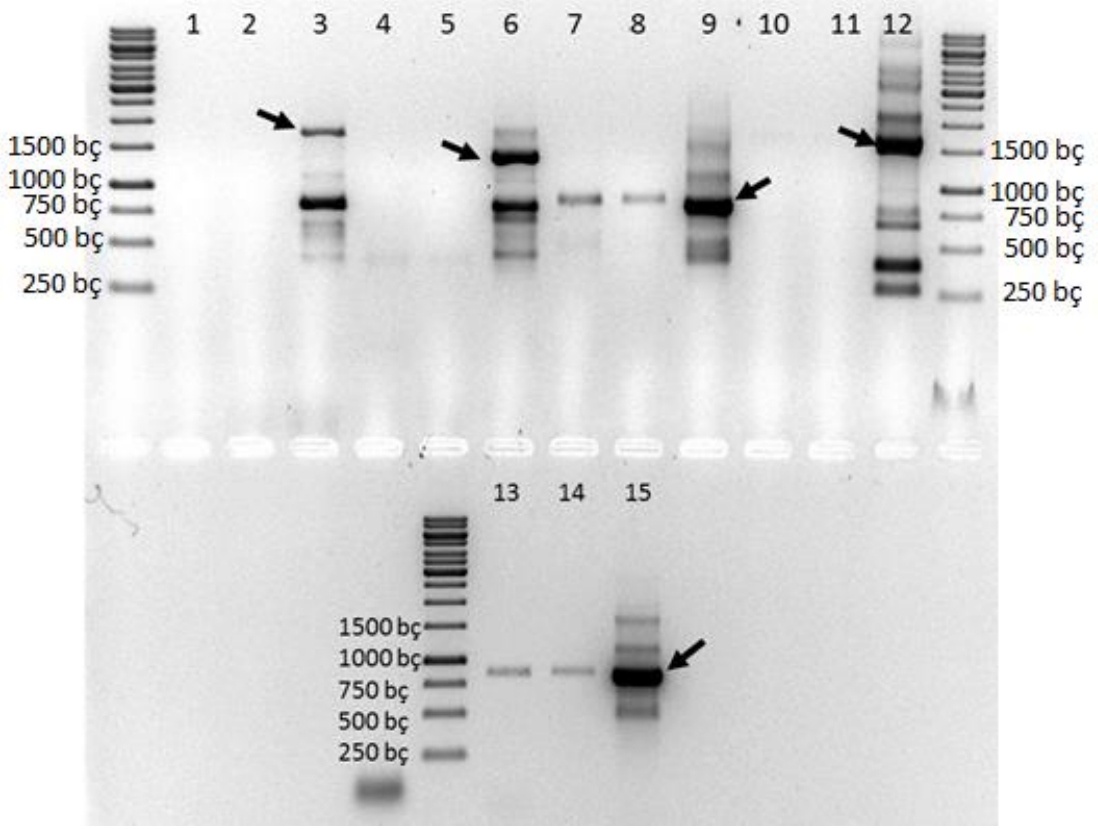
Bu analizler sonucunda zeytin tokoferol biyosentezine katılan genlerin yeni nesil DNA dizileme teknolojilerle elde edilmiş kısmi nükleotid dizileri elde edilmiştir. Elde edilen dizilerin kısmi diziler olması ve farklı zeytin çeşitlerine ait olması sebebi ile bu diziler sadece RACE çalışmaları ve anlatım çalışmaları için gerekli gen spesifik primerler ve nested primerlerin seçilmesi için kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. *A. thaliana* tokoferol biyosentez genlerinin genel bilgileri

<i>A. thaliana</i> Gen kodu	Gen adı	Genomik uzunluk	Transkript uzunluğu
AT1G06570	4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE, HPD, HPPD, PDS1, PHYTOENE DESATURATION 1	1661	1554
AT2G18950	HOMOGENTISATE PHYTYLTRANSFERASE, HOMOGENTISATE PHYTYLTRANSFERASE 1, HPT1, TPT1, VITAMIN E 2, VTE2	3122	1747
AT3G63410	APG1, E37, IEP37, INNER ENVELOPE PROTEIN 37, VITAMIN E DEFECTIVE 3, VTE3	1531	1361
AT4G32770	ATSDX1, SUCROSE EXPORT DEFECTIVE 1, VITAMIN E DEFICIENT 1, VTE1, TCYC	3069	1726
AT1G64970	G-TMT, GAMMA-TOCOPHEROL METHYLTRANSFERASE, TMT1, VITAMIN E DEFICIENT 4, VTE4	2025	1415

4. 4. 3' RACE Çalışmaları

Tokoferol biyosentezinde rol alan genlere ait transkriptlerin 3' uç bölgeleri 3' RACE tekniği ile çoğaltılmıştır. 3' RACE tekniği kısmi dizileri bilinen genlerin tam uzunluktaki 3' uç kısımlarının çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte cDNA sentezi aşamasında mRNA dizilerinin 3' ucundaki poliA kuyruğundan faydalanılarak transkriptlere adaptör diziler eklenmektedir ve bir gen spesifik primer yardımı ile 3' bölge çoğaltılmaktadır. Çalışmada adaptör dizi olarak oligoDT anchor primer eklenmiştir. Adaptör dizi dizi bilgileri bulunmayan 3' transcript uçlarına adaptöre spesifik primerlerin bağlanacağı bölgelerin eklenmesi amacı ile eklenmektedir.



Şekil 4.4. 3' RACE PZR ürünleri. 1-3 *PDS1* geni PZR ürünleri (1. İlk tur PZR ürünü. 2. Saflaştırılmış PZR ürünü. 3. Nested PZR ürünü), 4-6 *HPT1* geni PZR ürünleri (4. İlk tur PZR ürünü. 5. Saflaştırılmış PZR ürünü. 6. Nested PZR ürünü) 7-9 *VTE3* geni PZR ürünleri (7. İlk tur PZR ürünü. 8. Saflaştırılmış PZR ürünü. 9. Nested PZR ürünü) 10-12 *TCYC* geni PZR ürünleri (10. İlk tur PZR ürünü. 11. Saflaştırılmış PZR ürünü. 12. Nested PZR ürünü) 13-15 *GTMT* geni PZR ürünleri (13. İlk tur PZR ürünü. 14. Saflaştırılmış PZR ürünü. 15. Nested PZR ürünü). Oklar beklenen büyüklükteki saflaştırılan ürünleri göstermiştir.

Çalışmada I. PZR sonucunda tüm genlerde beklenen boyutlarda (Çizelge 4.4) ürünlerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). PZR reaksiyonlarından beklenen ürünlere ait tahmini baz uzunluğu *A. thaliana* türünde ilgili primerlerin bağlandığı bölgeler üzerinden hesaplanmıştır. Bu nedenle, türler arası oluşabilecek farklar göz önüne alınarak beklenen ürün büyüklüğünün ± 200 bp farka kadar oluşan ürünler jelden saflaştırılmıştır (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5. RACE çalışmaları sonucu beklenen PZR ürünü büyüklükleri

Gen adı	Beklenen 3' RACE ürünü	Beklenen 5' RACE ürünü
<i>PDS1</i>	1394 b.ç.	326 b.ç.
<i>HPT1</i>	1382 b.ç.	472 b.ç.
<i>VTE3</i>	750 b.ç.	864 b.ç.
<i>TCYC</i>	1596 b.ç.	342 b.ç.
<i>GTMT</i>	885 b.ç.	673 b.ç.

PDS1 geni 3' RACE çalışmasında yaklaşık 1394 bç boyutunda bir ürün beklenmiştir. Buna karşın I. RACE PZR sonucunda jelde görüntülenebilecek miktarda ürünün çoğalmadığı gözlenmiştir. Daha sonra ürün elde edilememiş olsa da kalıp olarak I. PZR reaksiyonu kullanılmış ve nested PZR yapılmıştır. Nested PZR sonrasında ise ~1500 bç büyüklüğünde bir ürün elde edilmiştir (Şekil 4.4). İlgili ürün jelden saflaştırılarak dizi analizi ile incelenmiştir.

HPT1 geni 3' RACE çalışmasında yaklaşık 1382 baz çifti ürün beklenmiştir. Buna karşın I. RACE PZR sonucunda jelde görüntülenebilecek miktarda ürünün çoğalmadığı gözlenmiştir. Daha sonra ürün elde edilememiş olsa da kalıp olarak I. PZR reaksiyonu kullanılmış ve nested PZR yapılmıştır. Nested PZR sonuçları ise yaklaşık 900 ve 1400 bç uzunluğunda iki ürünün oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Beklenen büyüklüğe yakın olmasından dolayı yaklaşık 1400 baz çifti uzunluğundaki ürün jelden saflaştırılmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

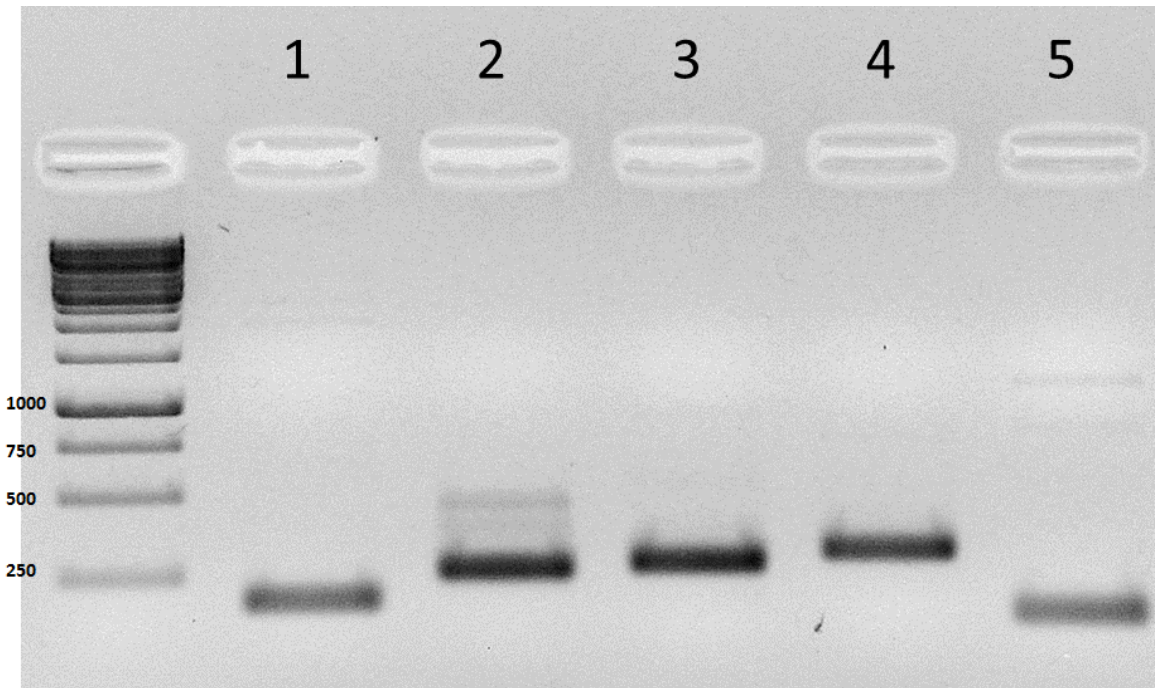
VTE3 geni 3' RACE çalışmasında yaklaşık 750 baz çifti ürün beklenmiştir. I. RACE PZR sonucunda yaklaşık 950 bç uzunluğunda bir ürün elde edildiği gözlenmiştir. Ancak oluşan ürünün konsantrasyonu dizi analizi için yeterli görülmemiştir. Daha sonra kalıp olarak I. PZR reaksiyonu kullanılmış ve nested PZR yapılmıştır. Nested PZR sonucunda ise beklenmeyen boyutlarda ürünlerin yanı sıra yaklaşık 900 baz çifti büyüklüğünde bir ürün daha elde edilmiştir. Bu ürün beklenen 750 bç uzunluğa yakın olmasından dolayı jelden saflaştırılmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

TCYC genine ait 3' RACE çalışmasında yaklaşık 885 baz çifti ürün beklenmiştir. I. RACE PZR sonucunda yaklaşık 900 baz çifti uzunluğunda bir ürün gözlenmiştir (Şekil 4.4). Bu ürünün düşük konsantrasyonda olması nedeni ile dizi analizi için yeterli görülmemiştir.

Daha sonra kalıp olarak I. PZR reaksiyonu kullanılmış ve nested PZR yapılmıştır. Nested PZR sonucunda ise yaklaşık 1500 baz çifti büyüklükte birbirine yakın uzunlukta 2 ürün gözlenmiştir. İlgili iki PZR ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

GTMT genine ait 3' RACE çalışmasında yaklaşık 1596 baz çifti ürün beklenmiştir *GTMT* genine ait jel görüntüleri incelendiğinde ilk PZR sonucunda beklenen 900 bp uzunluğunda bir ürün çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4). Ancak bu ürünün düşük konsantrasyonda olması sebebi ile dizi analizi için yeterli görülmemiştir. Nested PZR sonunda ise yaklaşık 50 baz daha kısa bir ürün elde edilmiş ve jelden saflaştırılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

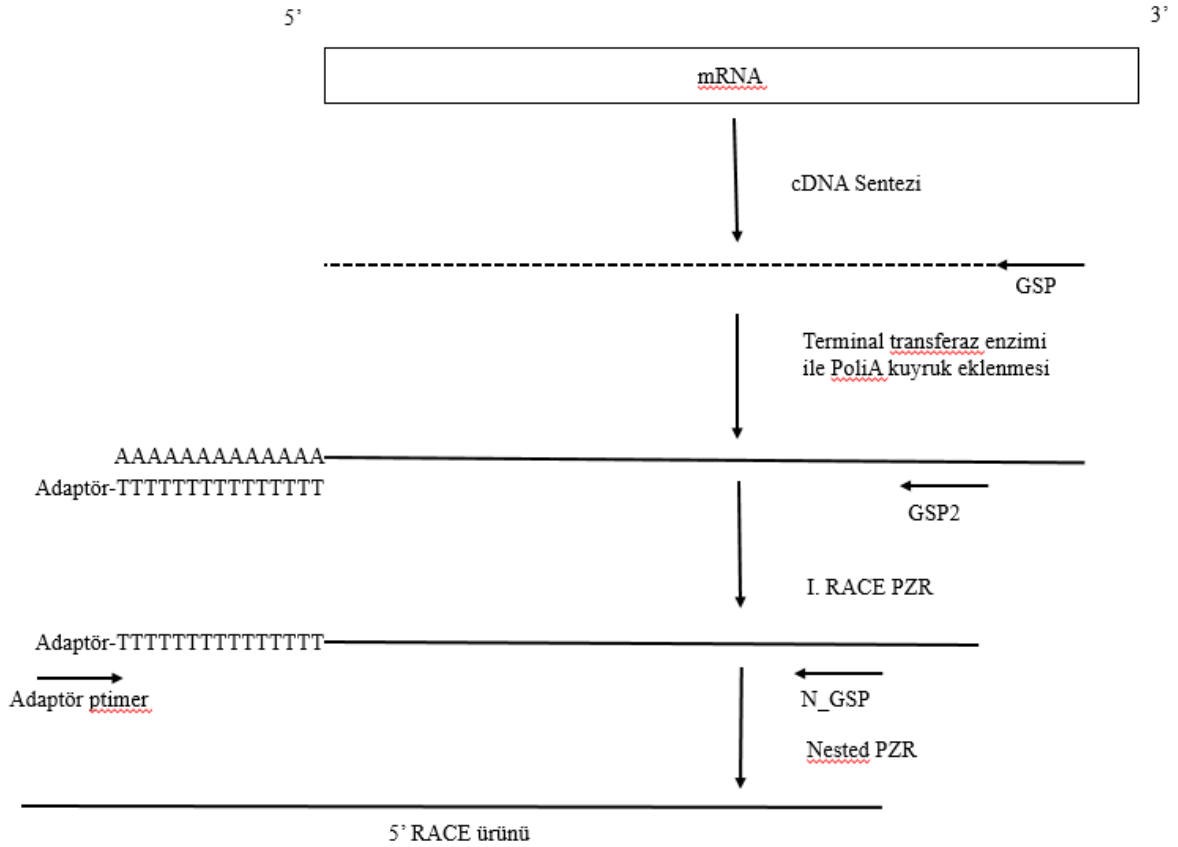
Jelden izole edilen 3' RACE ürünleri DNA dizi analizlerine gönderilmeden önce ilgili ürünlerin iç kısımlarına bağlanan primerler ile kontrol amaçlı bir PZR gerçekleştirilmiştir. Bu yolla dizi analizi öncesi elde edilen ürünlerin ilgilenilen genlere ait olduğuna dair kontrol gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). Bu yolla oluşabilecek non spesifik ürünlerin dizi analizi öncesi elenmesi amaçlanmıştır. Test edilen tüm ürünlerden beklenen boyutta PZR ürünleri elde edilmiş olması nedeniyle ürünler dizi analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.5. Saflaştırılmış 3' RACE ürünleri ile yapılmış kontrol PZR reaksiyonları. 1. *PDS1*, 2. *HPT1*, 3. *VTE3*, 4. *TCYC*, 5. *GTMT*

4.5. 5' RACE Çalışmaları

5' RACE yöntemi kısmi bir bölgeye ait dizi bilgilerinin mevcut olduğu genlerde transkriptin 5' ucunun elde edilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde cDNA sentezi gen spesifik bir primer ile yapıldıktan sonra 5' uca terminal transferaz enzimi ile adaptör bağlı timin kuyruğu eklenir. Sonrasında ise adaptör dizisine bağlanacak adaptör primer ve gen spesifik primer ile PZR yapılacak 5' bölgesi çoğaltılır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 5' RACE tekniğinin temel prensibi

5' RACE deneylerinde ilk tur PZR reaksiyonları sonucunda tüm genlerde agaroz jelde görüntülenebilecek miktarda ürün oluşmamıştır (Şekil 4.7, 4.8).

PDS1 geninden yaklaşık 326 bç uzunluğunda ürün beklenmiştir. Nested PZR jel görüntüleri incelendiğinde beklenen yaklaşık 350-400 baz çifti uzunlukta ürünün çoğaldığı görülmüştür (Şekil 4.7). İlgili bant agaroz jelden izole edilerek saflaştırılmıştır.

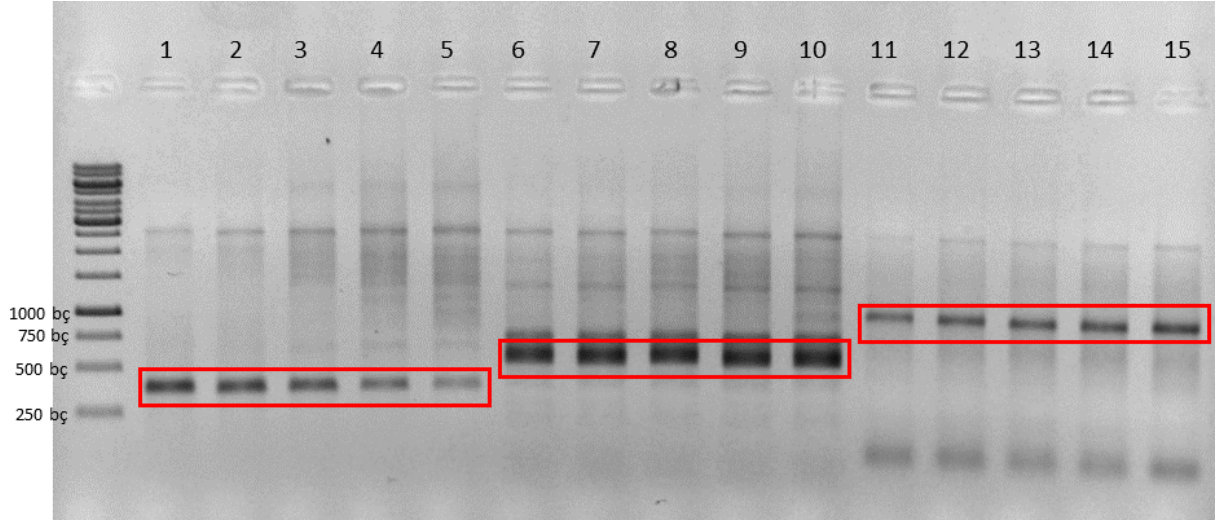
HPT1 geninden yaklaşık 472 bp büyüklüğünde bir ürün beklenmiştir. Beklenen boyutta ürünün nested primerler ile yapılan PZR sonucunda çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). İlgili bant agaroz jelden izole edilerek saflaştırılmıştır.

VTE3 geni için yaklaşık 864 baz çifti uzunluğunda ürün beklenmiştir. Nested PZR sonrası jel görüntüleri incelendiğinde ~800-900 bp aralığında bir ürünün çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). İlgili bant agaroz jelden izole edilerek saflaştırılmıştır.

TCYC geni için yaklaşık 342 baz çifti uzunluğunda ürün beklenmiştir. Nested PZR ürünlerine ait jel fotoğrafları incelendiğinde yaklaşık 400-500 bp aralığında beklenen ürünün çoğaldığı görülmüştür (Şekil 4.8). İlgili bant agaroz jelden izole edilerek saflaştırılmıştır.

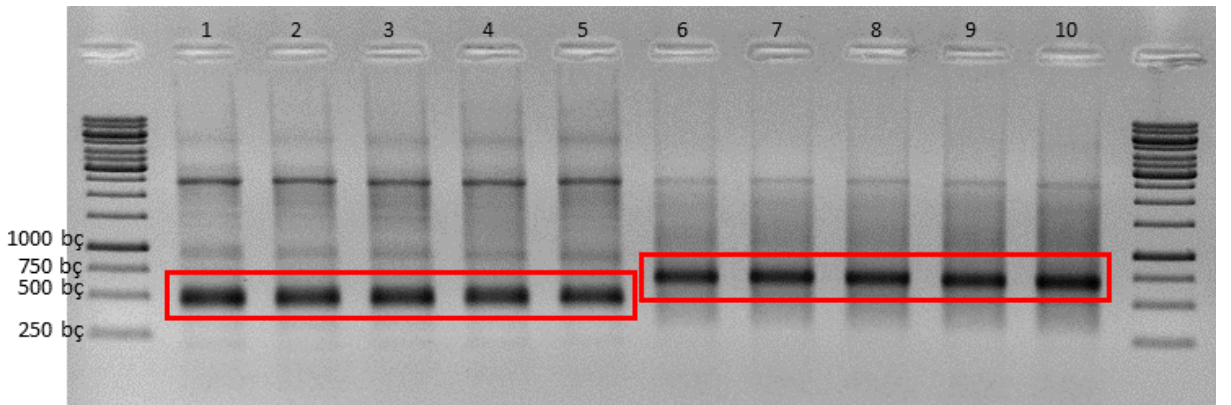
GTMT geni için yaklaşık 673 baz çifti uzunluğunda ürün beklenmiştir. Nested PZR ürünlerine ait jel fotoğrafları incelendiğinde yaklaşık 690-720 bp aralığında beklenen ürünün çoğaldığı görülmüştür (Şekil 4.8). İlgili bant agaroz jelden izole edilerek saflaştırılmıştır.

5' RACE deneylerinde beklenen ürünlerden 50-100 baz daha uzun ürünlerin elde edilmesinin sebebi uygulanan terminal transferaz reaksiyonudur. Bu reaksiyon yolu ile ürünler 5' uçlarından 50-100 baz çifti uzamaktadır. Sonrasında gerçekleştirilen nested PZR deneylerinde beklenen boyutta ürünlerin yanında nonspesifik bazı ürünlerinde çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7, 4.8). Klasik PZR reaksiyonlarında reaksiyonun spesifik çoğaltımını sağlayan çift primerin aksine 5' RACE çalışmalarında cDNA sentezinde ve RACE PZR reaksiyonlarında tek bir gen spesifik primer kullanılmaktadır. Bu sebeple PZR reaksiyonları sonucunda bazı nonspesifik ürünler yer alabilmektedir (Scotto-Lavino ve ark., 2007b). Bu sebeple PZR ürünleri arasında sadece beklenen boyutlardaki ürünler jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Bu yolla 5 gene ait transcript bölgeleri elde edilmiştir.



Şekil 4.7. 5' RACE çalışması ile elde edilen nested gradient PZR ürünleri. 1-5 *PDS1*, 6-10 *HPT1*, 11-15 *VTE3*. Her gene ait 5 reaksiyon gradient PZR reaksiyonunda denenilen 5 farklı sıcaklığa (55 – 60 °C) ait reaksiyonlardır. Kırmızı işaretli bantlar beklenen uzunlukta gözlenen PZR ürünlerine ait bantlardır.

PDS1 geni için seçilen primerlerin *A. thaliana* türüne ait *PDS1* genine ait transkript dizisinde bağlandığı bölgeler incelendiğinde 5' RACE çalışmasından yaklaşık 400 bç. ürün çoğalması beklenmiştir. Jel görüntülerine bakıldığında uygun büyüklükteki bantın çoğaldığı görülmüştür. *HPT1* ve *VTE3* genleri için ise benzer şekilde yaklaşık 600 ve 900 baz çifti uzunluğunda ürünler oluşması beklenmiştir. İlgili büyüklüklerde oluşan ürünler jelden saflaştırılmıştır.



Şekil 4.8. 5' RACE çalışması ile elde edilen nested gradient PZR ürünleri. 1-5 *TCYC*, 6-10 *GTMT*. Kırmızı işaretli bantlar beklenen uzunlukta gözlenen PZR ürünlerine ait bantlardır.

TCYC ve *GTMT* genlerine ait 5' RACE ürünlerinden beklenen büyüklükte ürünler elde edilmiş ve jelden saflaştırılmıştır.

4. 6. Tokoferol genlerinin dizi analizi

RACE çalışmaları sonunda elde edilen PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra dizi analizi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Okumalara ait kromatogramlar Geneious R8 yazılımında incelenmiş ve filtre aracı ile hata ihtimali %0.05'in üzerindeki bölgeler filtrelenmiştir. Sonrasında aynı gene ait diziler birleştirilmiştir.

3' ve 5' RACE çalışmaları ile elde edilen ürünlerin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. *OePDS1* (Şekil 4.9), *OeHPT1* (Şekil 4.10), *OeVTE3* (Şekil 4.11), *OeTCYC* (Şekil 4.12) ve *OeGTMT* (Şekil 4.13) genlerine ait blast analizleri diğer bitki genlerine benzerliklerini ortaya çıkarmıştır.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Nicotiana tomentosiformis]	690	690	94%	0.0	80%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Nicotiana sylvestris]	687	687	94%	0.0	80%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like [Solanum tuberosum]	682	682	94%	0.0	80%
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase 2 [Solanum pennellii]	681	681	97%	0.0	78%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase isoform X1 [Sesamum indicum]	679	679	98%	0.0	78%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like [Solanum lycopersicum]	677	677	97%	0.0	78%
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Lactuca sativa]	668	668	98%	0.0	72%
hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Perilla frutescens]	664	664	99%	0.0	76%
hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Salvia miltiorrhiza]	653	653	99%	0.0	72%
RecName: Full=4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; AltName: Full=4-hydroxyphenylp	652	652	96%	0.0	77%
RecName: Full=4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; AltName: Full=4-hydroxyphenylp	651	651	96%	0.0	76%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Erythranthe quttatus]	650	650	92%	0.0	79%
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, putative [Ricinus communis]	650	650	95%	0.0	76%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like [Camelina sativa]	644	644	94%	0.0	72%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Fragaria vesca subsp. vesca]	642	642	94%	0.0	75%
hypothetical protein CICLE_v10031587mg [Citrus clementina]	640	640	93%	0.0	76%
PREDICTED: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like [Solanum tuberosum]	637	637	94%	0.0	77%

Şekil 4.9. *PDS1* genine en yüksek benzerlik gösteren protein dizileri

PDS1 blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren protein (Şekil 4.9.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *PDS1* genlerine ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar

elde edilen dizilerin zeytin *PDS1* geni olduğunu anlaşılmıştır ve bu gen *Oe PDS1* olarak isimlendirilmiştir.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic-like isoform X3 [Sesamum	523	523	99%	0.0	86%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic-like isoform X1 [Sesamum	523	523	99%	0.0	86%
homogentisate phytoltransferase [Manihot esculenta]	516	516	99%	2e-180	85%
hypothetical protein POPTR_0018s09790g [Populus trichocarpa]	515	515	99%	3e-180	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic [Erythranthe guttatus]	515	515	99%	5e-180	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic-like [Populus euphratica]	515	515	99%	5e-180	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X2 [Sesamum indic	510	510	99%	3e-178	85%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Sesamum indic	510	510	99%	4e-178	85%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X2 [Nicotiana tome	507	507	99%	5e-177	85%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Nicotiana tome	507	507	99%	6e-177	85%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X2 [Nicotiana sylve	507	507	99%	6e-177	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Nicotiana sylve	507	507	99%	7e-177	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Solanum lycop	505	505	99%	5e-176	84%
homogentisate phytoltransferase [Solanum pennellii]	504	504	99%	8e-176	84%
hypothetical protein PRUPE_ppa006544mq [Prunus persica]	504	504	99%	8e-176	84%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic-like isoform X1 [Solanum t	501	501	99%	1e-174	85%
PREDICTED: homogentisate phytoltransferase 1, chloroplastic [Jatropha curcas]	501	501	99%	1e-174	82%
Homogentisate phytoltransferase 1 [Morus notabilis]	500	500	99%	2e-174	84%

Şekil 4.10. *HPT1* genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi

HPT1 blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren protein (Şekil 4.10.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *HPT1* genlerine ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen dizilerin zeytin *HPT1* geni olduğunu anlaşılmıştır ve bu gen *OeHPT1* olarak isimlendirilmiştir.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic isoform	592	592	99%	0.0	89%
chloroplast inner envelope protein, putative [Ricinus communis]	568	568	97%	0.0	87%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Erythr:	566	566	99%	0.0	86%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Jatro	566	566	98%	0.0	86%
2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase [Hevea brasiliensis]	564	564	98%	0.0	86%
hypothetical protein POPTR_0002s04790g [Populus trichocarpa]	562	562	98%	0.0	85%
hypothetical protein PRUPE_ppa008168mq [Prunus persica]	560	560	98%	0.0	85%
uncharacterized protein LOC100783986 [Glycine max]	560	560	98%	0.0	85%
37 kDa inner envelope membrane protein [Morus notabilis]	559	559	98%	0.0	85%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic-like [Pr	557	557	98%	0.0	84%
37 kDa inner envelope membrane protein, chloroplastic [Glycine soja]	556	556	98%	0.0	84%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Nelum	556	556	99%	0.0	85%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Fragar	556	556	98%	0.0	85%
unknown [Lotus japonicus]	556	556	97%	0.0	84%
37 kDa inner envelope membrane, chloroplastic [Gossypium arboreum]	555	555	98%	0.0	84%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Prunu:	555	555	98%	0.0	84%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic-like [Gl	553	553	98%	0.0	84%
hypothetical protein POPTR_0005s23740g [Populus trichocarpa]	553	553	98%	0.0	84%
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein [Theobroma	553	553	98%	0.0	85%
hypothetical protein CICLE_v10021032mq [Citrus clementina]	552	552	98%	0.0	85%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic [Popul	551	551	98%	0.0	84%
PREDICTED: 2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic-like [Ni	551	551	98%	0.0	83%

Şekil 4.11. *VTE3* genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi

VTE3 blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren protein (Şekil 4.11.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *VTE3* genlerine ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen dizilerin zeytin *VTE3* geni olduğunu anlaşılmıştır ve bu gen *OeVTE3* olarak isimlendirilmiştir.

TCYC blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren protein (Şekil 4.12.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *TCYC* genlerine ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen dizilerin zeytin *TCYC* geni olduğunu anlaşılmıştır ve bu gen *OeTCYC* olarak isimlendirilmiştir.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
probable tocopherol cyclase, chloroplastic [Sesamum indicum]	777	777	94%	0.0	76%
tocopherol cyclase [Juglans regia]	749	749	82%	0.0	82%
PREDICTED: tocopherol cyclase, chloroplastic [Erythranthe guttatus]	746	746	94%	0.0	72%
unnamed protein product [Coffea canephora]	744	744	83%	0.0	80%
tocopherol cyclase [Eucalyptus gunnii]	741	741	81%	0.0	81%
PREDICTED: tocopherol cyclase, chloroplastic [Eucalyptus grandis]	740	740	81%	0.0	81%
hypothetical protein EUGRSUZ_C02909 [Eucalyptus grandis]	740	740	81%	0.0	81%
PREDICTED: probable tocopherol cyclase, chloroplastic [Nicotiana sylvestris]	739	739	90%	0.0	74%
PREDICTED: probable tocopherol cyclase, chloroplastic isoform X1 [Nelumbo nucifera]	739	739	89%	0.0	75%
tocopherol cyclase [Nicotiana tabacum]	737	737	90%	0.0	74%
hypothetical protein PRUPE_ppa004789mq [Prunus persica]	735	735	83%	0.0	80%
PREDICTED: tocopherol cyclase, chloroplastic-like [Pyrus x bretschneideri]	734	734	81%	0.0	82%
PREDICTED: tocopherol cyclase, chloroplastic [Prunus mume]	734	734	83%	0.0	80%
tocopherol cyclase [Helianthus annuus]	734	734	82%	0.0	81%
tocopherol cyclase [Helianthus annuus]	733	733	82%	0.0	80%

Şekil 4.12. TCYC genine en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
PREDICTED: probable tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic [Sesamum indicum]	541	541	85%	0.0	81%
PREDICTED: probable tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic isoform X1 [Nicotiana]	521	521	97%	0.0	73%
gamma-tocopherol methyltransferase [Solanum tuberosum]	516	516	84%	5e-180	80%
gamma-tocopherol methyltransferase [Solanum tuberosum]	516	516	84%	8e-180	80%
PREDICTED: tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic isoform X1 [Erythranthe guttat]	515	515	77%	2e-179	85%
gamma-tocopherol methyltransferase [Solanum lycopersicum]	513	513	77%	6e-179	85%
PREDICTED: tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic isoform X1 [Nicotiana sylvestri]	513	513	97%	9e-179	73%
gamma-tocopherol methyltransferase [Perilla frutescens]	510	510	77%	1e-178	83%
gamma-tocopherol methyltransferase [Solanum pennellii]	511	511	77%	4e-178	85%
PREDICTED: tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic isoform X2 [Erythranthe guttat]	511	511	77%	7e-178	85%
PREDICTED: gamma-tocopherol methyltransferase isoform X1 [Solanum lycopersicum]	510	510	77%	2e-177	85%
gamma tocopherol methyl transferase [Solanum lycopersicum]	509	509	77%	3e-177	85%
gamma-tocopherol methyltransferase [Solanum lycopersicum var. cerasiforme]	509	509	77%	4e-177	85%
PREDICTED: probable tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic isoform X2 [Solanun]	508	508	77%	1e-176	85%
gamma-tocopherol methyltransferase [Perilla frutescens]	501	501	83%	8e-174	76%

Şekil 4.13. GTMT genine ait en yüksek benzerlik gösteren 10 protein dizisi

GTMT geni blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren protein (Şekil 4.13.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *GTMT* genlerine ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen dizilerin zeytin *GTMT* geni olduğu anlaşılmış ve bu gen *OeGTMT* olarak isimlendirilmiştir.

VTE3 blast sonuçları incelendiğinde en yüksek benzerlik gösteren nükleotid (Şekil 4.13.) ve protein (Şekil 4.14.) dizilerinin çeşitli bitki türlerine ait *VTE3* ve *VTE3* geninde de bulunan MPBQ/MSBQ metiltransferaz korunmuş bölgesi içeren genlere ait oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen dizilerin zeytin *VTE3* geni olduğu anlaşılmış ve bu gen *OeVTE3* olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.15 Zeytin tokoferol biyosentez genleri üzerindeki korunmuş bölgeler

OePDS1 geni bir dioksigenaz özelliği bulunan bazı proteinlerde bulunan “Glo EDI BRP like” korunmuş bölgesini içermektedir (Waldron ve ark., 2009). Blast sonuçları ve korunmuş fonksiyonel bölgeler çalışmamızda elde edilen transkriptin *PDS1* genine ait olduğunu doğrulamaktadır.

OeHPT1 (homojentisat phytyltransferase) geni bir tokoferol phytyltransferase bölgesi içermektedir (Şekil 4.15) (Yazaki ve ark., 2009). Korunmuş bu bölgenin varlığı çalışmamızda elde edilen transkriptin *HPT1* genine ait olduğunu doğrulamaktadır.

OeVTE3 (MPBQ/MSBQ methyltransferase) geni bir MPBQ/MSBQ metiltransferaz bölgesi içermektedir (Şekil 4.15) (Martin ve McMillan, 2002; Schubert ve ark., 2003). Blast sonuçları ve korunmuş fonksiyonel bölgeler çalışmamızda elde edilen transkriptin *VTE3* genine ait olduğunu doğrulamaktadır.

OeTCYC geni bir tokoferol siklaz korunmuş bölgesini içermektedir (Porfirova ve ark., 2002). Blast sonuçları ve korunmuş fonksiyonel bölgeler çalışmamızda elde edilen transkriptin *TCYC* genine ait olduğunu doğrulamaktadır.

OeGTMT (Gama tokopherol metiltransferaz) geni bir tokoferol gama-metiltransferaz bölgesi içermektedir (Şekil 4.15) (Martin ve McMillan, 2002; Schubert ve ark., 2003). Korunmuş bu bölgenin varlığı çalışmamızda elde edilen transkriptin *GTMT* genine ait olduğunu doğrulamaktadır.

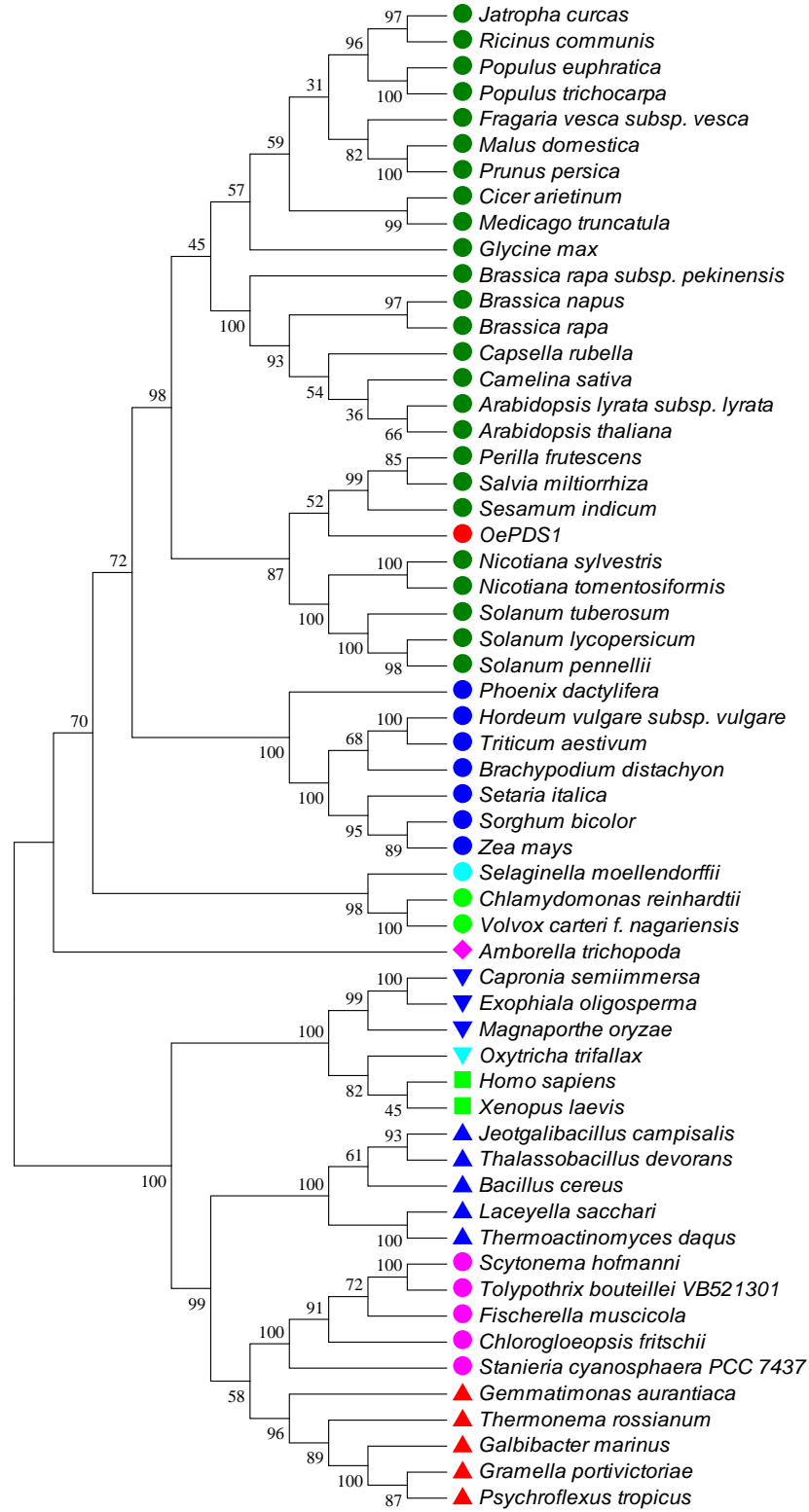
4. 7. Filogenetik Analizler

Tokoferol biyosentezinden sorumlu genlerin bitki ve diğer canlı gruplarında dağılımının incelenmesi amacı ile ilgili genler üzerinden mevcut veritabanları taranarak filogenetik ağaçlar çizilmiştir.

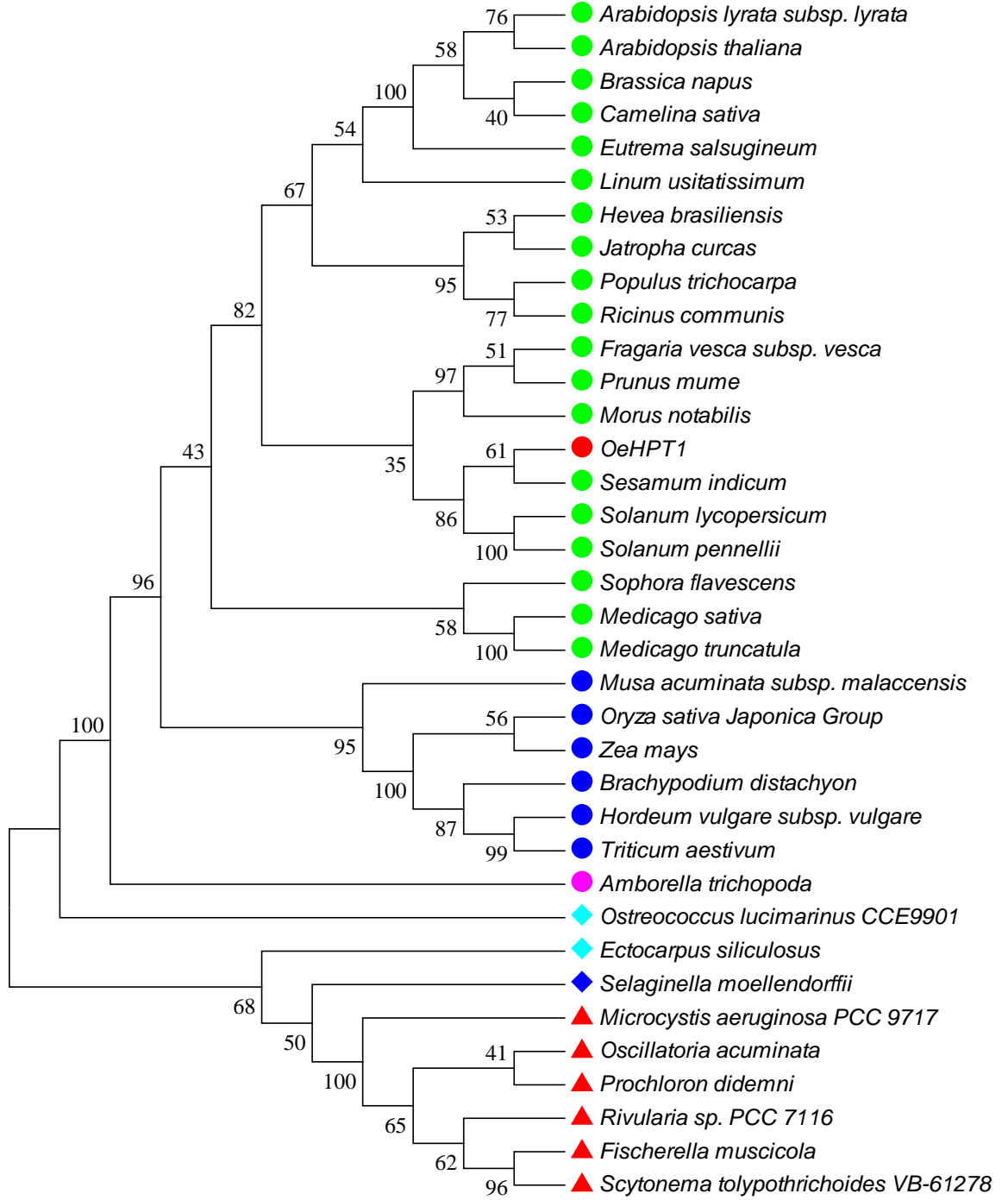
Yapılan analizler ile *PDS1* genine ait protein dizileri tüm canlı alemlerine ait çeşitli türlerde elde edilmiş ve filogenetik olarak incelenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde *PDS1* geninin tüm bitki, hayvan, bakteri ve mantar alemlerinde var olduğu ortaya çıkmıştır. Bitkiler arasında ilgili genin dikotiledon, monokotiledon, siyanobakteri, karayosunu ve alg bitki gruplarında var olduğu görülmüştür. Ayrıca çiçekli bitkilerin en eski üyesi sayılan ve bazal açıklı tohumlu bitkiler olarak gruplandırılan türlerden biri olan *Amborella trichopoda* türünde de *PDS1* genine rastlanmıştır (Soltis ve ark., 2008; Zuccolo ve ark., 2011). Bitki alemleri dışında gram pozitif ve negatif bakterilerde de *PDS1* geni benzerleri yer almaktadır. İnsan, protozoa ve mantar türlerinde de benzerlerinin var olması bu genin tüm canlılarda

korunmuş bir görevinin olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.16).

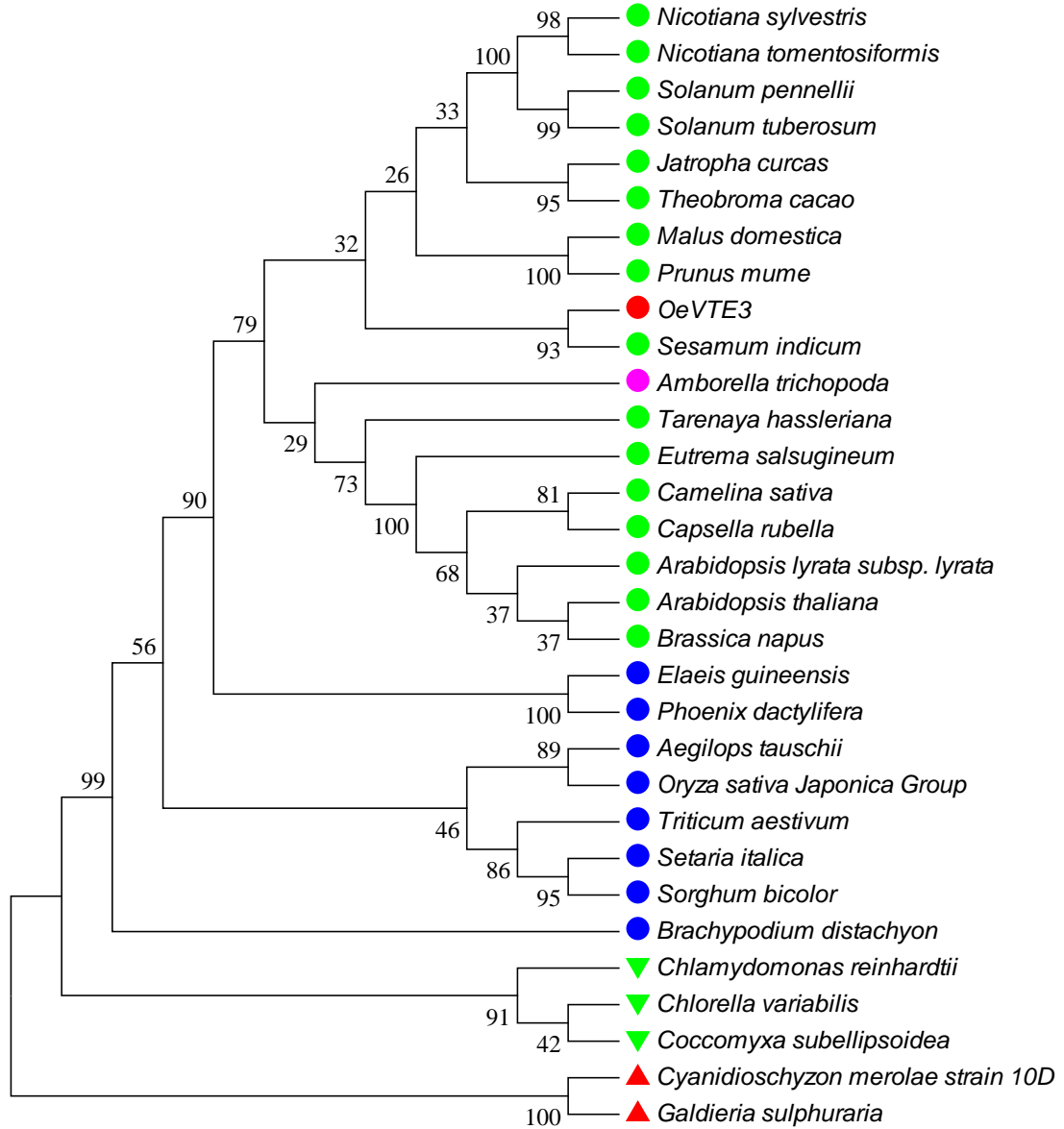
HPT1 protein dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda ilgili gene *PDS1* geninin aksine sadece fotosentetik türlerde rastlanılmıştır. Bitkiler arasında ilgili genin çift çenekli bitkiler, tek çenekli bitkiler, siyanobakteri, karayosunu ve alg bitki gruplarında var olduğu görülmüştür. Ayrıca çiçekli bitkilerin en eski üyesi sayılan ve bazal açıkli tohumlu bitkiler olarak gruplandırılan türlerden biri olan *Amborella trichopoda* türünde de *HPT1* genine rastlanmıştır (Şekil 4.17) (Soltis ve ark., 2008; Zuccolo ve ark., 2011). *HPT1* genine sadece bitki gruplarında rastlanmış olması ve tokoferollerin sadece bitkilerde üretilmesi ilgili genin tokoferol biyosentezindeki görevi ile uyumludur.



Şekil 4.16. PDS1 protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç. ● Çift çenekli bitkiler, ● Tek çenekli bitkiler, ● Kara yosunları, ● Algler, ◆ Bazal açık tohumlular, ▼ Mantarlar, ▼ Protozoa, ■ Omurgalı hayvanlar, ▲ Gram pozitif bakteriler, ● Siyanobakteriler, ▲ Gram negatif bakteriler, ● *Olea europaea*



Şekil 4.17. HPT1 protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç. ● Çift çenekli bitkiler, ● Tek çenekli bitkiler, ● Bazal açık tohumlular, ◆ Algler, ◆ Kara yosunları, ▲ Siyanobakteriler, ● *Olea europaea*



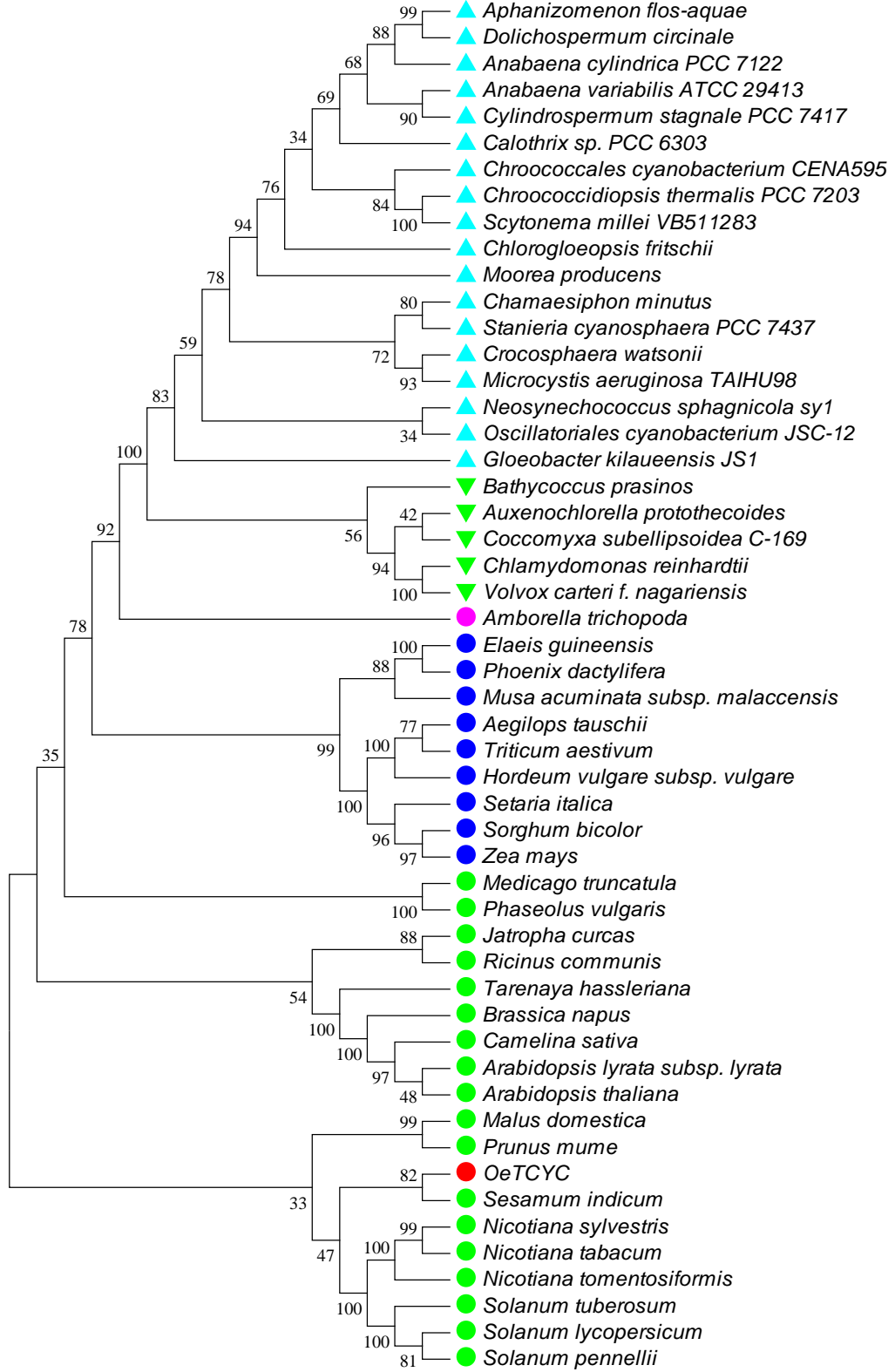
Şekil 4.18. *VTE3* protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç. ● Çift çenekli bitkiler, ● Bazal açık tohumlular, ● Tek çenekli bitkiler, ▼ Yeşil algler, ▲ Kırmızı algler, ● *Olea europaea*

VTE3 protein dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda ilgili gene sadece bitki türlerinde rastlanılmıştır. Bitkiler arasında ilgili genin çift çenekli bitkiler, tek çenekli bitkiler, kırmızı ve yeşil alg bitki gruplarında var olduğu görülmüştür. İlgili gruplar filogenetik ağaç üzerinde ayrı kladlar halinde birleşmişlerdir. Ayrıca çiçekli bitkilerin en eski üyesi sayılan ve bazal açıklı tohumlu bitkiler olarak gruplandırılan türlerden biri olan *Amborella trichopoda* türünde de *VTE3* genine rastlanmıştır (Şekil 4.18) (Soltis ve ark., 2008; Zuccolo ve ark., 2011). *VTE3* genine sadece bitki gruplarında rastlanmış olması ve

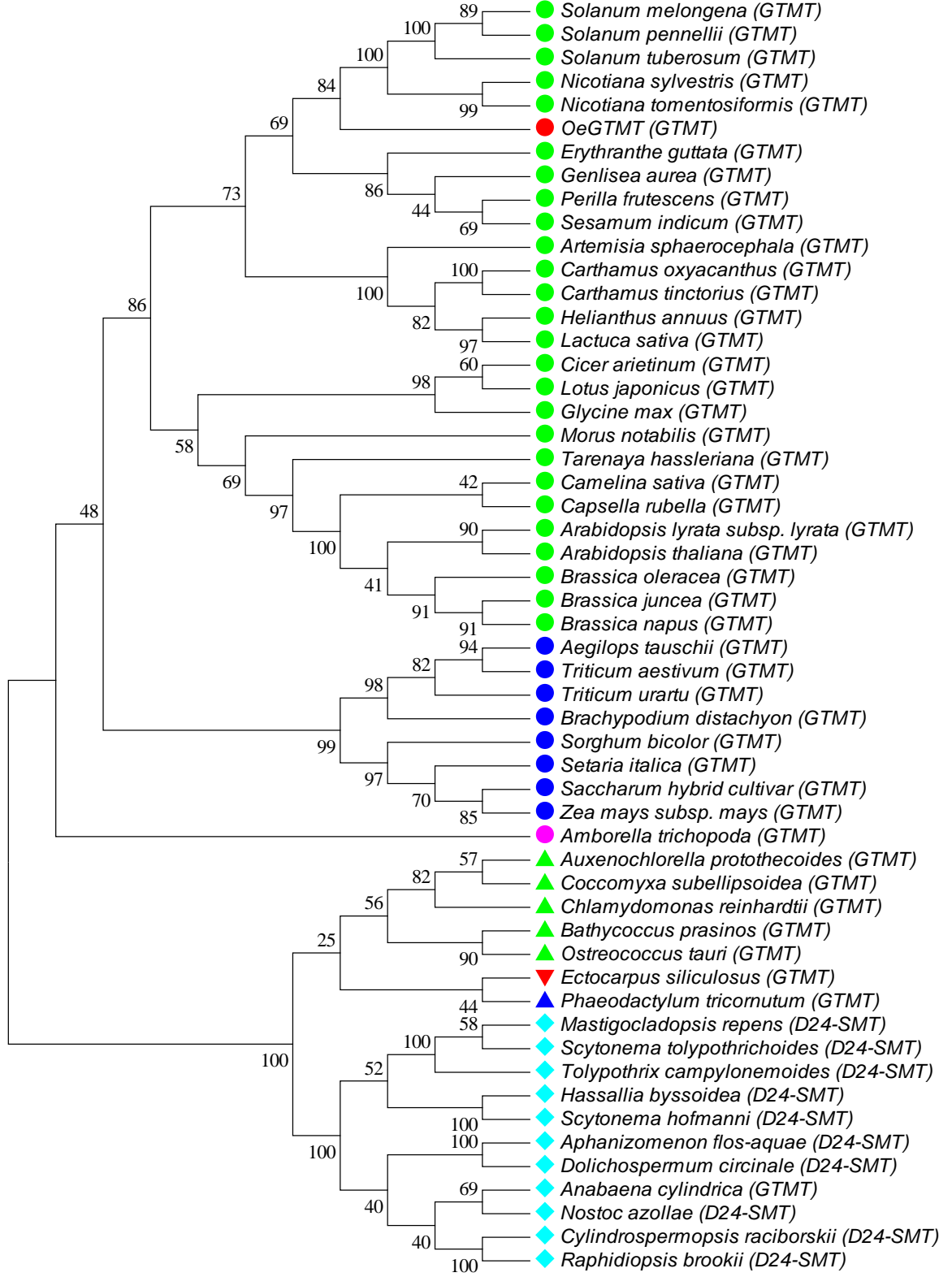
tokoferollerin sadece bitkilerde üretilmesi ilgili genin tokoferol biyosentezindeki görevi ile uyumludur.

TCYC protein dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda ilgili gene sadece bitki türlerinde rastlanılmıştır. Bitkiler arasında ilgili genin çift çenekli bitkiler, tek çenekli bitkiler, yeşil alg ve siyanobakteri bitki gruplarında var olduğu görülmüştür. Ayrıca çiçekli bitkilerin en eski üyesi sayılan ve bazal açıklı tohumlu bitkiler olarak gruplandırılan türlerden biri olan *Amborella trichopoda* türünde de *TCYC* genine rastlanmıştır (Şekil 4.19) (Soltis ve ark., 2008; Zuccolo ve ark., 2011). *A. trichopoda* türü filogenetik ağaç üzerinde tek çenekli ve çift çenekli bitkilerin dışında bir dış grup olarak yer almıştır. *TCYC* genine sadece bitki gruplarında rastlanmış olması ve tokoferollerin sadece bitkilerde üretilmesi ilgili genin tokoferol biyosentezindeki görevi ile uyumludur.

GTMT protein dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda ilgili gene sadece bitki türlerinde rastlanılmıştır. Bitkiler arasında ilgili genin çift çenekli bitkiler, tek çenekli bitkiler, kırmızı ve yeşil alg bitki gruplarında var olduğu görülmüştür. Ayrıca çiçekli bitkilerin en eski üyesi sayılan ve bazal açıklı tohumlu bitkiler olarak gruplandırılan türlerden biri olan *Amborella trichopoda* türünde de *GTMT* genine rastlanmıştır (Şekil 4.20) (Soltis ve ark., 2008; Zuccolo ve ark., 2011). *A. trichopoda* türü filogenetik ağaç üzerinde tek çenekli ve çift çenekli bitkilerin dışında bir dış grup olarak yer almıştır. *GTMT* genine sadece bitki gruplarında rastlanmış olması ve tokoferollerin sadece bitkilerde üretilmesi ilgili genin tokoferol biyosentezindeki görevi ile uyumludur.



Şekil 4.19. TCYC protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç. ● Çift çenekli bitkiler, ● Tek çenekli bitkiler, ● Bazal açık tohumlular, ▼ Yeşil algler, ▲ Siyanobakteriler, ● *Olea europaea*



Şekil 4.20. GTMT protein dizileri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç. ● Çift çenekli bitkiler, ● Tek çenekli bitkiler, ● Bazal açık tohumlular, ▲ Yeşil algler, ▼ Kırmızı algler, ▲ Diatomlar ◆ Siyanobakteriler, ● *Olea europaea*

4. 8. Gen Anlatımı Çalışmaları

Zeytin meyvelerinin gelişimi boyunca tokoferol biyosentezinde rol alan genlerin anlatımlarının incelenmesi amacı ile SYBR Green tekniği ile kantitatif real time PZR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Zeytin gelişimi 15 gün aralıklarla Kasım-Aralık ayları arasında alınan örnekler ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1).

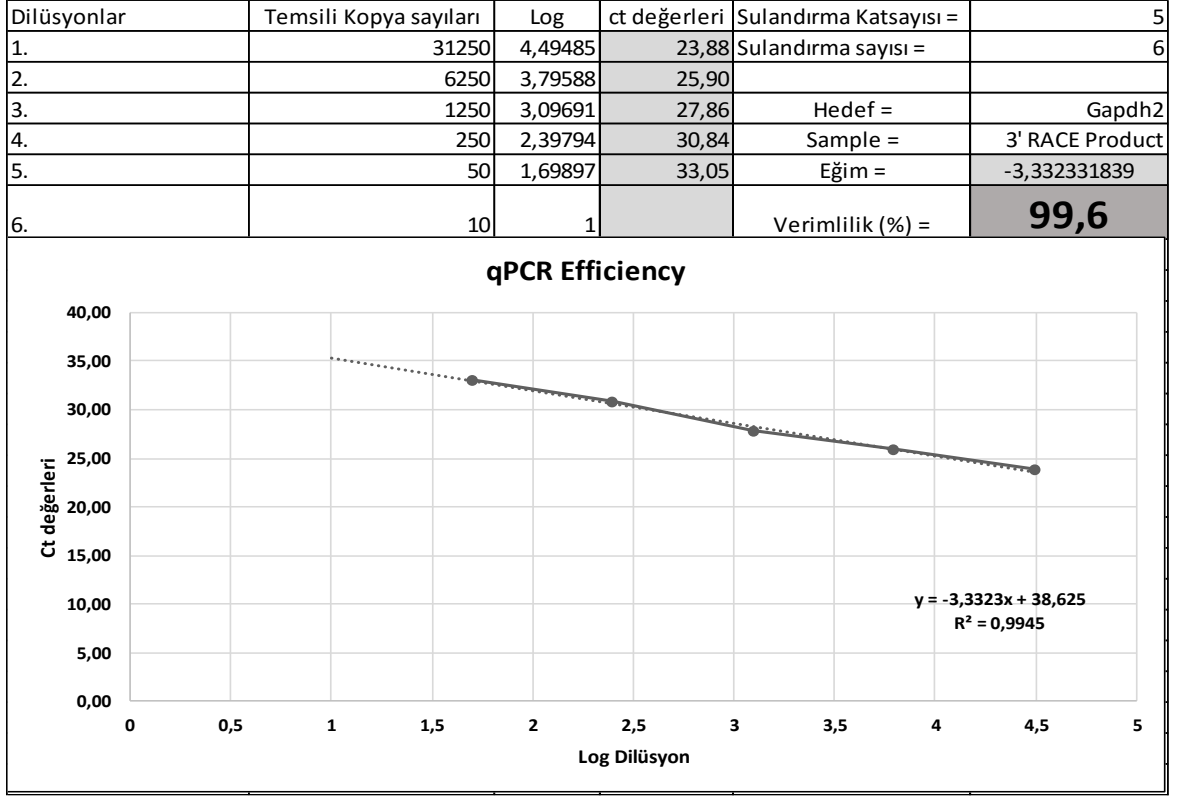
Seçilen primerler için gen anlatım çalışması öncesinde verimlilik değerlerinin belirlenmesi için standart eğri eğrileri çizilmiş ve verimlilikler hesaplanmıştır. Sonrasında uygun verimlilik aralığındaki koşullarda comperative Ct yöntemi ile anlatım düzeyleri karşılaştırılmıştır.

4. 9. Standart Eğri Deneylerinin Kurulması

Çalışmada seçilen primeler için standart eğrilerin çizilmesi amacı ile RT PZR kurulmuştur. Bu reaksiyonlarda kalıp olarak RACE çalışmaları sırasında elde edilmiş her gene özgü cDNA veya primerlerin bağlanacağı bölgeyi taşıyan saflaştırılmış PZR ürünü kullanılmıştır. PZR ürünlerine ait tahmini kopya sayıları “**Kopya sayısı = (DNA miktarı * 6.022x10²³) / (DNA dizi uzunluğu * 1x10⁹ * 650)**” formülüne göre hesaplanmıştır (Dorak, 2006). Kullanılacak kalıplar en düşük dilüsyon 10 kopya olacak şekilde 6 seri dilüsyon gerçekleştirilmiştir. İlgili dilüsyon noktalarında SYBR GREEN tekniği ile reaksiyonlar kurulmuş ve Ct cinsinden sonuçlar verimlilik açısından değerlendirilmiştir.

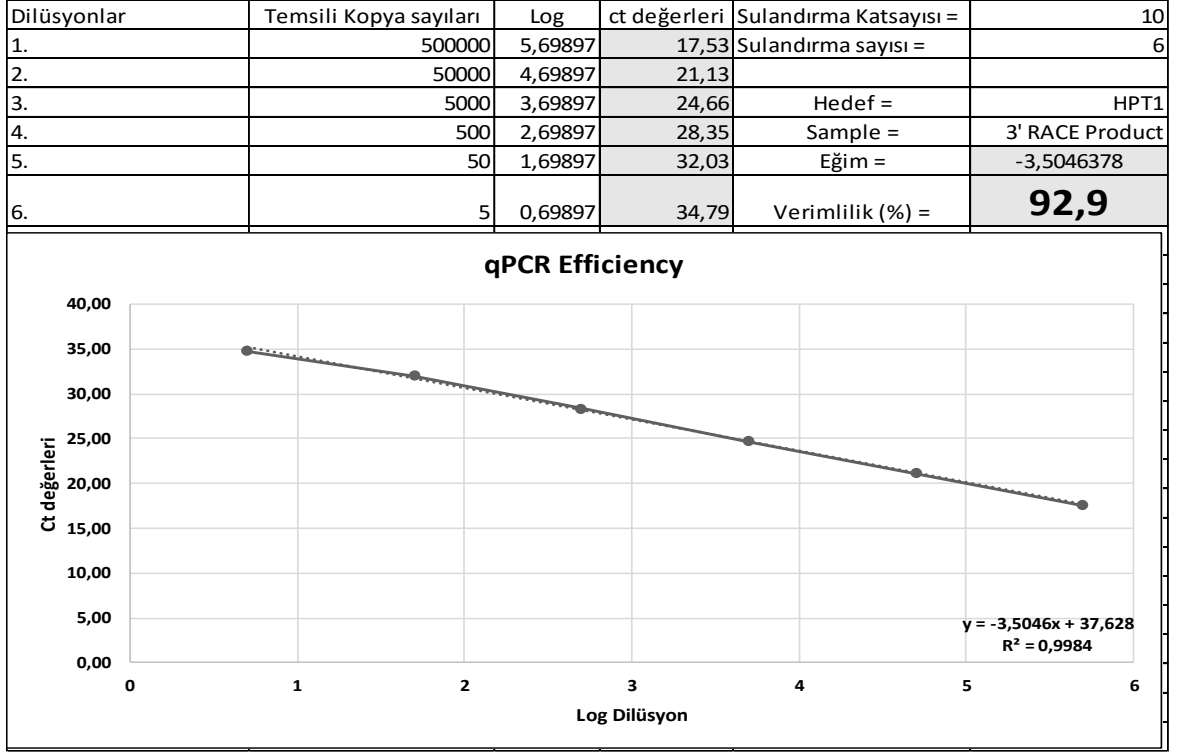
4. 10. Verimlilik Değerlerinin Hesaplanması

Elde edilen Ct değerleri ve tahmini kopya sayılarının logaritması ile bir doğru çizilmiş ve ilgili doğrunun eğimi hesaplanmıştır. Elde edilen eğim değeri PZR verimliliğinin hesaplanması için “**Verimlilik = (-1+10^(-1/slope)) x 100**” formülü ile kullanılmıştır (Dorak, 2006).



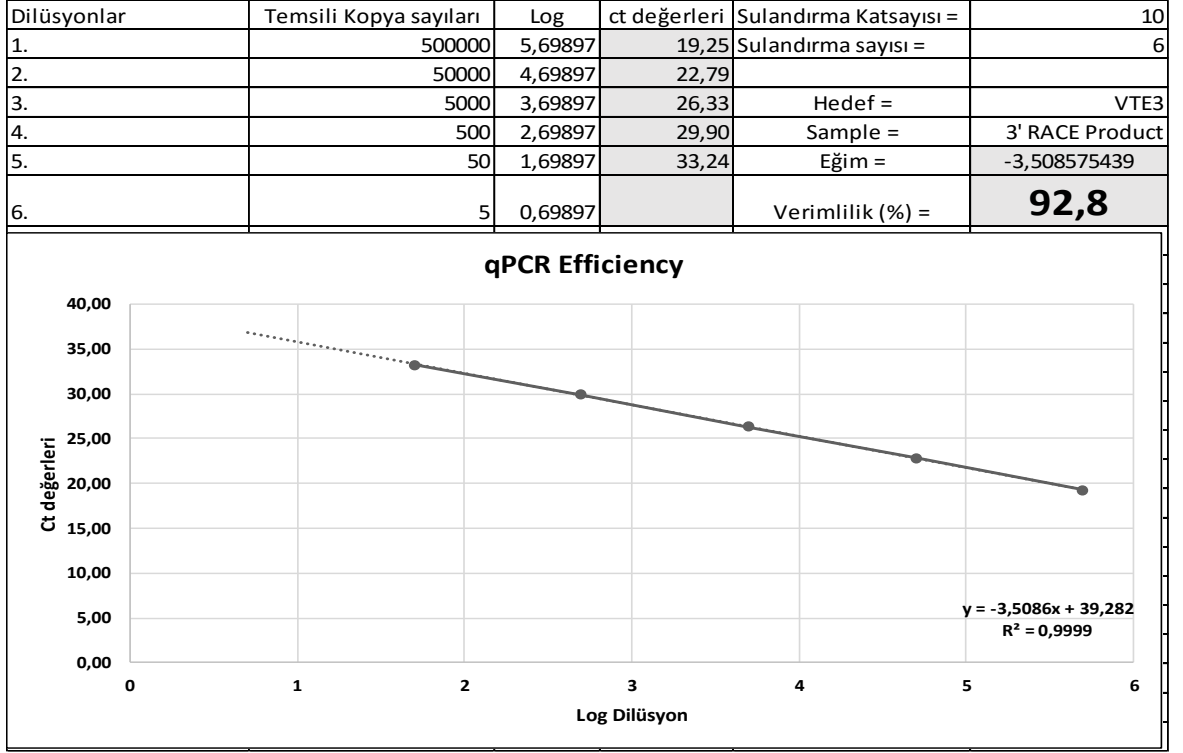
Şekil 4.16. GAPDH2 geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri

Kantitatif PZR okumaları sonucu seri dilüsyonlardan elde edilen ct değerleri ve kopya sayılarının logaritma değerleri ile excel programında bir doğru çizilmiştir (Şekil 4.16). GAPDH2 genine ait standart eğri incelendiğinde R^2 değerinin 0.9945 olduğu hesaplanmış ve elde edilen dilüsyon noktalarına ait verilerin yeterince doğrusal olduğu anlaşılmıştır. Bu doğruya ait eğim -3.332331839 formüle yerleştirildiğinde PZR reaksiyonunun % 99.6 verimlilikle çalıştığı hesaplanmıştır. Bu sonuca ve CT değerlerinin 23.88– 33.05 gibi geniş bir aralığı kapsaması sebebi ile GAPDH2 geni için seçilen primer ve reaksiyon şartlarının anlatım çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.



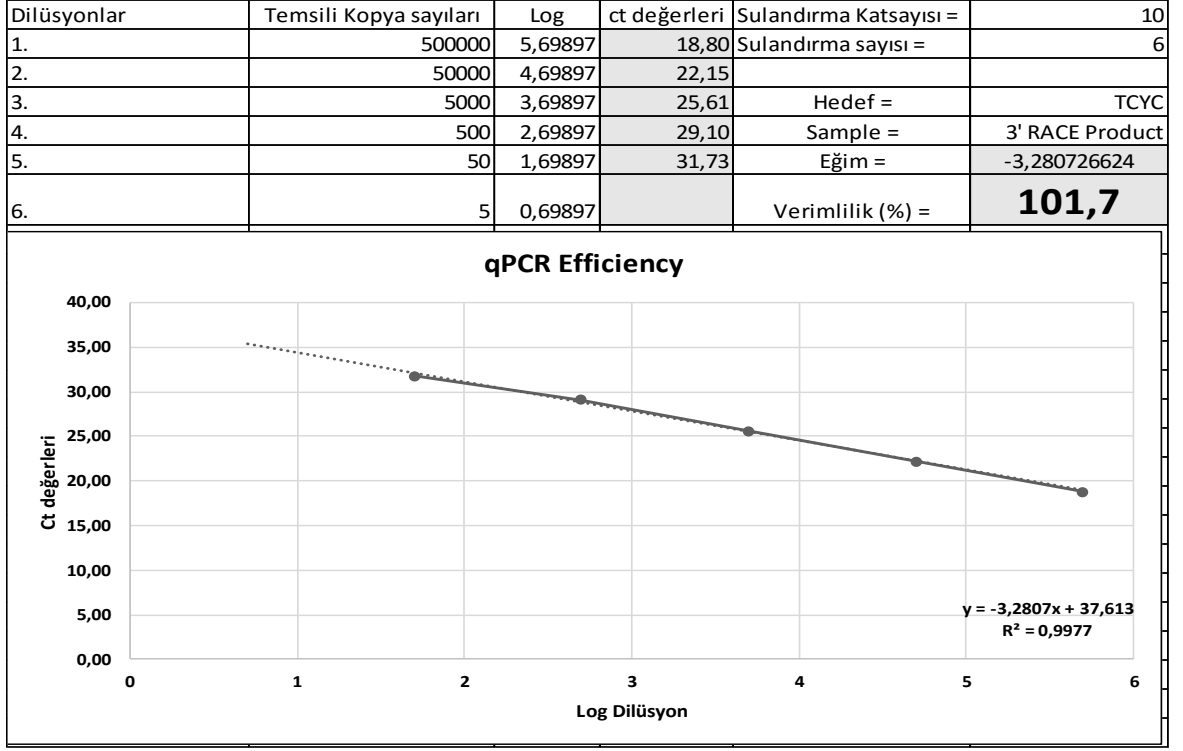
Şekil 4.17. *HPT1* geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri

HPT1 geni kantitatif PZR okumaları sonucu seri dilüsyonlardan elde edilen CT değerleri ve kopya sayılarının logaritma değerleri ile excel programında bir doğru çizilmiştir (Şekil 4.17). *HPT1* genine ait standart eğri incelendiğinde R2 değeri 0.9984 olarak hesaplanmış ve dilüsyon noktalarına ait verilerin yeterince doğrusal olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.17). Bu doğruya ait -3.5046 eğim değeri formüle yerleştirildiğinde PZR'nin % 92.9 verimlilikle çalıştığı hesaplanmıştır. Verimliliğin istenilen aralıkta yer alması ve CT değerlerinin 17.53 – 34.79 gibi geniş bir aralığı kapsaması sebebi ile kullanılan primer ve reaksiyon şartlarının anlatım çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.



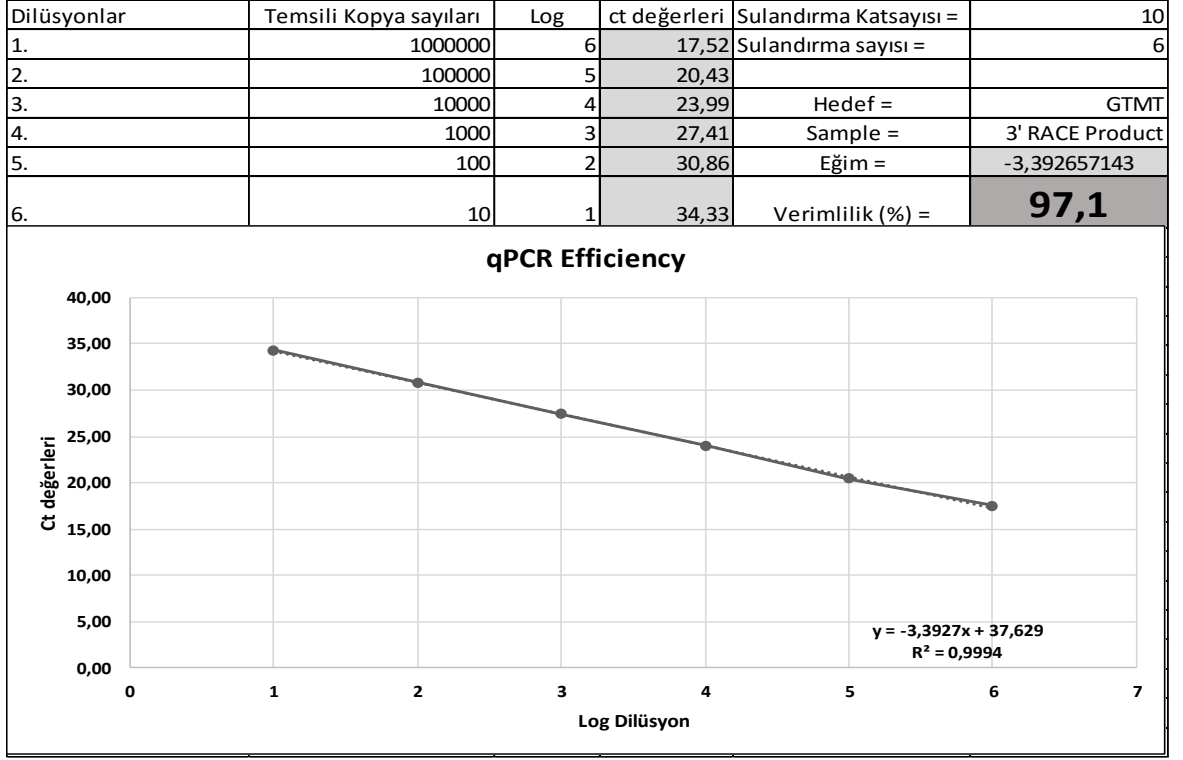
Şekil 4.18. VTE3 geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri

VTE3 geni kantitatif PZR okumaları sonucu seri dilüsyonlardan elde edilen ct değerleri ve kopya sayılarının logaritma değerleri ile excel programında bir doğru çizilmiştir (Şekil 4.18). VTE3 genine ait standart eğri incelendiğinde R2 değeri 0.9999 olarak hesaplanmış ve elde edilen dilüsyon noktalarına ait verilerin yeterince doğrusal olduğunu göstermiştir. Bu doğruya ait -3.508575439 eğim değeri formüle yerine yerleştirildiğinde PZR'nin % 92.8 verimlilikle çalıştığı hesaplanmıştır. Verimliliğin istenilen aralıkta yer alması ve CT değerlerinin 19.25 – 33.24 gibi geniş bir aralığı kapsaması sebebi ile kullanılan primer ve reaksiyon şartlarının anlatım çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.



Şekil 4.19. TCYC geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri

TCYC geni kantitatif PZR okumaları sonucu seri dilüsyonlardan elde edilen ct değerleri ve kopya sayılarının logaritma değerleri ile excel programında bir doğru çizilmiştir (Şekil 4.19). TCYC genine ait standart eğri incelendiğinde R2 değeri 0.9977 olarak hesaplanmıştır ve elde edilen dilüsyon noktalarına ait verilerin yeterince doğrusal olduğunu göstermiştir. Elde edilen doğruya ait -3.280726624 eğim değeri formülde yerine yerleştirildiğinde PZR reaksiyonunun % 101.7 verimlilikle çalıştığı hesaplanmıştır. Verimliliğin istenilen aralıkta yer alması ve CT değerlerinin 18.80 – 31.73 gibi geniş bir aralığı kapsamaması sebebi ile kullanılan primer ve reaksiyon şartlarının anlatım çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.

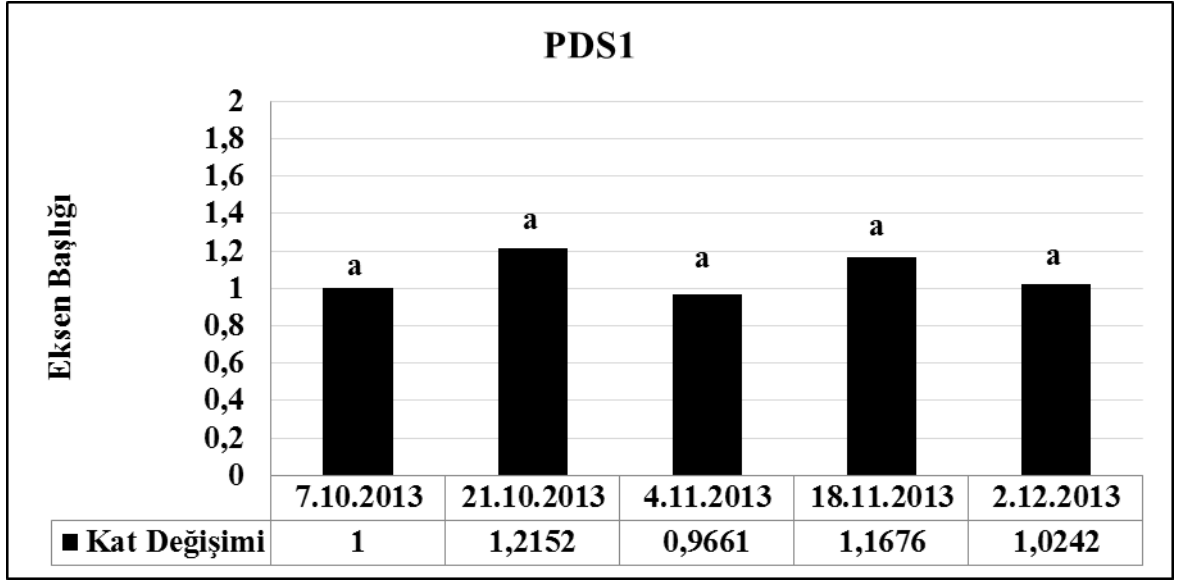


Şekil 4.20. *GTMT* geni verimlilik eğrisi ve verimlilik değerleri

GTMT geni kantitatif PZR okumaları sonucu seri dilüsyonlardan elde edilen ct değerleri ve kopya sayılarının logaritma değerleri ile excel programında bir doğru çizilmiştir (Şekil 4.20). *GTMT* genine ait standart eğri incelendiğinde R2 değeri 0.9994 olarak hesaplanmış ve elde edilen dilüsyon noktalarına ait verilerin yeterince doğrusal olduğunu göstermiştir. Elde edilen doğruya ait -3.5046 eğim değeri formülde yerine yerleştirildiğinde PZR'ın % 97.1 verimlilikle çalıştığı hesaplanmıştır. Verimliliğin istenilen aralıkta yer alması ve Ct değerlerinin 17.52 – 34.33 gibi geniş bir aralığı kapsaması sebebi ile kullanılan primer ve reaksiyon şartlarının anlatım çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.

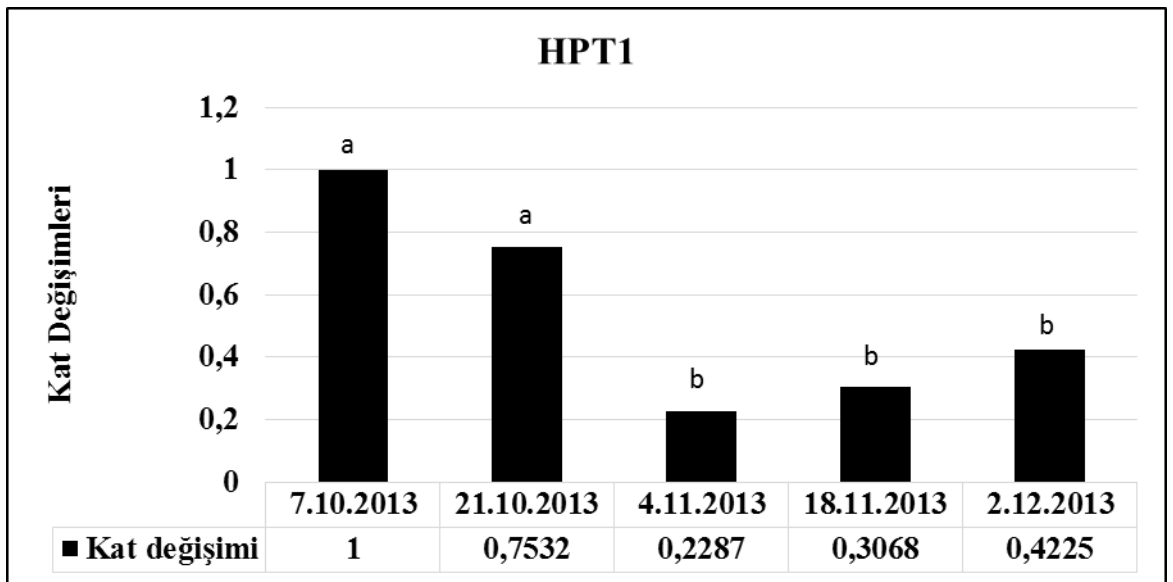
4. 11. Gen Anlatımı Çalışmalarının Gerçekleştirilmesi

RT-PZR reaksiyonları sonrasında cihaza ait yazılımın oluşturduğu raporlar incelenmiştir. Bu aşamada negatif kontrol reaksiyonlarında 35 Ct değerinin altında çoğalma gözlenen, birden fazla tm değerinde ürün gözlenen ve teknik tekrarlar arası 0.5 Ct farklılık bulunan reaksiyonlar yok sayılarak tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde negatif kontrollerde bir çoğalma gözlenmemiştir. Ayrıca melt curve analizi sonuçları her bir gen için tek bir ürünün çoğaldığını göstermiştir (Ek 6-11).



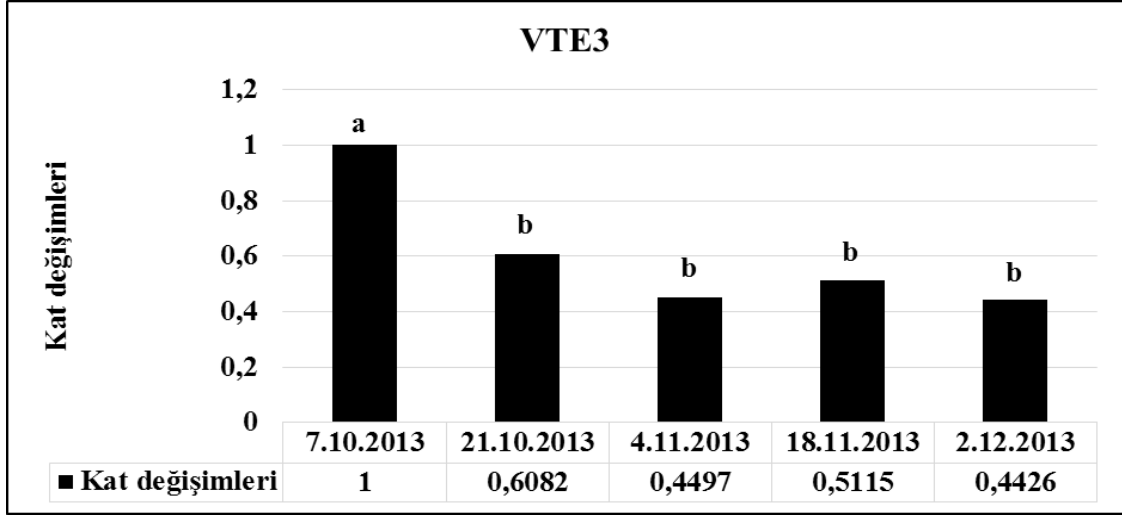
Şekil 4.21. *PDS1* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları. Harfler istatistiksel açıdan farklılık gösteren grupları temsil etmektedir.

PDS1 geni anlatımı 5 farklı dönemde incelendiğinde meyve gelişimi boyunca hiç bir dönemde *PDS1* anlatımında istatistiksel açıdan anlamlı değişimler gözlenmemiştir (Şekil 4.21).



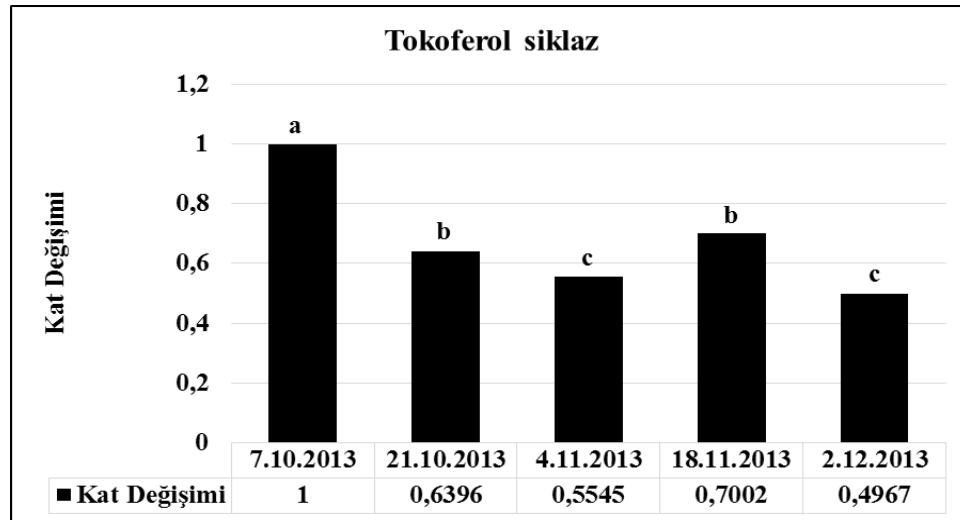
Şekil 4.22. *HPT1* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları. Harfler istatistiksel açıdan farklılık gösteren grupları temsil etmektedir.

HPT1 geni anlatımı incelendiğinde 7 Ekim ve 21 Ekim dönemlerinde gen anlatımları yüksek iken sonraki dönemlerde anlatımlarda bu erken 2 döneme göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.22).



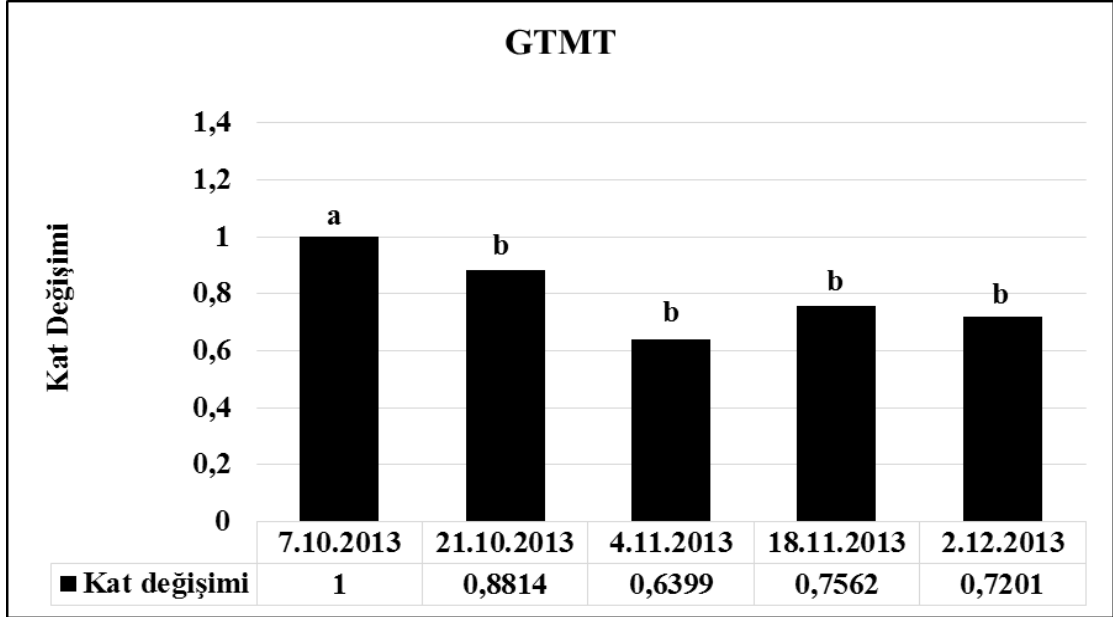
Şekil 4.23. *VTE3* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları. Harfler istatistiksel açıdan farklılık gösteren grupları temsil etmektedir.

VTE3 geni anlatım düzeyleri incelendiğinde en yüksek anlatım düzeylerinin 7 ve 21 ekim döneminde en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23). Sonraki dönemlerde anlatımının azaldığı ve sabit kaldığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.24. *TCYC* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları. Harfler istatistiksel açıdan farklılık gösteren grupları temsil etmektedir.

TCYC genine ait anlatım verileri incelendiğinde 7 ekim döneminde anlatım düzeylerinin en üst seviyede olduğu, sonraki dönemlerde ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.24).

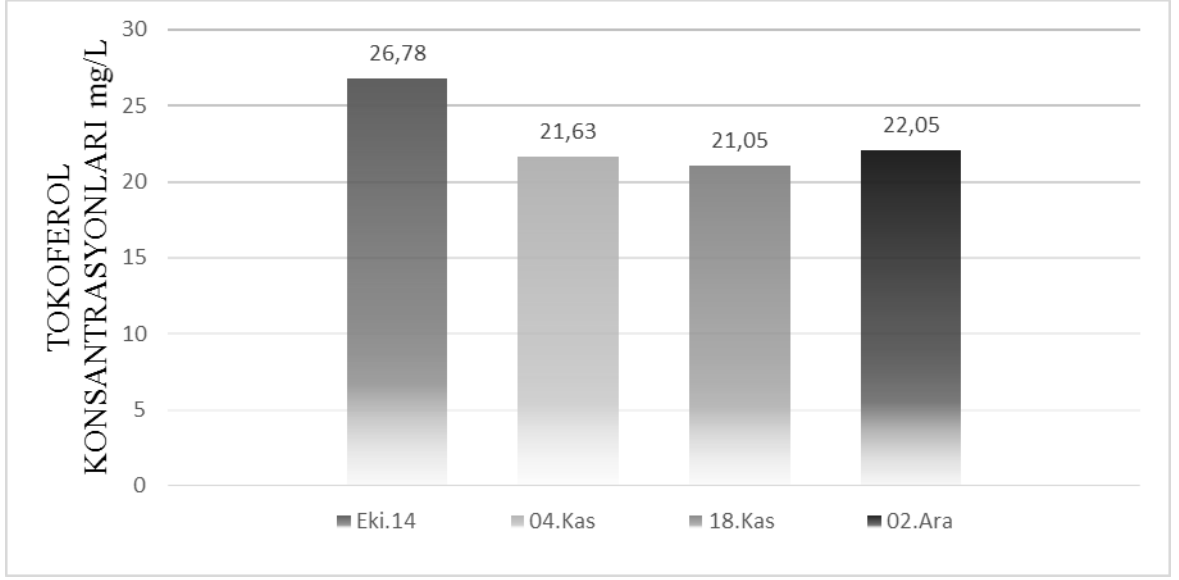


Şekil 4.25. *GTMT* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları. Harfler istatistiksel açıdan farklılık gösteren grupları temsil etmektedir.

GTMT genine ait anlatım verileri incelendiğinde zeytin meyvelerinin olgunlaşma süreci boyunca istatistiksel açıdan anlamlı değişimler belirlenmemiştir (Şekil 4.25).

4. 12. HPLC Deneyleri

Çalışmamızda zeytin meyve örneklerinin alındığı dönemlerde meyvelerden santrifüj yöntemi ile zeytinyağı elde edilmiş ve HPLC metodu ile tokoferol içerikleri belirlenmiştir. 7 ekim dönemine ait meyvelerden meyvelerin erken bir olgunlaşma aşamasında olmasından dolayı HPLC deneyleri için yeterli zeytinyağı elde edilememiştir. Dolayısı ile HPLC deneyleri yeterli miktarda yağ elde edilen sonraki 4 dönemde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.26. Zeytin meyvelerinin gelişimi boyunca tokoferol miktarlarında değişimler

Alfa tokoferol miktarları meyve gelişimi boyunca 21 Ekim örneklerinde 26.78 mg/100g, 4 Kasım örneklerinde 21.63, 18 Kasım örneklerinde 21.05, 2 Aralık örneklerinde ise 22.05 şeklinde ölçülmüştür. HPLC deneyleri sonuçları meyve gelişiminin ilk dönemlerinde tokoferol konsantrasyonunun en yüksek seviyede iken sonraki dönemlerde düşüş yaşadığını göstermiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tokoferoller antioksidan özellikleri sayesinde çeşitli stres koşullarında bitkilerde koruma görevleri olan moleküllerdir. Bitki dokularında üretilen tokoferoller ortaya çıkan soğuk, kuraklık, yüksek ışık ve tuzluluk gibi abiyotik streslerin etkilerini azaltmakta görevleri olduğu bilinmektedir (Abbasi ve ark., 2007). Benzer şekilde zeytin meyve ve diğer dokularında biriken tokoferollerin bitkinin karşı karşıya kalabileceği soğuk ve kuraklık koşullarında oluşan stresin etkisinin azaltılmasında görev almaktadır (Maeda ve ark., 2006).

Bu çalışma ile zeytin tokoferol biyosentezinde görev yapan genlerin yapıları ve gen anlatımları ortaya çıkarılmıştır. Buna göre tokoferol biyosentezinde görev alan beş genin zeytin meyvelerinde anlatıma uğramaktadır. Bu genlerden *OePDS1* geni için 1524 baz çifti uzunluğunda bir transcript dizisi elde edilmiştir. Bu transcript dizisi incelendiğinde 3' ve 5' UTR bölgeleri çıkarıldığında toplam 450 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır. Elde edilen diziler model bitki türlerine ait *PDS1* geni protein dizileri ile karşılaştırıldığında %80 - %70 aralığında benzerlik gösterdiği görülmüştür (EK 1). *OePDS1* geni ayrıca "Gloxylyase extradiol dioxygenase" BRP benzeri super ailesi korunmuş bölgesini içermektedir. Bu domain metalloproteinler olarak bilinen ve bir metal iyonunu kofaktör olarak kullanan proteinlerde bulunmaktadır (Waldron ve ark., 2009). *OePDS1* proteini bu özellikle uyumlu şekilde aynı zamanda bir demir bağlanma bölgesi içermektedir.

OeHPT1 geni ile yapılan RACE çalışmaları sonucunda 1043 baz çifti uzunluğunda bir transcript elde edilmiştir. Bu mRNA dizisi 297 amino asit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır. Elde edilen diziler model bitki türlerine ait *HPT1* geni protein dizileri ile karşılaştırıldığında %86 - %80 aralığında benzerlik gösterdiği görülmüştür (EK 2). *OeHPT1* geni bir prenyltransferaz domain bölgesi içermektedir. Bu korunmuş bölge E ve K vitaminlerinin ve klorofil biyosentezinde görev alan bir bazı proteinlerde bulunmaktadır. Bu proteinler çok değişken substrat gruplarına prenil grubu transfer etmektedirler (Yazaki ve ark., 2009).

Zeytin *OeVTE3* geni ile yapılan RACE çalışmaları ile 1250 baz çifti uzunluğunda bir transcript dizisi elde edilmiştir. Bu mRNA dizisi 330 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır. Elde edilen dizi model bitki türlerine ait *VTE3* geni ile karşılaştırılmış ve tüm

türlerde %89 - %80 aralığında benzerlik gösteriği görülmüştür (EK 3). OeVTE3 SAM (S-adenosyl methionine) bağımlı metiltransferaz ya da AdoMet metiltransferaz süper ailesine ait bir korunmuş bölge içermektedir. Bu proteinler S-adenosyl methionine molekülünü aracılığı ile substrat molekül metil grubu transfer ederler (Lushchak ve Semchuk, 2012).

Tokoferol siklaz geni ile yapılan çalışmalar sonucunda bu gene ait 1631 baz çifti uzunluğunda bir mRNA belirlenmiştir. Bu mRNA 515 amino asit uzunluğunda bir bölge kodlamaktadır. Elde edilen dizi model bitki türlerine ait *TCYC* geni ile karşılaştırılmış ve tüm türlerde %82 - %70 aralığında benzerlik gösterdiği görülmüştür (EK 4). OeTCYC proteini sadece tokoferol siklaz proteinlerinde bulunan bir korunmuş bölge içermektedir. Bu bölgeye sahip proteinler tokoferol ve tokotrienol biyosentezinde görev almaktadır (DellaPenna ve Pogson, 2006).

Zeytin gamma tokoferol metiltransferaz genine ait transkript 1277 baz çifti uzunluğundadır ve 367 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır. Elde edilen dizi model bitki türlerine ait *GTMT* geni ile karşılaştırılmış ve tüm türlerde %85 - %73 aralığında benzerlikler gösterdiği görülmüştür (EK 5). OeGTMT geni bir metiltransferaz korunmuş bölgesi içermektedir.

PDS1 genlerinin filogenetik analizi *PDS1* geninin bitki, hayvan, bakteri ve mantar alemlerinde var olduğu ortaya çıkarmıştır. Filogenetik analiz sonuçlarında yer almayan arkelerde de PDS geninin varlığı bildirilmiştir (Frick ve ark., 2014). PDS geninin bu yayılımı bu genin tüm canlılarda temel amino asit metabolizmasında görev almasından kaynaklanmaktadır. Bitkilerde amino asit metabolizmasının yanında plastokinon ve tokoferol biyosentezinde görev alırken (Norris ve ark., 1998; Tsegaye ve ark., 2002; Fritsche ve ark., 2014), insanlarda tirozin metabolizmasında görev alır ve bu gende oluşan mutasyonların tyrosinemia tip 3 hastalığına sebep olduğu bildirilmiştir (Tomoeda ve ark., 2000; Aarenstrup ve ark., 2002). Bakterilerde ise temel tirozin metabolizmasında ve bu yolla bazı pigmentlerin sentezinde görev alırlar (Yang ve ark., 2007).

HPT1, *VTE3*, *TCYC* ve *GTMT* protein dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda ilgili genlere *PDS1* geninin aksine sadece fotosentetik türlerde rastlanılmıştır. Bu genlere genine sadece bitki gruplarında rastlanmış olması ve tokoferollerin sadece bitkilerde üretilmesi ilgili genlerin tokoferol biyosentezindeki görevi ile uyumludur.

Çalışmada gerçekleştirilen gen anlatımı sonuçlarına göre OePDS1 geni anlatımı örnek alınan dönemlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim göstermemiştir. Bunun yanında OeHPT1, OeVTE3 ve OeGTMT genleri 7 Ekim örneklerinde en yüksek anlatım düzeylerini göstermiş ve sonraki dönemlerde düşüş göstererek 4 dönem boyunca anlamlı değişim göstermemiştir. OeTCYC geni ise 7 Ekimde en yüksek anlatım seviyesini göstermiştir. 21 Ekim ve 18 Kasım örnekleri, 7 Ekim örneklerine göre daha düşük anlatım seviyeleri gösterirken en düşük anlatım 4 Kasım ve 2 Aralık örneklerinde gerçekleşmiştir. 4 Kasım örnekleri ile 21 Ekim ve 18 Kasım örnekleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı değişimler görülse de, bu değişimler ~0.2-0.3 kat gibi düşük bir seviyede olmuştur.

Çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde tokoferol biyosentezinde görevleri olan ve biyosentez yolunda birbirinin ardından gelen OeHPT1, OeVTE3, OeTCYC ve OeGTMT genlerinin anlatımının erken dönemlerde daha yüksek olması bu artışın bu dönemlerde karşılaşılan çevresel stres ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Stres koşulları altında tokoferol profillerinin değişimleri birçok çalışmaya konu olmuştur. Buğday üzerinde doğal ortamında yüksek ışık ve sıcaklık stres şartlarında yetişen bitkilerde daha yüksek α tokoferol içeriği bildirilmiştir (Watts ve ark., 2014). Arpa türünde yapılan gen anlatımı çalışması oksidatif stres koşullarında *PDS1* geninin anlatımının arttığı bildirilmiştir (Falk ve ark., 2002). Bunun yanında bu sonuçlar tokoferol biyosentez yolunun meyve olgunlaşmasının erken aşamalarından itibaren aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca zeytinyağındaki tokoferol konsantrasyonları HPLC ile incelendiğinde benzer şekilde ilk dönemlerde konsantrasyonun daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum tokoferol biyosentezinin yağ birikiminin başladığı aşamalardan önce başladığı yönündeki anlatım çalışmalarını doğrulamaktadır. Meyve gelişiminin sonraki basamaklarında (21 Ekim döneminde) ise dokularda yağ birikimi arttıkça yağdaki tokoferol konsantrasyonları düşmüştür. Sonraki dönemlerde yağ birikimi devam ettikçe tokoferol konsantrasyonu sabit kalmıştır. Bu durum biyosentez yolunun 2 Aralık dönemine kadar aktif olduğunu düşündürmektedir. *GTMT* geni gama tokoferolü alfa tokoferole dönüştürme görevini yapmaktadır. Alfa ve gama tokoferol bitki dokularında meydana gelen stres koşullarında farklı görevler üstlenmektedir (Abbasi ve ark., 2007). Bitki dokularında biriken tokoferolün çoğunluğunu alfa tokoferol oluşturmaktadır (DellaPenna ve Pogson, 2006). *GTMT* geninin zeytin meyve gelişimi boyunca aktif olması, biyosentez yoluna has diğer genlerin benzer anlatım profilleri göstermesi ve HPLC ile belirlenen tokoferol konsantrasyonlarının da bu sonuçları

desteklemesi nedeniyle zeytin meyvelerinde de alfa tokoferolün baskın olduğunu düşündürmektedir. İleride zeytin dokularında bu iki tokoferol tipinin fonksiyonları hücrel ve genetik olarak belirlenmelidir.

Biyosentez yolunda ilk iki aşamayı oluşturan *PDS1* geni, tokoferol biyosentezinin yanında plastokinon biyosentez yolunda da görev almaktadır. Fotosentez gibi temel bir süreçte de görevi olan bu genin anlatımı meyve olgunlaşmasından etkilenmemekte, olgunlaşma boyunca yakın seviyelerde etkinliğine devam etmektedir. Bunun yanı sıra *HPT1* geni ile *A. thaliana* gibi model türlerde yapılan çalışmalarla bu genin tokoferol biyosentez süreci için kısıtlayıcı gen olduğu bildirilmiştir (Collakova ve DellaPenna, 2003). Bu gen *PDS1* geni gibi plastokinon biyosentez yolağında da görev almaktadır. *HPT1* geninin son üç dönemdeki anlatımı seviyelerindeki düşüş meyve dokularında azalan kloroplast miktarı ile ilişkili olabilir. *A. thaliana* türünde gerçekleştirilen bu işlevsel çalışmalarda RNAi interference teknolojileri ile gen susturma gerçekleştirilmiş olup, henüz bu teknikler zeytin için uygulanmamaktadır ve Bu nedenle ileride daha farklı teknikler zeytinde uygulanabildiğinde tokoferol miktarlarını kontrol eden genetik mekanizmalar anlaşılacaktır. Çalışmamızda ortaya çıkan transkript verileri ile bu çalışmalara temel hazırlamıştır.

Bu tez çalışması Ege bölgesinde yağlık bir çeşit olarak yaygın yetiştiriciliği yapılan Ayvalık çeşidi ile gerçekleştirilmiştir. Buna karşın elde edilen veriler tüm zeytin çeşitlerinde ilgili genlerin araştırılmasını, çeşitler arasında ilgili gen bölgelerinde polimorfizm ve SNP bölgelerinin ortaya çıkarılmasını, özellikle düşük tokoferol içeriğine sahip veya farklı alfa/gama tokoferol içeriklerine sahip çeşitlerin gen anlatımı verilerinin karşılaştırılması, düşük veya farklı tokoferol içeriklerine neden olan gen yapılarının belirlenmesine kaynak olabilecek bir çalışma olmuştur. Söz konusu çalışmaların da tamamlanması ile zeytin bitkisinde E vitamini içeriği yüksek çeşitlerin geliştirilmesi için ön veriler tamamlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aarenstrup L., Falch A.M., Jakobsen K.K., Neve S., Henriksen L.L., Tommerup N., Leffers H., Kristiansen K., 2002. Expression and Post-Translational Modification of Human 4-Hydroxy-Phenylpyruvate Dioxygenase. *Cell Biology International*, 26 (7): 615-625.
- Abbasi A.-R., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U., Voll L.M., 2007. Specific Roles of α - and γ -Tocopherol in Abiotic Stress Responses of Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, 143 (4): 1720-1738.
- Alagna F., D'Agostino N., Torchia L., Servili M., Rao R., Pietrella M., Giuliano G., Chiusano M., Baldoni L., Perrotta G., 2009. Comparative 454 Pyrosequencing of Transcripts from Two Olive Genotypes During Fruit Development. *BMC Genomics*, 10 (1): 399.
- Bergmüller E., Porfirova S., Dörmann P., 2003. Characterization of an Arabidopsis Mutant Deficient in Γ -Tocopherol Methyltransferase. *Plant Molecular Biology*, 52 (6): 1181-1190.
- Boscoboinik D., Szewczyk A., Azzi A., 1991. α -Tocopherol (Vitamin E) Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Protein Kinase C Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 286 (1): 264-269.
- Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A., 1991. Inhibition of Cell Proliferation by Alpha-Tocopherol. Role of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (10): 6188-6194.
- Burton G.W., Traber M.G., 1990. Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics, and Bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10: 357-382.
- Cheng Z., Sattler S., Maeda H., Sakuragi Y., Bryant D.A., DellaPenna D., 2003. Highly Divergent Methyltransferases Catalyze a Conserved Reaction in Tocopherol and Plastoquinone Synthesis in Cyanobacteria and Photosynthetic Eukaryotes. *The Plant Cell*, 15 (10): 2343-2356.
- Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., Rice P.M., 2010. The Sanger FASTQ File Format for Sequences with Quality Scores, and the Solexa/Illumina FASTQ Variants. *Nucleic Acids Research*, 38 (6): 1767-1771.
- Collakova E., DellaPenna D., 2003. Homogentisate Phytoltransferase Activity Is Limiting For Tocopherol Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131 (2): 632-642.

- DellaPenna D., Pogson B.J., 2006. Vitamin Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57 (1): 711-738.
- Donaire L., Pedrola L., de la Rosa R., Llave C., 2011. High-Throughput Sequencing of RNA Silencing-Associated Small Rnas in Olive (*Olea Europaea* L.). *Plos ONE*, 6 (11): e27916.
- Dorak M.T., 2006. *Real-Time PCR* (1th Ed.). Taylor & Francis, United Kingdom. 333 p.
- Dundar E., Suakar O., Unver T., Dagdelen A., 2013. Isolation and Expression Analysis of Cdnas That Are Associated with Alternate Bearing in *Olea Europaea* L. Cv. Ayvalik. *BMC Genomics*, 14 (1): 219-226.
- Ellouzi H., Hamed K.B., Cela J., Müller M., Abdelly C., Munné-Bosch S., 2013. Increased Sensitivity to Salt Stress in Tocopherol-Deficient Arabidopsis Mutants Growing in a Hydroponic System. *Plant Signaling & Behavior*, 8 (2): e23136.
- Emerson O.H., Emerson G.A., Evans H.M., 1936. The Isolation from Cottonseed Oil of an Alcohol Resembling Alpha Tocopherol from Wheat Germ Oil. *Science*, 83 (2157): 421-430.
- Evans H.M., 1925. Invariable Occurrence of Male Sterility with Dieteries Lacking Fat Soluble Vitamine E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11 (7): 373-377.
- Evans H.M., Bishop K.S., 1922. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*, 56 (1458): 650-651.
- Evans H.M., Burr G.O., 1925. The Anti-Sterility Vitamine Fat Soluble E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11 (6): 334-341.
- Falk J.O.N., Krauß N., Dähnhardt D., Krupinska K., 2002. The Senescence Associated Gene of Barley Encoding 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Is Expressed During Oxidative Stress. *Journal of Plant Physiology*, 159 (11): 1245-1253.
- Felsenstein J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39 (4): 783-791.
- Field A.P., 2007. *Analysis of Variance (ANOVA)*. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, CA. 33-36 p.
- Frick E., Spatzal T., Gerhardt S., Krämer A., Einsle O., Hüttel W., 2014. Structural and Functional Characterization of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from the Thermoacidophilic Archaeon *Picrophilus Torridus*. *Extremophiles*, 18 (4): 641-651.

- Fritsche S., Wang X., Nichelmann L., Suppanz I., Hadenfeldt S., Endrigkeit J., Meng J., Jung C., 2014. Genetic and Functional Analysis of Tocopherol Biosynthesis Pathway Genes from Rapeseed (*Brassica Napus* L.). *Plant Breeding*, 133 (4): 470-479.
- Galla G., Barcaccia G., Ramina A., Collani S., Alagna F., Baldoni L., Cultrera N., Martinelli F., Sebastiani L., Tonutti P., 2009. Computational Annotation of Genes Differentially Expressed Along Olive Fruit Development. *BMC Plant Biology*, 9 (1): 128.
- Garcia I., Rodgers M., Pepin R., Hsieh T.-F., Matringe M., 1999. Characterization and Subcellular Compartmentation of Recombinant 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from *Arabidopsis* in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, 119 (4): 1507-1516.
- Gaziano J., Glynn R.J., Christen W.G., et al., 2009. Vitamins E and C in The Prevention of Prostate and Total Cancer in Men: The Physicians; health study randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 301 (1): 52-62.
- Gündoğdu M.A., 2011. Bazı Yerli Ve Yabancı Zeytin Çeşitlerinin Fenolojik Ve Pomolojik Özellikleri İle Zeytinyağı Bileşenlerinin Aylık Değişimlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Herrmann K.M., Weaver L.M., 1999. The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50 (1): 473-503.
- Jha P., Flather M., Lonn E., Farkouh M., Yusuf S., 1995. The Antioxidant Vitamins and Cardiovascular Disease: A Critical Review of Epidemiologic and Clinical Trial Data. *Annals of Internal Medicine*, 123 (11): 860-872.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.-Å., 1996. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids*, 31 (7): 671-701.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., 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.

- Klein E.A., Thompson I.M Jr., Tangen C.M., Crowley J.J., Lucia M.S., Goodman P.J., Minasian L.M., Ford L.G., Parnes H.L., Gaziano J.M., Karp D.D., Lieber M.M., Walther P.J., Klotz L., Parsons J.K., Chin J.L., Darke A.K., Lippman S.M., Goodman G.E., Meyskens F.L. Jr., Baker L.H., 2011. Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (Select). *The Journal of the American Medical Association*, 306 (14): 1549-1556.
- Koch M., Lemke R., Heise K.P., Mock H.P., 2003. Characterization of Gamma-Tocopherol Methyltransferases from Capsicum Annuum L and Arabidopsis Thaliana. *European Journal of Biochemistry*, 270 (1): 84-92.
- Leyva-Perez Mde L., Valverde-Corredor A., Valderrama R., Jimenez-Ruiz J., Munoz-Merida A., Trelles O., Barroso J.B., Mercado-Blanco J., Luque F., 2015. Early and Delayed Long-Term Transcriptional Changes and Short-Term Transient Responses During Cold Acclimation in Olive Leaves. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 22 (1): 1-11.
- Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J., et al., 2009. Effect of selenium and vitamin e on risk of prostate cancer and other cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (Select). *The Journal of the American Medical Association*, 301 (1): 39-51.
- Liu Q., Lanari M.C., Schaefer D.M., 1995. A Review of Dietary Vitamin E Supplementation for Improvement of Beef Quality. *Journal of Animal Science*, 73 (10): 3131-3140.
- Lushchak V., Semchuk N., 2012. Tocopherol Biosynthesis: Chemistry, Regulation and Effects of Environmental Factors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 (5): 1607-1628.
- Maeda H., DellaPenna D., 2007. Tocopherol Functions in Photosynthetic Organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (3): 260-265.
- Maeda H., Song W., Sage T.L., DellaPenna D., 2006. Tocopherols Play A Crucial Role in Low-Temperature Adaptation and Phloem Loading in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 18 (10): 2710-2732.
- Martin J.L., McMillan F.M., 2002. SAM (Dependent) I AM: The S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase Fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12 (6): 783-793.
- Mellor H., Parker P.J., 1998. The Extended Protein Kinase C Superfamily. *Biochemical Journal*, 332 (2): 281-292.

- Miret J.A., Munné-Bosch S., 2015. Redox Signaling and Stress Tolerance in Plants: A Focus on Vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340 (1): 29-38.
- Morelló J.-R., Romero M.-P., Motilva M.-J., 2004. Effect of The Maturation Process of The Olive Fruit On The Phenolic Fraction of Drupes and Oils from Arbequina, Farga, and Morrut Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (19): 6002-6009.
- Munné-Bosch S., 2005. The Role of α -Tocopherol in Plant Stress Tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162 (7): 743-748.
- Munné-Bosch S., Alegre L., 2002. The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (1): 31-57.
- Muñoz-Mérida A., González-Plaza J.J., Cañada A., Blanco A.M., García-López M.d.C., Rodríguez J.M., Pedrola L., Sicardo M.D., Hernández M.L., De la Rosa R., Belaj A., Gil-Borja M., Luque F., Martínez-Rivas J.M., Pisano D.G., Trelles O., Valpuesta V., Beuzón C.R., 2013. De Novo Assembly and Functional Annotation of the Olive (*Olea europaea*) Transcriptome. *DNA Research*, 20 (1): 93-108.
- Norris S.R., Shen X., Della Penna D., 1998. Complementation of the Arabidopsis *pds1* Mutation with the Gene Encoding p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Plant Physiology*, 117 (4): 1317-1323.
- Ogata F., Tanaka Y., Kawasaki N., 2014. Effect of Tocopherol Treatment on Deterioration of Edible Oil Quality (Acid Value, Carbonyl Value, Free Fatty Acid and Radical Activity). *Journal of Oleo Science*, 63 (2): 187-191.
- Ozdemir Ozgenturk N., Oru F., Sezerman U., ukural A., Vural Korkut S., Toksoz F., Un C., 2010. Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea Europaea* L. *Comparative and Functional Genomics*, 2010: 757512- 757521.
- Packer L., Weber S.U., Rimbach G., 2001. Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. *The Journal of Nutrition*, 131 (2): 369S-373S.
- Porfirova S., Bergmuller E., Tropf S., Lemke R., Dormann P., 2002a. Isolation of an Arabidopsis Mutant Lacking Vitamin E and Identification of a Cyclase Essential for All Tocopherol Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 99 (19): 12495-12500.

- Porfirova S., Bergmüller E., Tropf S., Lemke R., Dörmann P., 2002b. Isolation of an Arabidopsis Mutant Lacking Vitamin E and Identification of a Cyclase Essential for All Tocopherol Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (19): 12495-12500.
- Pryor W.A., 2000. Vitamin E and Heart Disease: Basic Science to Clinical Intervention Trials. *Free Radical Biology & Medicine*, 28 (1): 141-164.
- Rimm E.B., Stampfer M.J., Ascherio A., Giovannucci E., Colditz G.A., Willett W.C., 1993. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *The New England Journal of Medicine*, 328 (20): 1450-1456.
- Saitou N., Nei M., 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- Sattler S.E., Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D., 2004. Vitamin E Is Essential For Seed Longevity and For Preventing Lipid Peroxidation During Germination. *The Plant Cell*, 16 (6): 1419-1432.
- Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X., 2003. Many Paths to Methyltransfer: A Chronicle of Convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (6): 329-335.
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A., 2007a. 3' End Cdna Amplification Using Classic RACE. *Nature Protocols*, 1 (6): 2742-2745.
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A., 2007b. 5' End Cdna Amplification Using Classic RACE. *Nature Protocols*, 1 (6): 2555-2562.
- Seker M., Kemal Gül M., Ipek M., Toplu C., Kaleci N., 2007. Screening and Comparing Tocopherols in the Rapeseed (*Brassica Napus L.*) and Olive (*Olea Europaea L.*) Varieties Using High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (6): 483-490.
- Sen C.K., Khanna S., Roy S., 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols. *Life Sciences*, 78 (18): 2088-2098.
- Sharma R., Vinayak M., 2012. Antioxidant A-Tocopherol Checks Lymphoma Promotion via Regulation of Expression of Protein Kinase C- α and C-Myc Genes and Glycolytic Metabolism. *Leukemia & Lymphoma*, 53 (6): 1203-1210.

- Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J., Palmer J.D., Wing R.A., dePamphilis C.W., Ma H., Carlson J.E., Altman N., Kim S., Wall P.K., Zuccolo A., Soltis P.S., 2008. The Amborella Genome: An Evolutionary Reference for Plant Biology. *Genome Biology*, 9 (3): 402.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.
- Tomoeda K., Awata H., Matsuura T., Matsuda I., Ploechl E., Milovac T., Boneh A., Scott C.R., Danks D.M., Endo F., 2000. Mutations In the 4-Hydroxyphenylpyruvic Acid Dioxygenase Gene Are Responsible For Tyrosinemia Type III and Hawkinsinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71 (3): 506-510.
- Tsegaye Y., Shintani D.K., DellaPenna D., 2002. Overexpression of the Enzyme P-Hydroxyphenolpyruvate Dioxygenase in Arabidopsis and Its Relation to Tocopherol Biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (11): 913-920.
- Tukey J.W., 1951. Tukey-HSD Test. *A Dictionary of Psychology*, Oxford University Press Oxford, United Kingdom. 9370 p.
- Venkatesh T.V., Karunanandaa B., Free D.L., Rottnek J.M., Baszis S.R., Valentin H.E., 2006. Identification and Characterization of an Arabidopsis Homogentisate Phytoltransferase Paralog. *Planta*, 223 (6): 1134-1144.
- Waldron K.J., Rutherford J.C., Ford D., Robinson N.J., 2009. Metalloproteins and Metal Sensing. *Nature*, 460 (7257): 823-830.
- Watts E.J., Shen Y., Lansky E.P., Nevo E., Bobe G., Traber M.G., 2014. High Environmental Stress Yields Greater Tocotrienol Content While Changing Vitamin E Profiles of Wild Emmer Wheat Seeds. *Journal of Medicinal Food*, 18 (2): 216-223.
- Yang C.S., Suh N., Kong A.N., 2012. Does Vitamin E Prevent or Promote Cancer? *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 5 (5): 701-705.
- Yang H., Wang L., Xie Z., Tian Y., Liu G., Tan H., 2007. The Tyrosine Degradation Gene Hppd Is Transcriptionally Activated By Hpda and Repressed By Hpdr In Streptomyces Coelicolor, While Hpda Is Negatively Autoregulated and Repressed By Hpdr. *Molecular Microbiology*, 65 (4): 1064-1077.

- Yanik H., Turktas M., Dundar E., Hernandez P., Dorado G., Unver T., 2013. Genome-Wide Identification of Alternate Bearing-Associated Micromnas (Mirnas) In Olive (*Olea Europaea* L.). *BMC Plant Biology*, 13: 10-32.
- Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., 2009. Prenylation of Aromatic Compounds, a Key Diversification of Plant Secondary Metabolites. *Phytochemistry*, 70 (15–16): 1739-1745.
- Zuccolo A., Bowers J.E., Estill J.C., Xiong Z., Luo M., Sebastian A., Goicoechea J.L., Collura K., Yu Y., Jiao Y., Duarte J., Tang H., Ayyampalayam S., Rounsley S., Kudrna D., Paterson A.H., Pires J.C., Chanderbali A., Soltis D.E., Chamala S., Barbazuk B., Soltis P.S., Albert V.A., Ma H., Mandoli D., Banks J., Carlson J.E., Tomkins J., dePamphilis C.W., Wing R.A., Leebens-Mack J., 2011. A Physical Map For The Amborella Trichopoda Genome Sheds Light On the Evolution of Angiosperm Genome Structure. *Genome Biology*, 12 (5): 48-64.

EKLER

EK 1. *OePDS1* ve model türelere ait *PDS1* dizilerinin ile karşılaştırılması

	1	10	20	30	40
Consensus	MSSSTLSLSSHLLSLN XXXXXXXXXX L XXXX X TLFXXTXXXX				
1. Vitis	MI TR VQKFLPFAG L TSVL K ISN L FHHHTSTPA				
2. Solanum					
3. Sesamum	MSSSTLSLSSHLLSLN AT TR HHHHHHHQHRRIR R IV TL PLKTKATM				
4. Populus					
5. <i>OePDS1</i>					
6. Nicotiana					
7. Medicago					
8. Glycine					
9. Arabidopsis	MCLSL A STA R NT C FRSRV L VL				
	50	60	70	80	90
Consensus	XXXXXXXXXX T MGKEAXSABX T A A XXX G F K LV G F K NFVR K NP X SD R				
1. Vitis	FA Q RA A FYGTEMGKASDSGAQV S NPAP G F K LV G F S N F L R I N P S D R				
2. Solanum	MGMGKETLSTTTT D ATGAT F KLV G F N F I RAN P R S D F				
3. Sesamum	G K E P I T TATASSPAGAAAESES A AHAE F KLV G F K N F I R I N P K S D H				
4. Populus	MGKEN T SE T PG G F K L C G F S F V R AN P R S D R				
5. <i>OePDS1</i>	TN S TYK T MG K F P TT S AN A T A S A T T G F KLV G Y N F V R AN P R S D F				
6. Nicotiana	MGK L ET V TT T S A AA A DD S Q E L T T N F K L V G F K N F I R I N P R S D F				
7. Medicago	MA I ET E T Q T Q T Q T G F K L V G F K N F V R AN P K S D R				
8. Glycine	M P I M C N E I Q A Q A Q A Q A Q P G F KLV G F K N F V R I N P K S D R				
9. Arabidopsis	A E L V K S M G H Q NA A V S EN Q N H D D G A ASS P G F KLV G F S K F V R K N P K S D K				
	100	110	120	130	140
Consensus	E S V K R F H H I E F W C G D A I N T A R R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N S V H A S Y				
1. Vitis	E S V K R F H H I E F W S T D A I N L A R R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N V I H A S Y				
2. Solanum	E S V K R F H H I E F W C G D A I N T S R R F S W S L G M P I V A K S D L S T G N S V H A S Y				
3. Sesamum	E P V H R F H V E F W C G D A I N T A K R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N S A H A S Y				
4. Populus	E K V N R F H H I E F W C I D A I N T A R R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N A T H A S Y				
5. <i>OePDS1</i>	E S V K R F H H V E F W C G D A I N T S K R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N S V H A S Y				
6. Nicotiana	E S V K R F H H I E F W C G D A I N T A R R F S W S L G M P I V A K S D L S T G N S V H A S Y				
7. Medicago	E N V K R F H H V E F W C I D A I N T A R R F S H L G M P I V A K S D L S T G N L T H A S Y				
8. Glycine	E D V N R F H H I E F W C I D A I N A S R R F S W G L G M P I V A K S D L S T G N Q I H A S Y				
9. Arabidopsis	E K V K R F H H I E F W C G D A I N V A R R F S W G L G M R F S A K S D L S T G N M V H A S Y				
	150	160	170	180	
Consensus	L I R - S G D I N E L E T A P Y S P S T - ----- S A P S T A S T P S F S X S T X R S E I				
1. Vitis	L I R - S G D I N E L E T A P Y S P S T - AGD L E N A A A T A S T P S F D H S A C H A F A				
2. Solanum	L I R S V S G D I N E V E T A P Y S P S T - ----- S V P S T A G T P S F S T S T H R D E I				
3. Sesamum	L I R - S G D I N E V E T A P Y S P S T - ----- S I S S S A A T P S F S F P V H R S E I				
4. Populus	L I R - S G D I N E L E T A P Y S P S T A S M D N L S H T A T A S T P T N H E T S R G F S				
5. <i>OePDS1</i>	L I R - A V N I Q E L E T A P Y S A C T - ----- S A P S S A T I P S F S A S T H H S E I				
6. Nicotiana	L I R P V S G S I Q E L E T A P Y S P S T - ----- S T P S S A A T P S F S T S T H R S E I				
7. Medicago	L I R - S G D I N E L S A A Y S P S T S L S --- S P S S T A A T P T S A S T C F S E S				
8. Glycine	L I R - S G D I S E L S A P Y S P S T S A G S - --- S A S S S A S T P S E D A A T C L A F A				
9. Arabidopsis	L I T - S G D I R E L E T A P Y S P S T S A G E - I K P T T A S T P S F D H G S C R S E F				

	190	200	210	220	230		
Consensus	ASHG	GVRAVATEV	DDAESAFSA	SVXRCAR	SSPPVXI-DNRVAXAD		
1. Vitis	ASHG	GVRAVATEV	DDAEGAFHT	SVAHGAR	MSPPVITM-GGSVVTSE		
2. Solanum	AKHG	GVRAVATEV	DNAYLAFSA	SVSRCAR	RFEPVITL-DEHVAVAE		
3. Sesamum	SSHG	GVRAVATOV	ESAFSA	SVSRCAR	ISPPITLS-DNKTAFAE		
4. Populus	AKHG	GVRAVATEV	DDAELAFIT	SVAHGAR	PSASPVITL-DNRVAVAE		
5. OePDS1	SHHG	GVRAVATEV	DDAFSA	SVSRCAR	VSPPVITL-SKNQAATAE		
6. Nicotiana	THHG	GVRAVATEV	DNAYTAFSA	SVSRCAR	MFEPVITL-DERVAFAE		
7. Medicago	ASHG	GVRAVATEV	DDAEVAFIT	SVNLGAR	TSPPVITL-ENNVKFAE		
8. Glycine	AKHG	GVRAVATEV	ADAEAFSA	SVAKGAR	PSASPVITL-DDRTGFAE		
9. Arabidopsis	SSHG	GVRAVATEV	DDAESAFST	SVANGAR	TSPPVITL-NEAVTFAE		
	240	250	260	270	280		
Consensus	VHLYGDV	WLRVVS	YKN-----	DDPSXW	FLPGFEA	XEESSFP	ELD
1. Vitis	VHLYGDA	WLRVVS	YKNPNNA-TSDPSSW	FLPGFEA	MD	DEGSSFP	-VD
2. Solanum	VHLYGDV	WLRVVS	YVK-----	DADCLI	FLPGFEA	MD	ETSSFP
3. Sesamum	VHLYGDS	WLRVVS	YCG-----	DDGTG	FLPGFEA	MD	NEMSYQ
4. Populus	VHLYGDV	WLRVVS	YGNSE--SDDSDPGSW	FLPKFEA	MD	FAASSFP	-LD
5. OePDS1	VHLYGDV	WLRVVS	YSNS-----	IETGPD	FLPGFEA	MD	NHEMSYQ
6. Nicotiana	VHLYGDV	WLRVVS	YLK-----	DADSLV	FLPGFEA	MD	BETASYK
7. Medicago	VHLYGDV	WLRVVS	YNDLNP---NQNPLF	FLPGFER	MD	SDSSNS	LD
8. Glycine	VHLYGDV	WLRVVS	YKDAAPQAPHADPSRW	FLPGFEA	MD	AAASSSFP	ELD
9. Arabidopsis	VHLYGDV	WLRVVS	YKA-----	EDTEKSE	FLPGFER	MD	DASSFP
	290	300	310	320			
Consensus	YGIRRLD	HAVGNVPEL	SPXVYKX	ETGFHEFAEFT	AEDVGTAESGL		
1. Vitis	EGLRRVDH	HAVGNVPEL	APVITLYKQ	ETGFHEFAEFT	AEDVGTSESGI		
2. Solanum	YGIRRLD	HAVGNVPEL	SPVVDYTKA	ETGFHEFAEFT	AEDVGTAESGL		
3. Sesamum	YGIRRLD	HAVGNVPEL	SPVVDYTKA	ETGFHEFAEFT	AEDVGTAESGL		
4. Populus	YGIRRLD	HAVGNVPEL	QAQVNVKQ	ETGFHEFAEFT	AEDVGTSESGI		
5. OePDS1	YGIRRLD	HAVGNVPEL	RPCVEYTKI	ETGFHEFAEFT	AEDVGTADSGI		
6. Nicotiana	YGIRRLD	HAVGNVPEL	SPVVDYTKR	ETGFHEFAEFT	AEDVGTAESGL		
7. Medicago	EGLRRVDH	HAVGNVPEL	SSAVKVKQ	ETGFHEFAEFT	AEDVGTSESGI		
8. Glycine	YGIRRLD	HAVGNVPEL	APAVRYTKG	ETGFHEFAEFT	AEDVGTSESGI		
9. Arabidopsis	YGIRRLD	HAVGNVPEL	SPALTYVAG	ETGFHEFAEFT	AEDVGTAESGL		
	330	340	350	360	370		
Consensus	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	CVOHTALM	
1. Vitis	NSVVLASN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEG	FCVOHTALM	
2. Solanum	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	CVOHTALM	
3. Sesamum	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGS	CVOHTALM	
4. Populus	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	GLOHTALM	
5. OePDS1	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	CVOHTALM	
6. Nicotiana	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	CVOHTALM	
7. Medicago	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	GLOHTALM	
8. Glycine	NSVVLANN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	CVOHTALM	
9. Arabidopsis	NSAVLASN	DETVL	LPNPEVY	GPKRKSQI	OTYLEHNEGA	GLOHTALM	

	380	390	400	410	420
Consensus	S EDIFRITLREMRKRS C VGGF F MPSP P PT Y YK N LK S R A CDVLT D EO T				
1. Vitis	S DDIFRITLREMR R RS C VGGF F MPSP P PT Y Y R N V K K R A CDVLT D DO T				
2. Solanum	I EDIFRITLREMRKRS C VGGF F MPSP P PT Y YK N LK S R A CDVLS D EO T				
3. Sesamum	S EDIFRITLREMRKRS C IGGF F MPSP P PT Y YK N LK S R A CDVLT D EO T				
4. Populus	S EDIFRITLREMRKRS A VGGF F MPSP P PT Y YK N LK S R A CDVLS D EO T				
5. OePDS1	S EDIFRITLREMRKRS C VGGF F S M SP P PT Y YK N LK S R A CDVLT D EO T				
6. Nicotiana	I EDIFRITLREMRKRS C VGGF F MPSP P PT Y YK N L K R A CDVLT D EO T				
7. Medicago	S ADIFRITLREMRKRS C VGGF F MPSP P V T Y R N L K R V S CDVLS D EO T				
8. Glycine	I EDIFRITLREMRKRS F IGGF F MPSP P PT Y Y A N L H N R A A D VLT V DO T				
9. Arabidopsis	S EDIFRITLREMRKRS S IGGF F MPSP P PT Y Y O N L K R V S CDVLS D DO T				
	430	440	450	460	470
Consensus	K ECE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M L K D E				
1. Vitis	K ECE E L G L I VDKDDOG T L L O L F T K P L G DR P T I F E I L O R I G C M V K D D				
2. Solanum	K ACE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M L K D E				
3. Sesamum	K CE E K L G L I V DRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M L K D E				
4. Populus	K CE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R V G C M L K D E				
5. OePDS1	K CE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M L K D E				
6. Nicotiana	K ACE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M L K D E				
7. Medicago	K CE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P I G DR P T I F E I L O R V G C M L K D E				
8. Glycine	K CE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P V G DR P T I F E I L O R I G C M V E D E				
9. Arabidopsis	K CE E L G L I VDRDDOG T L L O L F T K P L G DR P T I F E I L O R V G C M K D E				
	480	490	500	510	514
Consensus	E G K V Y O K G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L E A K R V X E X A A A *				
1. Vitis	E G K V S D K G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L S A K R I V D P A P V				
2. Solanum	N G O V Y O K G CGG F G K GN S E L F R S T E E Y E K V L E A X H V N O V A A A				
3. Sesamum	E G T L Y O K G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K V L E A X H V E T A A T				
4. Populus	K C K E Y O K G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L C A K I I A E T A S G				
5. OePDS1	D G N V E O K G CGG F G K GN S E L F K S T E E F E K V L E A K R V N E A A A A *				
6. Nicotiana	K G O V Y O K G CGG F G K GN S E L F R S T E E Y E K T L E A K O A N O V A A A				
7. Medicago	E C K E Y O K G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L E T R R T A				
8. Glycine	E C K V Y O K G A C GG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L E A K R T A				
9. Arabidopsis	E C K A Y O S G CGG F G K GN S E L F K S T E E Y E K T L E A K O L V G				

EK 2. *OeHPT1* ve model türelere ait *HPT1* dizilerinin ile karşılaştırılması

	1 10 20 30 40
Consensus	MESLIRGSEPRPSSPLSAE---XXXXSLKXSSXXVVRVLRCKAKX
1. Zea	MDALRLRPSLLSVRPGAARPRDHFLPPCCSI
2. Vitis	MDSMLIRGSEPRPCSSYVSSDDWRTVKFKLGHSPSSVVPVQISRNGA
3. Solanum	MESLIRGSEHPRPSIPVPAE-----FSPDKTSSHAIIVRVLKCKAKW
4. Sesamum	MESLIRVSEHPRPLSPLSVP-----STAQLCSSPSAHVLRCKAKFK
5. Populus	MESLIRPGSEPOLSSPLPSGGNYLGETKVKVGHSPREVQVYRCRARK
6. <i>OeHPT1</i>	
7. Nicotiana	MESLIRGSEORPSVPLAAE---FSPLKTSMHSSRTILRVLCKAKW
8. Medicago	MDSLIRAGSEPRK-SFSYSFTTGGNLWRKRCVNNYYSIPSSCASKA
9. Glycine	MDSMLLRSPFNINNASLATTGSYLPNAS
10. Arabidopsis	ME SL LLSS SS LVSAAGGFCWKKQNLKLSLSEIRVLRCDSSK
	50 60 70 80 90
Consensus	RRXKXSRXNLRQYGPXLHX-----EGITTYKKXNG KFTVKA--
1. Zea	QRNGEGRICFSSQRTQGP TLHHHQFFFEWKSSYCRISH RSIN TSV N
2. Vitis	GRSYTVSFQQLT HH VIRGIQ-----EGCTFYKRWNT KYV VNA--
3. Solanum	RPK K HYSSMKLQ Q YITQEHVGGSDLSTIAAD KK LKG RF LVHA--
4. Sesamum	NVERLCSVRLQ Q ONLRLQHVK----RSITLNP R HDL KY IVNS--
5. Populus	ILERQCVVRFQRHHS G FSVKK-----STI Y QENNA K FTVHA--
6. <i>OeHPT1</i>	
7. Nicotiana	RPGKHDTSMK LQ YMTQELVGGSYGSIIPTDR KL LKE RF LVHA--
8. Medicago	SRHK K IQNEYNT L FWQPSLNHYCKGA E GRSTY Q CNG K FVVKA--
9. Glycine	WHNR K IQKEYN F LFRWPSLNHHYKSIEGGCT CK CNI K FVVKA--
10. Arabidopsis	VVAK P -KFRNNLV R PDG Q -----SSLL Y PK H KS R FRVNA--
	100 110 120 130
Consensus	ASGQPLXSE-EAFDPKSXWXSVKNALDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
1. Zea	ASGQQLQSEPETHDSTIIWRATSSLDAFYRFSRPHTVIGTALSIV
2. Vitis	ASGQPLESEPGSSPKSTWPVKNALDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
3. Solanum	SSEHPL----ESQPSKSPWDSNDADAFYRFSRPHTVIGTALSITI
4. Sesamum	ASGHSL----ESEPPKIPWRSVQADADAFYRFSRPHTVIGTALSITI
5. Populus	ASGQPFESESGAYNPESTSKSVKNALDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
6. <i>OeHPT1</i>	LDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
7. Nicotiana	SSEHPL----ESQPSKSPWNSHDADAFYRFSRPHTVIGTALSITI
8. Medicago	APEQSESEHPAFDPKNILVVKNSLDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
9. Glycine	TSEKSFESEPQAFDPKSILDSVKNSLDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
10. Arabidopsis	TAGQP-----EAFDSNSKQRSFRDSLDAFYRFSRPHTVIGTALSITI
	140 150 160 170 180
Consensus	SVSLAVEKISDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
1. Zea	SVSLAVQSISDISPLEITIGLLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
2. Vitis	SVSLAVEKISDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
3. Solanum	SVSLAVEKFSDISPLETGVLEATVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
4. Sesamum	SVSLAVEKISDISPLETGVLEATGAALLMNTYIVGINOLSDVET
5. Populus	SVSLAVEKISDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
6. <i>OeHPT1</i>	SVSLAVENTSDISPLEIVTGVLEATAAALLMNTYIVGINOLSDVET
7. Nicotiana	SVSLAVEKFSDISPLETGMILOATVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
8. Medicago	SVSLAVEKISDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
9. Glycine	SVSLAVEKISDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET
10. Arabidopsis	SVSLAVEKVSDISPLETGVLEAVAAE-MNTYIVGINOLSDVET

	190	200	210	220	230
Consensus	DKVNKPYLPLASGEYSVA TCGX IVSSFAITLSEWLGWVGSWPLFWA				
1. Zea	DKVNKEITPLASGEYTPA TCVA IVSVFA MSF GLCA VGS QPLFWA				
2. Vitis	DKVNKPYLPLASGEYSV GC TCV GLVT SEAV MSEL VGWVGSWPLFWA				
3. Solanum	DKVNKPYLPLASGEYSV Q TCV IT IVSSFAITLSEWLGWVGSWPLFWA				
4. Sesamum	DKVNKPYLPLASGEYSVA TC K M IVSSFAITLSEWLGWVGSWPLFWA				
5. Populus	DKVNKPYLPLASGEYS IS TCV M IVT SES IMSEWLGWVGSWPLFWA				
6. OeHPT1	DKVNKPYLPLASGEYS VT TCV M IT SS FAMLS SL GWVGSWPLFWA				
7. Nicotiana	DKVNKPYLPLASGEYS LQ TCV IT IVSSFAITLSEWLGWVGSWPLFWA				
8. Medicago	DK IN KPYLPLASGEYS FA TC AT IV SS ITLSEWLGWVGSWPLFWA				
9. Glycine	DK IN KPYLPLASGEYS FE TCV IT IV ASE ITLSEWLGWVGSWPLFWA				
10. Arabidopsis	DKVNKPYLPLASGEYS VN TC IA IV ASE ITLSEWLGWVGSWPLFWA				
	240	250	260	270	
Consensus	LFTSFVLGTAYSINLPLLRWKRFAVVAAMCTLAVRAVIVOTAFY LH				
1. Zea	LFTSFVLGTAYSINL LY LRWKRFAVVAAL CT LAVRAVIVOLAF FLH				
2. Vitis	L EV SFVLGTAYSID L PLLRWKRFAVVAAMCTLAVRAVIVOTAF YMH				
3. Solanum	LFTSFVLGTAYSINLPLLRWKRFAVVAAMCTLAVRAVIVOTAF YLH				
4. Sesamum	LFTSF L GTAYSIN V PLLRWKRFAVVAAMCTLAVRAVIVOTAF YLH				
5. Populus	LFTSFVLGTAYSINLPLLRWKRFA F VAA CT LAVRAVIVOLAF YLH				
6. OeHPT1	LFTSFVLGTAYSINLPLLRWKRFA F VAA CT LAVRAVIVOTAF FLH				
7. Nicotiana	LFTSFVLGTAYSINLPLLRWKR PT VAA CT LAVRAVIVOTAF YLH				
8. Medicago	LFTSFVLGTAYSIN V PLLRWKRFAV L AAMCTL S VRAVIVOLAF FLH				
9. Glycine	L EV SFVLGTAYSIN V PLLRWKRFAV L AAMCTLAVRAVIVOLAF FLH				
10. Arabidopsis	L EV SFVLGTAYSINLPLLRWKRFAVVAAMCTLAVRAVIVOTAF YLH				
	280	290	300	310	320
Consensus	IQ TH VY CR PA V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
1. Zea	IQ TF V ER CP AV F SR EL LIFAT G EM TF FFSV W I AL FKD IP DI E GD R IF G				
2. Vitis	V Q TF V Y CR PA V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
3. Solanum	IQ TY VY CR AA V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI V GD K IF G				
4. Sesamum	V Q MY V Y CR PA V L IK EV I FATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI V GD K IF G				
5. Populus	V Q TF V Y CR EP V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
6. OeHPT1	IQ Q H V Y CR PA V L SK S V I F ATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI V GD K IF G				
7. Nicotiana	IQ TY VY CR PA V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI V GD K IF G				
8. Medicago	V Q TF V Y CR EP V SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
9. Glycine	IQ Q H V Y CR PP V SR S L I FATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
10. Arabidopsis	IQ Q H V ER CR PI L SR EL LIFATA F MS FF SV W I AL FKD IP DI E GD K IF G				
	330	340	350	360	
Consensus	I X S E V R LGOKR V EW I CT S L EM AY X V AT VG AT SS C J MSK Y X W I V I				
1. Zea	I RS F S V R LGOKR V EW I CV G L EM AY S V AT VG AT SS C L MSK T AT T A				
2. Vitis	I RS F S V R LGOKR V EW I CT L L EM AY GA V S VG AT SS C L MSK L V W I V I				
3. Solanum	IQ S F I V R LGOKR V EW I CT G L EM AY L V AT VG AA SS NT MS K Y F W I V I				
4. Sesamum	IQ S F I V R LGOKR V EW I CT A L EM AY A V AT VG AT SS C L MSK W T I V I				
5. Populus	I RS F I V R LGOKR V EW I CT S L EM TAY A V AT VG AA SS Y T MSK Y I V I				
6. OeHPT1	I RS F I V R LGOKR V EW I CT S L EM AY L V AT VG VT SS S L MSK W I V I				
7. Nicotiana	IQ S F I V R LGOKR V EW I CT S L EM AY L V AT VG AT SS NT MS K Y F W I V I				
8. Medicago	IQ S F S V R LGOKR V EW I CV T L EM TAY G V AT VG AT SS C L MSK I V I S I				
9. Glycine	IQ S F S V R LGOKR V EW I CV T L EM TAY G V AT VG AA SP C L MSK I V I G I				
10. Arabidopsis	I RS F S V I LGOKR V EW I CV T L Q MA Y A V AT VG AT S P F L MSK V I S W I				

	370	380	390	400	410
Consensus	CHAVL ¹ ASITLW ² XRA ³ KSVDLKS ⁴ KA ⁵ AIT ⁶ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
1. Zea	CHSIT ¹ AAITLW ² SCA ³ RSVDLIT ⁴ SKAA ⁵ IT ⁶ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
2. Vitis	CHAVL ¹ ASITLW ² TRAK ³ SIDLKSKAA ⁴ IT ⁵ SFYMETIWO ⁶ LFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
3. Solanum	CHSA ¹ ALITLW ² TRAK ³ SVDFSSKAA ⁴ IT ⁵ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
4. Sesamum	CHAVL ¹ CSITLW ² SRAK ³ SID ⁴ EKNKASVIT ⁵ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
5. Populus	CHGIT ¹ ASITLW ² NRA ³ KSVDLKS ⁴ KASIT ⁵ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
6. OeHPT1	CHIA ¹ ASITLW ² NRA ³ NSVDLKS ⁴ IT ⁵ AIT ⁶ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
7. Nicotiana	CHAA ¹ ALITLW ² TRAK ³ SID ⁴ FSRKA ⁵ AIT ⁶ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
8. Medicago	CHAVL ¹ ASITL ² FNHAK ³ SVDLKS ⁴ KASIT ⁵ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
9. Glycine	CHAVL ¹ ASITLW ² FHAK ³ SVDLKS ⁴ KASIT ⁵ SFYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ VR				
10. Arabidopsis	CHVI ¹ LAITLW ² ARA ³ KSVDLS ⁴ SKTE ⁵ LITS ⁶ QYMETIWKLFYA ⁷ EY ⁸ LL ⁹ PL ¹⁰ FLK				

	415
Consensus	*
1. Zea	
2. Vitis	
3. Solanum	
4. Sesamum	
5. Populus	
6. OeHPT1	*
7. Nicotiana	
8. Medicago	
9. Glycine	
10. Arabidopsis	

EK 3. *OeVTE3* ve model türelere ait *VTE3* dizilerinin ile karşılaştırılması

	1	10	20	30	40
Consensus	MASVMSLGAENLTLRGI--TPXCIGFLGSDXXGKHFPKLXX				
1. Vitis	MASVMSLGAESIKPIRAI--APSCIGSAGSDFPKRFSSQKGL				
2. Solanum	MASVMSLGSDFNFKLLSGI--SPSCSSFLGSEINIKCIPQKGF				
3. Sesamum	MASAMINGAENITLFRGIAPTPKCLGFLGSDLFHGKHFPKLTS				
4. Populus	MASVMSLGAENLTLRGI--TPKCLGFLGSDLQGRHFQKVNNA				
5. <i>OeVTE3</i>	GIAQTPNCLGFLGSDLFNGKHFPKLNS				
6. Medicago	MASVMSLGTGKLTFLNCKTQNGNCFGLSGLDFNGKSLISPKT				
7. Glycine	MASVMSLGTGKLTFLRLL--TGNCIGFLGSDLHGKHFPRVSF				
8. Brassica	MASVMSLGAITF-----PKCLGFLPASNIHARPSPLSL				
	50	60	70	80	
Consensus	VSXTRIXXXRTKX-----PKCSXSASREXSOPRFTQHKKEAF				
1. Vitis	VCYTRNPRTRTIA-----PKCSLSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
2. Solanum	VNLRATRTLRP-----TKCSLSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
3. Sesamum	VSCGRISARPGKNKTLI-TNCSLSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
4. Populus	VASTRISKARTLT-----PMCSLSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
5. <i>OeVTE3</i>	GSCVKLSST-YKRKILVSPNCSVSASRFSOPRFTQHKKEAF				
6. Medicago	SINAKIRVSNIKRNIVVRSSSSVSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
7. Glycine	VATTSKAVPNFRSLVV--PKCSVSASRFTSOPRFTQHKKEAF				
8. Brassica	VSNATRRRLSVATRCS--SSSVSSSRFVSOPRFTQHKKEAF				
	90	100	110	120	
Consensus	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADINBRNMTIVVD				
1. Vitis	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADITDRKMTIVVD				
2. Solanum	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPAETIHARNIQVVD				
3. Sesamum	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADINNRKMTIVVD				
4. Populus	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADISNRNMTIVVD				
5. <i>OeVTE3</i>	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPAETINNRNMTIVVD				
6. Medicago	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPAETIDRNMTIVVD				
7. Glycine	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADINDRNMTIVVD				
8. Brassica	WFYRELSIVVDHVINPQHWTEDMRDEALEPADISHPDMRVD				
	130	140	150	160	
Consensus	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKE				
1. Vitis	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKE				
2. Solanum	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKE				
3. Sesamum	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKKKEPIKE				
4. Populus	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKD				
5. <i>OeVTE3</i>	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKKKEPIKE				
6. Medicago	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKD				
7. Glycine	VGGGTGFTTTLGIVKHVDAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKE				
8. Brassica	VGGGTGFTTTLGIVKIVKAKNVTLLDOSPHOLAKAKOKEPIKE				
	170	180	190	200	210
Consensus	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTKEAYR				
1. Vitis	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTREAYR				
2. Solanum	CKLLEGDAEDLPEFTDFDRYVSAGSIEYWPDPORGTKEAYR				
3. Sesamum	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTREAYR				
4. Populus	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTKEAYR				
5. <i>OeVTE3</i>	CKLLEGDAEDLPEFTDCADRYVSAGSIEYWPDPORGTREAYR				
6. Medicago	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTKEAYR				
7. Glycine	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTKEAYR				
8. Brassica	CKLLEGDAEDLPEFTDYADRYVSAGSIEYWPDPORGTREAYR				

	220	230	240	250
Consensus	VIKLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFX			
1. Vitis	VILIGGVACTLIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFR			
2. Solanum	VILIGGVACTLIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFK			
3. Sesamum	VIRLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFT			
4. Populus	VIKLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFQ			
5. OeVTE3	VIRLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWTV			
6. Medicago	VIKLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWET			
7. Glycine	VIKLGKACILIGPVYPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFO			
8. Brassica	VIKLGKACILIGPVHPTFWLSRFFADVWMLFPKEEEEYTEWFK			
	260	270	280	290
Consensus	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
1. Vitis	KAGFKNVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGKPKFTGDSP			
2. Solanum	KAGFTQVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPYAGESP			
3. Sesamum	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
4. Populus	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
5. OeVTE3	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
6. Medicago	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
7. Glycine	KAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
8. Brassica	NAGFKDVQIKRTGPKWYRGVRRHGLTMGCSVTGVKPAASGDSP			
	300	310	320	330
Consensus	LOLGPKVEDVSKEV-NPEVEIIRREJLIGAMAATYYVIVPTIYMW			
1. Vitis	LOLGPKVEDVSKEV-NKEVEISRILIGATAGAYEVLVPTIYMW			
2. Solanum	LOLGPKVEDVSKEV-NPEVEIMRELLIGIMAASYYVIVPTIYMW			
3. Sesamum	LOLGPKAEDVSKEV-NREVEIARELLIGAMAATYYVIVPTIYMW			
4. Populus	LOLGPKAEDVTEPV-KPEVEIMRIILIGAMAATYYVIVPTIYMW			
5. OeVTE3	LOLGPKVEDVSEEV-NPEVEISRILIGAMAATYYVIVPTIYMW			
6. Medicago	LOLGPKVEDVEKEV-NPIVEIIRREALLIGILAASWYVIVPTIYMW			
7. Glycine	LOLGPKVEDVEKSV-NPEVEIIRRELLIGATAAATWEVIVPTIYMW			
8. Brassica	LOLGPKVEDVEKEV-NPESEIIRRELLIGTLLAAAWFVIVPTIYMW			
	340	349		
Consensus	IKDOIVPKGQPI*			
1. Vitis	IKDKIVPKGWPV			
2. Solanum	IKDOIVPKGQPI			
3. Sesamum	IKDOIVPKGQPI			
4. Populus	IKDOIVPKGRPI			
5. OeVTE3	IKDKIVPKGQPI*			
6. Medicago	IKDOIVPKDQPI			
7. Glycine	IKDOIVPKGQPI			
8. Brassica	IKDOIVPKDQPI			

EK 4. *OeTCYC* ve model türelere ait *TCYC* dizilerinin ile karşılaştırılması

	1 10 20 30 40
Consensus	MENIYXXXXXXXXXEXXYSXXXSSXXSXXSSSRXRRIXXX
1. Vitis	METNTYSIWRAPVFQHVDSYSHFRVSWNPR
2. Solanum	MESFYSVSAISPISKNVGFSRIRTEFATS
3. <i>OeTCYC</i>	TRIHREREREREYITHQSSLPQISSMERMCTIPQNP
4. Nicotiana	MENIYDFSTISSISIQPKNLGFSWTVITNSATSVTNGKILSLT
5. Medicago	METK
6. Glycine	MEAKLWESP
7. Arabidopsis	MEIRSLIVSMNPNS
	50 60 70 80
Consensus	XFNPPLPLXPPLXLQXXSSXXFAXNXVSXSDSSX----
1. Vitis	SIGSPC--RPLKLRRLRSSQIFALNSTSTSEGNR--SSAAE
2. Solanum	IANGELFLNLYSSTILKVQSQKSRHAFVVKADSSV--DT---
3. <i>OeTCYC</i>	YFCTPIPVGTAIRLQVSMSPHAFALKCVSKNSINFPVQKP
4. Nicotiana	KFKNLSTFPSTLKLQCCQSRHACVNAVAGADSSVE-----
5. Medicago	LLNPPFLLFHFSSVSSSSSTRTFPPFHNRSFKLI-----IAHN
6. Glycine	LLSPLPLLLPDLNLFHFPSSTRLLARSFFSDTVPI-----D
7. Arabidopsis	SFELSRVVSPLTRSLVPPRSTKLVPRSI SRVSASI-----S
	90 100 110 120
Consensus	X-TKZENRESVKPXYSPITPSNRPLRTPHSGYHFDGTPRKFFE
1. Vitis	S-GETESLGSVSPTIYVPTPSNRELRTPHSGYHFDGSPROFFE
2. Solanum	--TKKENREPVKPLYSSTPSNRPLRTPHSGYHFDGSTRKFFE
3. <i>OeTCYC</i>	VIDDDVTEAPSIKPITYEPTPSNRPLRTPHSGYHFDGTPRKFFE
4. Nicotiana	-MTKQENREAVKPVYSSITPSNRPLRTPHSGYHFDGSSRKFFE
5. Medicago	SHTEQQSSQSSKPIYSPTPPNRPLRTPHSGYHFDGTARKFFE
6. Glycine	NKEKEQLVT SVKPTYSPTPPNRPLRTPHSGYHFDGTPRKFFE
7. Arabidopsis	TPNSETDKISVKPVIYVPTPSNRELRTPHSGYHFDGTPRKFFE
	130 140 150 160
Consensus	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVENPAFRKKSIXLEEAQYGPREF
1. Vitis	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVENPAFQKKIGTFEEAQYGPREF
2. Solanum	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVESPSFTKKISSEEEAQYGPREF
3. <i>OeTCYC</i>	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVENPAFPKRINRLEEAQYGPREF
4. Nicotiana	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVENPAFPKISSEEEAQYGPREF
5. Medicago	GWYFKVSIPECKROSEFCFMYSVENPAFRKELSTLEEAQYGPREF
6. Glycine	GWYFKLSIPERROSEFCFMYSVESPSFKPTIPIEEAAYGSRF
7. Arabidopsis	GWYFRVSIPEKRESFCFMYSVENPAFRKSLSPLEVALYGPREF
	170 180 190 200 210
Consensus	TGVGAQILGADDKYICOYKESKFWGSRHEMLMGNTEVAQN
1. Vitis	TGVGAQILGADDKYICOFSEESTFWGSRHEMLMGNTEVGRK
2. Solanum	TGVGAQILGADDKYICOYSEESTFWGSRHEMLMGNTEVAQN
3. <i>OeTCYC</i>	TGVGAQILGADDKYICOYTESSEFWGSRNELMLGNTEVAQN
4. Nicotiana	TGVGAQILGADDKYICOYTESSEFWGSRHEMLMGNTEVAQN
5. Medicago	TGVGAQILGADDKYICOYTPESSFWGSRNELMLGNTEAAKQ
6. Glycine	TGVGAQILGADDKYICOFSESEFWGSRHEMLMGNTEMPNQ
7. Arabidopsis	TGVGAQILGADDKYICOYEQDSHFWGD RHELVLGNTESAQP

	220	230	240	250	
Consensus	NAKPPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRTDYV				
1. Vitis	DLRPPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRSNYV				
2. Solanum	SAKPPNKEVRPOEFNRHVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRTDYT				
3. OeTCYC	NMQALNNEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRTPYA				
4. Nicotiana	SARPPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRTDYT				
5. Medicago	NSKPPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRSDYV				
6. Glycine	NSKPPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRSNYV				
7. Arabidopsis	GAKAPNKEVPPPEEFNRVLEGGFOVTPLWHOGFIRDDGRTDYA				
	260	270	280	290	
Consensus	EIVKTARWEYSTRPKYGGWGDVGSKOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
1. Vitis	DIVKTARWEYSTRPTLYGWNVGSKOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
2. Solanum	EIVKTASWEYSTRPTLYGWDVNSKOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
3. OeTCYC	EIVKTARWEYSTRPTLYGWNVGSKOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
4. Nicotiana	EIVKTASWEYSTRPTLYGWDVNSKOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
5. Medicago	EIVKTARWEYSTRPVYGGWGDVGSOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
6. Glycine	EIVKTARWEYSTRPVYGGWGDVGSOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
7. Arabidopsis	EIVKSARWEYSTRPVYGGWGDVGAOKSTAGWFAAFPVFEPHW				
	300	310	320	330	
Consensus	QICMAGGLSTGWIEWDGERFEFQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
1. Vitis	QICMAGGLSTGWIEWDGERYEFQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
2. Solanum	QVCMAGGLSTGWIEWDGERFEFQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
3. OeTCYC	QICMAGGLSTGWIEWDGERFEFQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
4. Nicotiana	QICMAGGLSTGWIEWDGERYEFQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
5. Medicago	QICMAGGLSTGWIEWDGERIFEQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
6. Glycine	QICMAGGLSTGWIEWDGRIFEQNAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
7. Arabidopsis	QICMAGGLSTGWIEWGERIFEQDAPSYSEKNWGGKFFPRKWF				
	340	350	360	370	
Consensus	AVOCNVEEGASCEVALTAGGGIROLPGITPTFENAAITGTHY				
1. Vitis	AVOCNAVEEGADCEVSLTAAEGIRKIPGITPTFENAAITGVHY				
2. Solanum	AVOCSVEEGATCDVALTAGGGIRRLPGITPTFESVALITGTHY				
3. OeTCYC	AVOCNVEEGASCETALTVGGGIROLPGITPTFENAAITGTHY				
4. Nicotiana	AVOCSVEEGATCDVALTAGGGIROLPGITPTFENAAITGTHY				
5. Medicago	MAOCNVEEGASCETALTAAGGIROLPGITPTFENAAITGTHY				
6. Glycine	AVOCNVEEGASCETALTAAGGIROLPGITPTFENAAITGTHY				
7. Arabidopsis	AVOCNVEEGATCEVALTAGGGIROLPGITPTFENAAITGVHY				
	380	390	400	410	420
Consensus	GGIEYEFVPPWNGVVSWEIAPWGYNYLISAENEKIVVLEAANTE				
1. Vitis	DGIYEFVPPWNGVVSWEINQWGYNYLISAENESHVVELVATTK				
2. Solanum	GGIEYEFVPPWNASVSWETIPWGNHLSAENETIMVLEAANTE				
3. OeTCYC	GGIEYEFVPPWNGVNVWEIAPWGNLISAENEKIKVVELVATTK				
4. Nicotiana	GGIEYEFVPPWNASISWEIAQWGNHIFGENETIMVLEAANTE				
5. Medicago	GKIEYEFVPPWNGVVSWEIATWGYNFMVSAENGNVVELAANTE				
6. Glycine	GGIEYEFVPPWNGVNVWEIITWGYNFMVSAENGRVVELAANTE				
7. Arabidopsis	DKMIEYEFVPPWNGVVRWEMSPWGYNYLISAENENIVVLEBARIN				

	430	440	450	460
Consensus	DPGTTTRAPTKEA GLAPACKDTC EGD LKL OLWERR Y DGSKG K			
1. Vitis	DPGTTTRAPT TE EA GLAPACKDN CS GA L KL OLWKR TF NGSKG K			
2. Solanum	DPGTTTRAPT TE EM GLAPACRDTC EGE LR LOLWER K SNGSKG E			
3. OeTCYC	D V GTTTRAPT S EA GLSPACKDTC EAD S LR L WEK RY DGSE GK			
4. Nicotiana	DPGTTTRAPT D EM GLAPACRDTC ES D LR L WER K SNGSKG K			
5. Medicago	DPGTTTRAPT S EA GLSPACKDTC EG T L KL WERR Y DGSKG K			
6. Glycine	DPGTTTRAPT A EA GLAPACKDTC EGD LKL OMWERR Y DGSKG K			
7. Arabidopsis	EA CT PTTRAPT TE EV GLAT ACRD SC YGE LKL OLWER LY DGSKG K			

	470	480	490	500
Consensus	VLLD V TSNMA A LEVGGGPWF NT WKG K TS-T PE L JXX RA L K V PV			
1. Vitis	M LL D V TSNMA A VEVGGGPWF NT WKG K TA-A PE L V RL A L Q V PV			
2. Solanum	V LL D V TSNMA G LEVGGGPWF NT WEG K AE-M PE L V RA IN V PV			
3. OeTCYC	V LL D V TS S MA A VEVGGGPWF NT WKG K TY-T PE L T K R A L L Q V PV			
4. Nicotiana	V LL D V TSNMA G LEVGGGPWF NT WKG K AQ-M PE L V RA IN V PV			
5. Medicago	V LL D V TS D MA A LEVGGGPWF NT WKG K TS-T PE V L S R A I G L V PV			
6. Glycine	V LL D V SSNMA A LEVGGGPWF NT WKG K TS-T PA A L S R V L E L P T			
7. Arabidopsis	V LL E L K S SMA A VE I GGGPWF G TWKG D TS NT PE L L K O A L Q V P L			

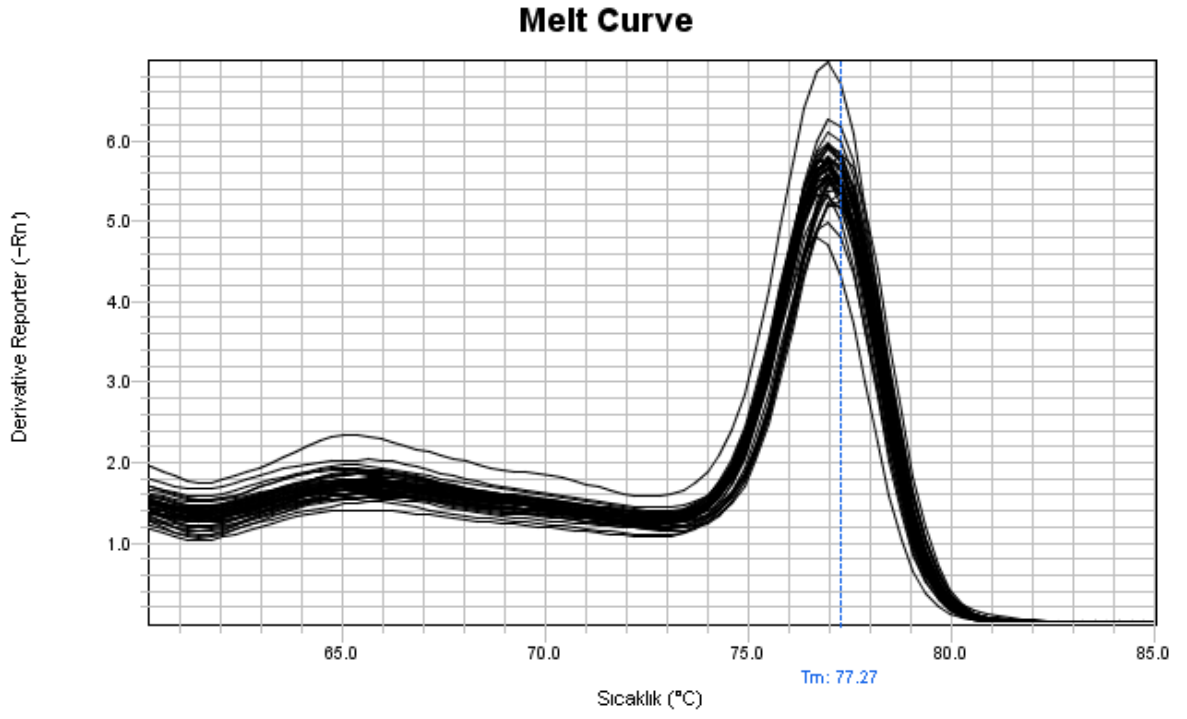
	510	520	523
Consensus	D X D G I E GL V P E -FF K PP G L*		
1. Vitis	D E D A I E GL A P E -FF K PP G L		
2. Solanum	D L D G I E SC V P S LL K PP G L		
3. OeTCYC	D V E G I V GL V P E -FL K PP G L*		
4. Nicotiana	D L D G I E GL T P E -FL K PP G L		
5. Medicago	D V D G I Y N L F P -LF K PP G L		
6. Glycine	D V E G I E N P V P -LF K PP G L		
7. Arabidopsis	D E E S AL G L V P E -FF K PP G L		

EK 5. *OeGTMT* ve model türelere ait *GTMT* dizilerinin ile karşılaştırılması

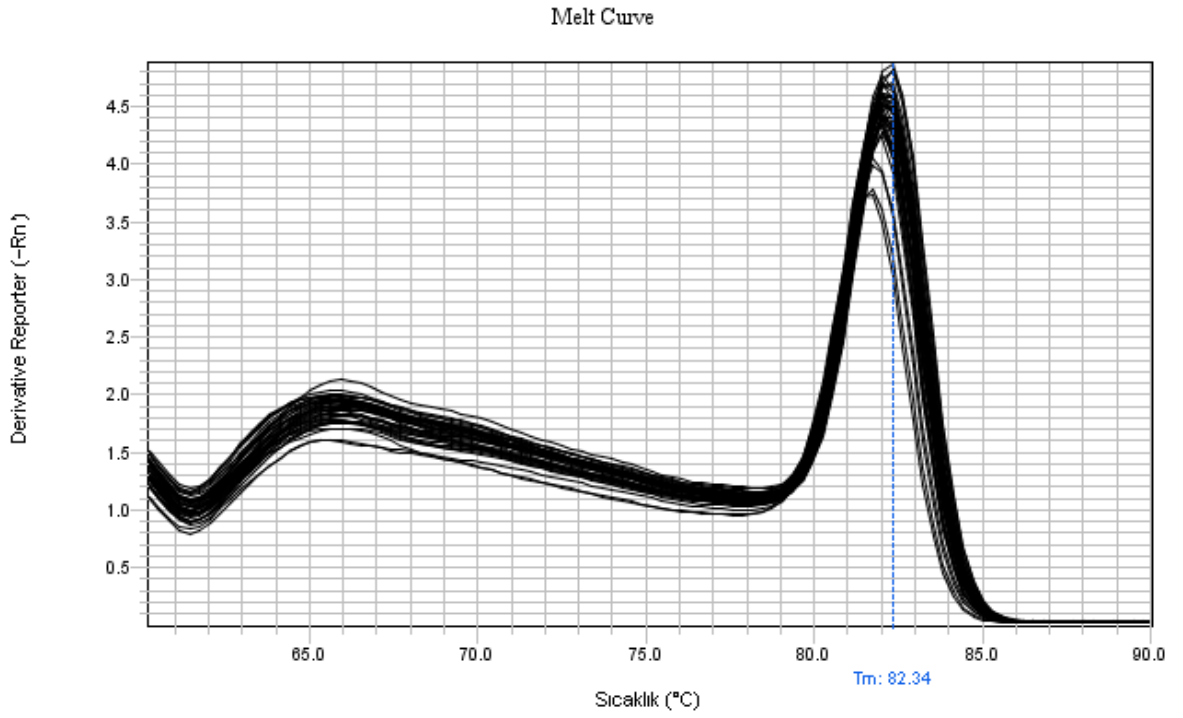
	1 10 20 30 40
Consensus	VGSC XXXXXXXXXXXXXXXXHAA XLSSS XI XL LPXJXS QRS PXX
1. Zea	MAHAA LLHCSQSSRS LAACRRGSHYR A P
2. Vitis	MAVIPASCKCHLLPLLQ PPQR LPS P
3. Solanum	MGSQCYSAYSIQGLN PTC PSSSSSVIF TLLKQI HRRRIIT
4. Sesamum	MRGGVAVCTTTCVYSRTHACSGGLLSF PR TN PI IASK PQ PLIG
5. Populus	MTSMLLSSTSQ TQIFHNIRAFQ PI PHL
6. <i>OeGTMT</i>	VGSC GVCS TCKSGSTLQWGPS LHTFISRQIGRSALVQIMN TTDSNR T
7. Glycine	
8. Brassica	MKATLAPS SLISLPRHKVSS LRS PS L
	50 60 70 80 90
Consensus	XHVSIRPRR P LXTXA XSGRG SXSTAXA XAA T E X L K K G I A B Y D E S S E J
1. Zea	SHV PRHSRR LRRAVVS LR PMA S S TAQA PA TA PPG L K E G T A B Y D E S S E J
2. Vitis	PHVWPRPAV TA P T S R R F A R L T A A A I S T M S P E D A S L K K G I A B Y D O S S E J
3. Solanum	CCNSSRRRRR M A S V A A M N A V S S S S V E V G I Q N Q Q E L K K G I A D Y D E S S E J
4. Sesamum	RNRSI PLF T P L R V S G S R G G R P R M M T M N V A A T D T L O K G I A B Y D E S S E V
5. Populus	H P Y R T T C L A P L P C R S R S I R C A G S T A V A D T G S T R E L K O G I A B Y D E S S A V
6. <i>OeGTMT</i>	KDIGIGKRRY L N I T A V S G D G E R M R P T V N A A A T E T L O K G I A B Y D E S S E J
7. Glycine	M S V E Q K A A G K E E E G K L O K G I A B Y D E S S E J
8. Brassica	LLQSQRPSA L M T T T T A S R G S V A V T A A A T S S F E A L R E G I A B Y N E T S E J
	100 110 120 130 140
Consensus	W E D I W G D H M H H G F Y E D D S S -- V S X S D H R A A Q I R M I E E X I R F A S M -- S E D
1. Zea	W E N I W G D H M H H G F Y E S S E A -- A S M A D H R A A Q I R M I E E A L A F A S M P A S D D
2. Vitis	W E D I W G D H M H H G F Y E D D S A -- A S D A D H R A A Q I R M I E E S L R F A S M -- S E E
3. Solanum	W E D I W G D H M H H G F Y E P K S S -- V E L S D H R A A Q I R M I E E A L S F A S L -- S E D
4. Sesamum	W E D I W G D H M H H G F Y E D G S D -- V S I S D H R A A Q I R M I E E S I R F A S L -- S D D
5. Populus	W E D I W G D H M H H G F Y E D E V V S G S D S D H R A A Q I R M I E E A L S F A S M -- S E D
6. <i>OeGTMT</i>	W E N V W V D H M H H G F Y E D D S S -- V S L T D H R S A Q I R M I E E A L S F A S L -- S D D
7. Glycine	W E N I W G D H M H H G F Y E D D S T -- V S V S D H R A A Q I R M I E E S I R F A S L -- L S E N
8. Brassica	W E D I W G D H M H H G F Y E D D S S V Q L S D S G H R E A Q I R M I E E S L R F A S M -- T E
	150 160 170 180 190
Consensus	E E K K P K X L V D V G C G I G G S S R Y L A K K Y G A K C Q S I T L S E V O A O R A N A L A A A
1. Zea	E E K T P K T L V D V G C G I G G S S R Y L A K K Y G A C C T S I T L S E V O A O R A N A L A A A
2. Vitis	G E R R P K R V D V G C G I G G S S R Y L A K K Y G A S C Q S I T L S E V O A O R A N O T L A A S
3. Solanum	E A K K E T S L V D V G C G I G G S S R Y L A K K Y G A T A K S I T L S E V O A O R A N A L A D A
4. Sesamum	S V Q K P R N L V D V G C G I G G S S R Y L A R K Y G A K C N S I T L S E V O A O R A N O E L A A A
5. Populus	E E K G P K T V D V G C G I G G S S R Y L A R K F G A K C Q S I T L S E V O A O R A N A L A E T
6. <i>OeGTMT</i>	E -- P R S L V D V G C G I G G S S R Y L A K K Y G A R C Q S I T L S E V O A O R A N A L A A A
7. Glycine	E S K W P K S L V D V G C G I G G S S R Y L A K K F G A T S V S I T L S E V O A O R A N S I L A A A
8. Brassica	E E K K I R R V D V G C G I G G S S R Y L A S K F G A E C I S I T L S E V O A O R A N D L A A A
	200 210 220 230 240
Consensus	Q G L A D K V S E O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K K F V E L A R V
1. Zea	Q E L S D O V T L O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K R F V S E L A R V
2. Vitis	Q S T A D K V S E O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K K F V S E L A R V
3. Solanum	Q E L G D K V S E O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P N K E F V S E L A R V
4. Sesamum	Q E L D G K V S E O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K T F V N E L A R V
5. Populus	Q E L A D K V S E O V A D A T E N O P F P D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K R F V S E L A R V
6. <i>OeGTMT</i>	Q E L D D K V S E O V A D A T E N O P F L D G Q F D L V W S M E S G E H M P D K T F V N E L A R V
7. Glycine	Q E L A D K V S E E V A D A T E K O P F P D G K F D L V W S M E S G E H M P D K K F V S E L A R V
8. Brassica	Q S L S H K V S E O V A D A T E N O P F P D G L F D L V W S M E S G E H M P D K A K F V K E L V R V

	250	260	270	280	290
Consensus	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
1. Zea	AA PGGT LLIVTWCHRNL DPS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS PSD				
2. Vitis	VA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKA LLD KICS AYYPWCS TTD				
3. Solanum	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
4. Sesamum	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKQ LK KIC DAYYLPWCS TAD				
5. Populus	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
6. OeGTMT	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
7. Glycine	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
8. Brassica	AA PGGT LLIVTWCHRRLS PS EESL KPEPKB LK KIC DAYYLPWCS TAD				
	300	310	320	330	340
Consensus	YVKLLLES SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIKSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
1. Zea	YVNLAKS SLEDIKAA DWS EY VAPFWPAVIKSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
2. Vitis	YVKLLLES SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIRSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
3. Solanum	YVKLLLES SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIKSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
4. Sesamum	YVKLLLES SLEDIKAA DWS EY VAPFWPAVIKSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
5. Populus	YVNLAKS SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIRSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
6. OeGTMT	YVKLLLES SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIKSA L TWKGI TS LLRSGWK T				
7. Glycine	YVKLLLES SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIRTA L TWKGI TS LLRSGWK T				
8. Brassica	YVNLAKS SLDIKAA DWS EY VAPFWPAVIRTA L TWKGI TS LLRSGWK T				
	350	360	370	375	
Consensus	IKGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
1. Zea	IRGAMV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
2. Vitis	IRGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
3. Solanum	IKGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
4. Sesamum	IRGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
5. Populus	IRGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
6. OeGTMT	IKGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
7. Glycine	IKGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				
8. Brassica	IKGALV PIMT EGYK KGLIKEA LITCRKPE S				

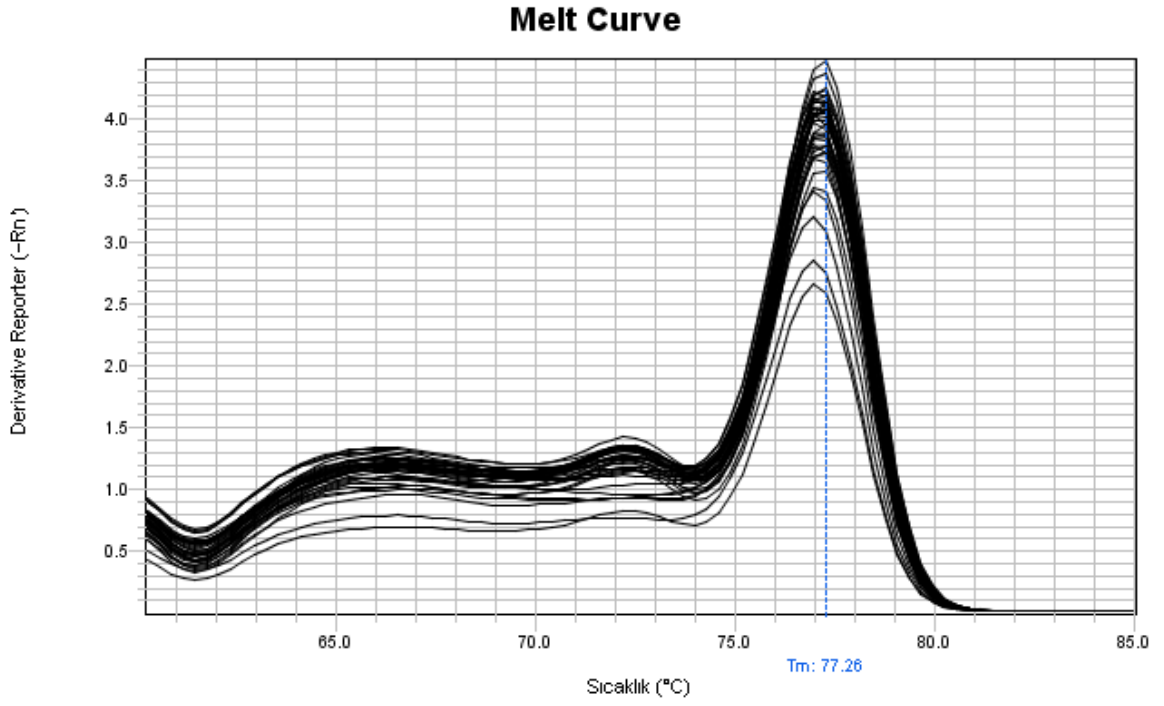
EK 6. GAPDH2 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



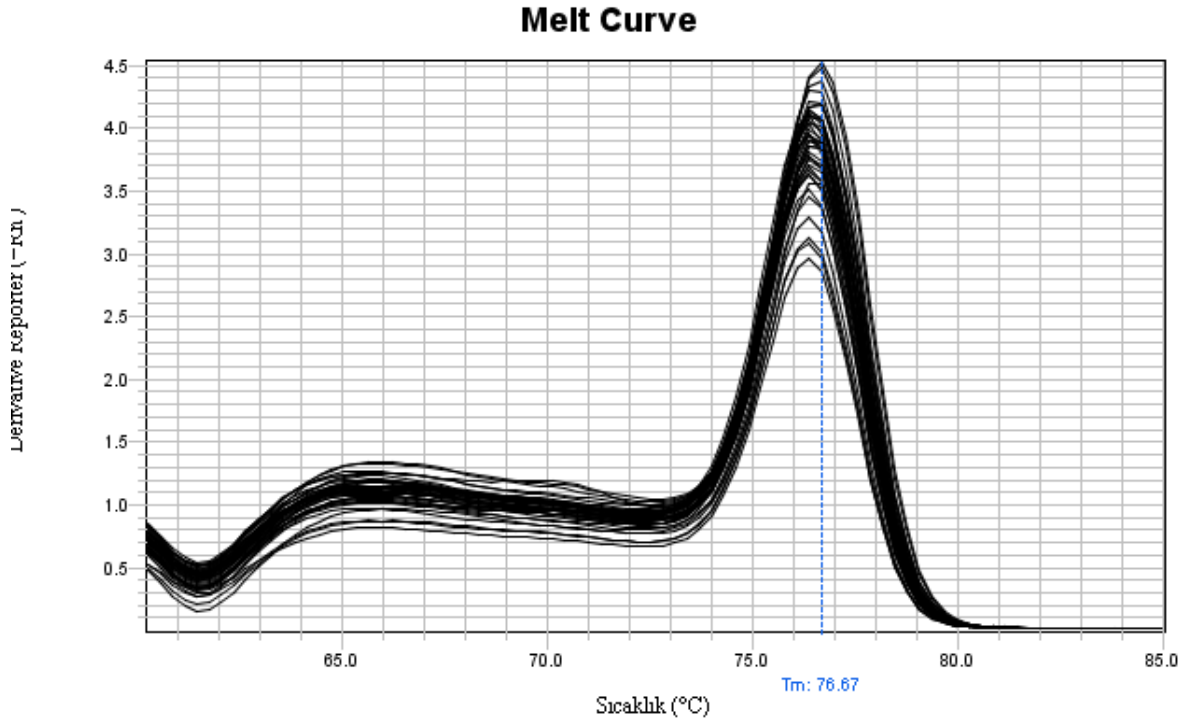
EK 7. PDS1 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



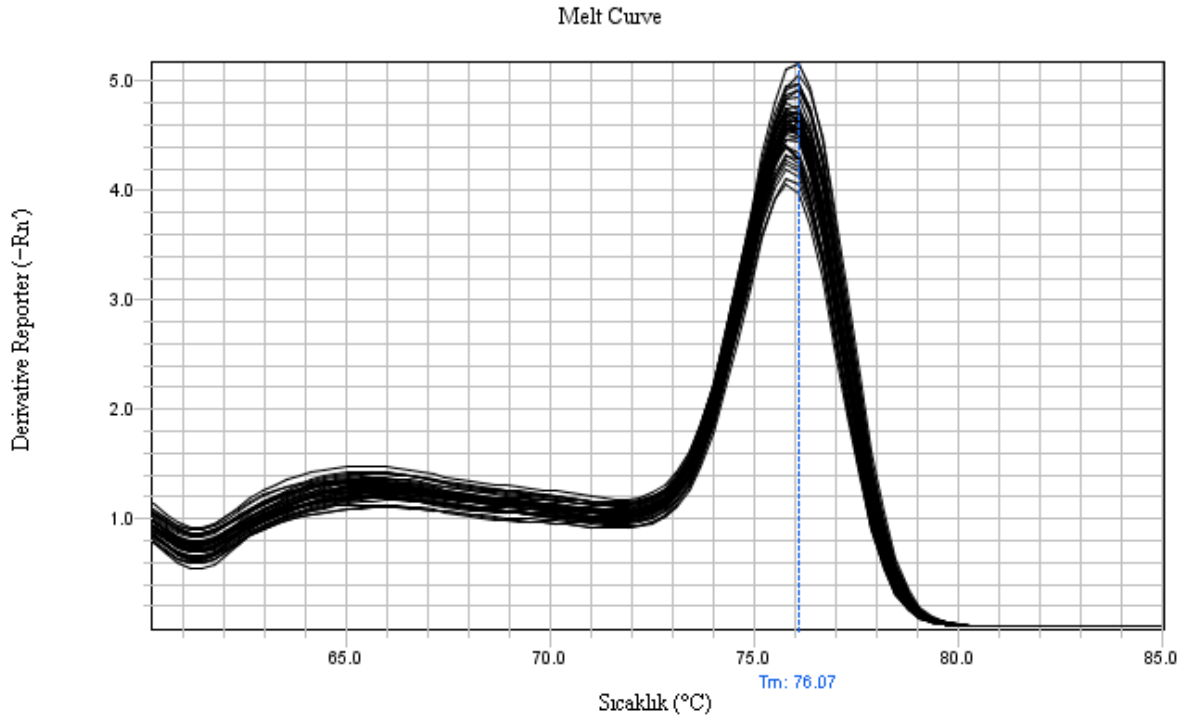
EK 8. HPT1 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



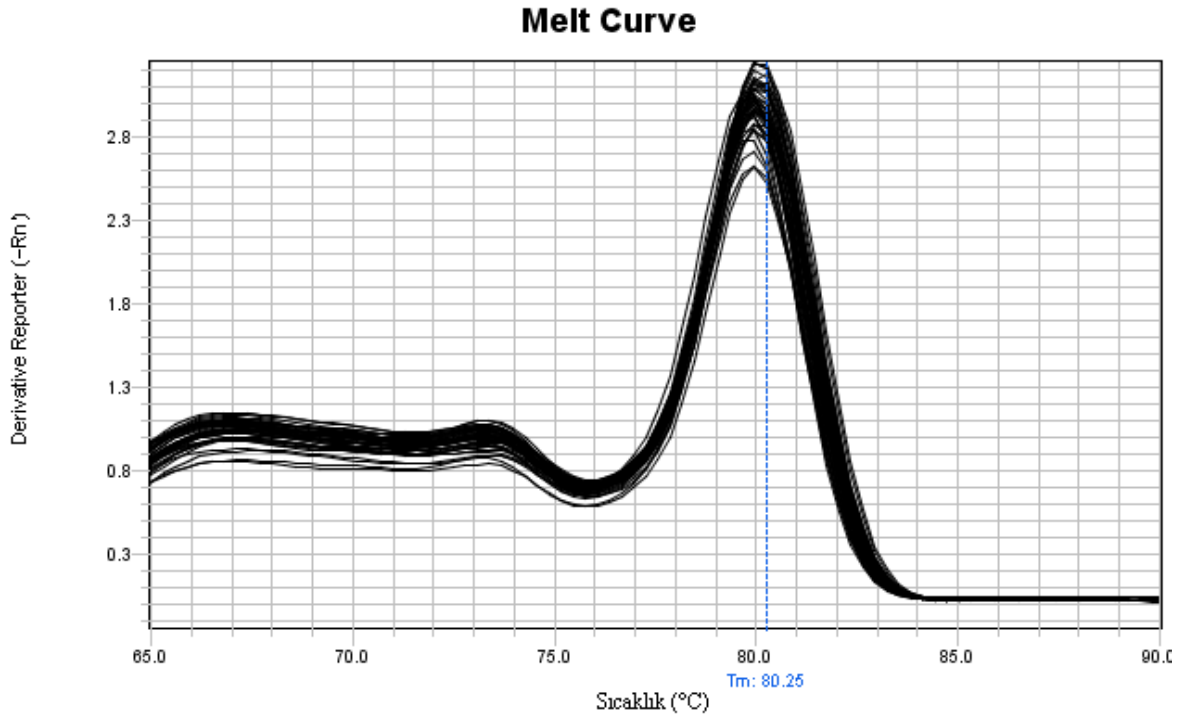
EK 9. VTE3 geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



EK 10. TCYC geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



EK 11. GTMT geni kantitatif PZR ürünlerinin melt curve analizi sonuçları



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Fatih SEZER

Doğum Yeri :Çanakkale

Doğum Tarihi : 19.03.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ç.O.M.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Ç.O.M.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Determination of the expression levels of DNA methyltransferase genes during a highly efficient regeneration system via shoot organogenesis in the diploid apomict *Boechera divaricarpa*. 2015. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)0167-685710.1007/s11240-014-0704-0

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Molecular characterisation of (*Olea europaea* L.) P-HYDROXYPHENYLPYRUVIC ACID DIOXYGENASE (HPPD/PDS1) gene. National Biology congress 2014
Eskişehir

Sezer F., Nişli G., K.M. Taşkın. Isolation and characterization of *DYAD* gene orthologs from *Boechera* species. European Frontiers of Plant Reproduction Research Final conference of the COST action FA0903 "Harnessing Plant Reproduction for Crop Improvement" Oslo, 2 – 4 October 2013.

Sezer F., Özbilen A., Güneş Ş., Özcan N., Türe D., Konuk E., Taşkın K.M. Identification of Flax (*Linum usitatissimum*) Conserved MicroRNA and Their Target Genes in EST Databases by Bioinformatics. 21st National Biology Congress (International

Participation), 3-7 September 2012. İzmir/TURKEY

Sezer F. and Taskin K. M. Bioinformatic Analysis of Plant MicroRNAs. 18. National Biology Student Congress, 4-9 July 2011. İstanbul/TURKEY

c) Katıldığı Projeler

Zeytin'de E Vitamini Biyosentez Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu (113O724)
TUBİTAK

Apomikt Boechera Türlerinde Polycomb Grup FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT
ENDOSPERM) Geninin Karakterizasyonu (2011/106) Ç.O.M.Ü BAP

Doğal Apomikt Boechera holboellii Türünde DYAD/SWITCH1 Geninin
karakterizasyonu (2009/105) Ç.O.M.Ü BAP

İLETİŞİM

E-posta Adresi : fsezerfatih @ gmail.com