ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Özhan ŞİMŞEK

TURUNÇGİLLERDE NÜSELLER EMBRİYONİ MEKANİZMASINDA ETKİN OLAN GENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TURUNÇGİLLERDE NÜSELLER EMBRİYONİ MEKANİZMASINDA ETKİN OLAN GENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Özhan ŞİMŞEK

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 26/02/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR	Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU	Prof. Dr. Selim ÇETİNER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

.....	.....
Prof. Dr. Sinan ETİ	Prof. Dr. Sedat SERÇE
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2012D9

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

TURUNÇGİLLERDE NÜSELLER EMBRİYONİ MEKANİZMASINDA ETKİN OLAN GENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Özhan ŞİMŞEK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2016, Sayfa: 157
Jüri : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Sinan ETİ
: Prof. Dr. Sedat SERÇE

Turunçgil ıslahçıları nüseller embriyoni özelliğinden dolayı bazı genotiplerin gerçek gücünü ve/veya özelliklerini melezleme sonucunda oluşan bireylere aktaramamaktadır. Öte yandan fidancılar için nüseller embriyoni özelliği, tohumdan direkt olarak klonal çoğaltım konusunda büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı turunçgillerde nüseller embriyoni mekanizması ile ilişkili genlerin belirlenmesidir. Çalışmada bitkisel materyal olarak %99 apomiktik tohumlar üreten 'Orlando tangelo' ve monoembriyonik bir çeşit olan 'Klemantin mandarini' kullanılmıştır. İlk olarak 'Orlando tangelo' genotipinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin hangi dönemde farklılaşmaya başladığı histolojik analizler ile belirlenmiştir. Histolojik analizler sonucunda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin antezisi takip eden üçüncü günde farklılaşmaya başladığı tespit edilmiştir. RNA-Seq analizleri Illumina HiSeq^{TM} 2000 ile gerçekleştirilmiş ve dizilerde kalite kontrol testleri yapılmıştır. Çalışmada referans genom olarak *Citrus clementina* kullanılmıştır. Daha sonra örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genler belirlenmiş ve bu genlere dayalı olarak gen ontolojisi (GO) analizleri gerçekleştirilmiştir. Orlando tangelo balon- Orlando tangelo 3. gün örneklerinde 2359 (1996 up regüle, 363 down regüle) ve Klemantin mandarini 3. gün-Orlando tangelo 3. gün örneklerinde ise 123 (1372 up regüle, 751 down regüle) farklı ifade olan gen (DEGs) belirlenmiştir. Bu veri seti, nüseller embriyoni mekanizması için turunçgil transkriptom değişiklikleri ile ilişkili değerli bilgiler sağlamış olup, poliembriyoni için önemli olan genlerin tanımlanması ve fonksiyonel analizleri için gelecekteki çalışmalara kılavuz olabilecektir.

Anahtar kelimeler: RNA-Seq, turunçgil, nüseller embriyoni, Illumina

ABSTRACT

PhD THESIS

INVESTIGATION OF GENES INVOLVED IN NUCELLAR EMBRYONY MECHANISMS BY MOLECULAR TECNIQUES IN CITRUS

Özhan ŞİMŞEK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTİCULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2016, Pages: 157
Jury : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Sinan ETİ
: Prof. Dr. Sedat SERÇE

True power and/or features of genotypes are not passed to individuals as a result of hybridization due to nucellar embryony by Citrus breeders. This situation for researchers working in citrus breeding studies can lead to loss of time and money being quite large. On the other hand, nucellar embryony mechanism provide a great advantage to clonal propagation from direclty seeds for nurserymen. The aim of the present thesis study is to determine differentially expressed genes involved in nucellar embryony mechanism. In this study used 'Orlando tangelo' producing 99% apomictic seeds and 'Clementine mandarin' known as monoembryonic as plant materials. First detected the period which the nucellar embryo initial cells began to develop in 'Orlando tangelo' by histological analysis. Nucellar embryo initial cells were first observed in third day after anthesis. RNA-Seq analysis were performed using by Illumina HiSeqTM 2000, called as raw reads, was subjected to quality control (QC). After QC, raw reads were filtered into clean reads aligned to the reference sequences. *Citrus clementine* full genome was used as reference genome. Then differentially expressed genes (DEGs) among samples was determined and based on these genes were carried out gene ontology (GO) analysis. It was identified 2359 differentially expressed genes (DEGs) (1996 up regulated, 363 down-regulated), 2123 (1372 up regulated, 751 down regulated), genes from the samples at Orlando tangelo balloon stage- Orlando tangelo third day and Clementine mandarin third day and Orlando tangelo third day, respectively. This dataset provides valuable information regarding citrus transcriptome changes for nucellar embryony mechanism and may help guide future identification and functional analysis of genes that are important for polyembrony.

Key words: RNA-Seq, citrus, nucellar embryony, Illumina

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi'nde yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden doktora çalışmamın tamamlanmasına kadar olan tüm süreçlerde, beni yönlendiren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, kişisel gelişimim için sayısız fedakârlık gösteren, doktora tez konusunun belirlenmesi, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi aşamalarında büyük yardımlarını gördüğüm ve kendisini bir ömür boyu örnek alacağım çok değerli bilim insanı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın her aşamasında değerli katkılarıyla beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Selim ÇETİNER'e çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca büyük destekleri olan ve tez çalışmamda da olumlu katkılarıyla beni motive eden ve yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince histolojik analizlerde çok büyük katkıları olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sinan ETİ'ye ve arkadaşım Arş. Gör. Şenay KARABIYIK'a müteşekkirim.

Doktora tezimi değerlendirme nezaketini gösterip, değerli katkılar sunan hocam sayın Prof. Dr. Sedat SERÇE'ye çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince arazi ve laboratuvarda desteklerini asla esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Melda BAYRAMOĞLU, Biyolog Dicle DÖNMEZ, Biyolog Fatma ASLAN, Biyolog Tolga İZGÜ ve emeği geçen diğer tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince benden desteklerini hiç esirgemeyen, büyük sabırlarıyla beni hayatım boyunca destekleyen Sevgili Ailem ve Nişanlım Seren SALAZ'a sonsuz teşekkürler…

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR. III
İÇINDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
2.1. Turunçgillerde Nüseller Embriyoni İle İlgili Yürütülen Çalışmalar 11
2.2. Turunçgillerde Yürütülen Gen Ekspresyonu Çalışmaları 17
2.2.1. Turunçgillerde Yürütülen RNA-Seq Çalışmaları 19
2.3. Diğer Bitkilerde Yürütülen RNA-Seq Çalışmaları ..... .25
3. MATERYAL VE METOD 37
3.1. Bitkisel Materyal 37
3.1.1. Fremont Mandarini (*C. clementina* Hort. ex Tan. X *C. reticulata* Blanco ..... .37
3.1.2. Klemantin Mandarini (*C. clementina* Hort. ex Tan). ..... .37
3.1.3. Orlando Tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macfad 38
3.2. Yöntem 38
3.2.1. Orlando Tangelo Çeşidinin Poliembriyoni Oranının Belirlenmesi 38
3.2.2. Melezleme Çalişmaları 39
3.2.3. Histolojik ve Moleküler Analizler İçin Örneklerin Alınması 41
3.2.4. Histolojik Analizler 42
3.2.4.1. Çiçek Tozu Çim Borusunun Uzamasının Belirlenmesi 42
3.2.4.1.(1). Ezme Preparat Hazırlanması 43
3.2.4.2. Nüseller Embriyo Başlangıç Hücrelerinin Belirlenmesi 43
3.2.4.2.(1). Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması 44

3.2.4.2.(2). Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması. 44
3.2.4.2.(3). Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanmas 45
3.2.4.2.(4). Örneklerin İncelenmesi 46
3.2.5. Moleküler Analizler 47
3.2.5.1. RNA İzolasyonu 47
3.2.5.1.(1). RNA İzolasyon Aşamaları 48
3.2.5.1.(2). RNA Kalite ve Miktarinin Belirlenmesi 49
3.2.5.2. RNA Sekanslama Analizleri 49
3.2.5.3. Sekansların Filtrelenmesi 51
3.2.5.4. Sekansların Referans Genomla Hizalanması 52
3.2.5.5. Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi 52
3.2.5.6. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Belirlenmesi 53
3.2.5.7. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Ontoloji (GO) Analizleri. 53
3.2.5.8. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Yolak Analizleri 53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 55
4.1. Orlando Tangelo Çeşidinin Poliembriyoni Oranının Belirlenmesi 55
4.2. Histolojik Analizler 58
4.2.1. Çiçek Tozu Çim Borusunun Uzamasının Belirlenmesi 58
4.2.2. Nüseller Embriyoların Başlangıç Hücrelerinin Gelişim Zamanlarının Belirlenmesi 59
4.3. Moleküler Analizler 63
4.3.1. RNA İzolasyonu 63
4.3.2. RNA Sekanslama Analizleri 65
4.3.2.1. Gen Ekspresyonu Analizleri 67
4.3.2.2. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Analizi 71
4.3.2.3. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Ontoloji (GO) Analizleri 74
4.3.2.4. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Yolak Analizleri 79

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 93
KAYNAKLAR 97
ÖZGEÇMİŞ 109
EKLER 110

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Dünya ve Türkiye turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı 2
Çizelge 3.1. Johansen karışımları 44
Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan RNA örneklerinin Nanodrop ile yapılan ölçümlerine ait sonuçlar..... 64
Çizelge 4.2. RNA-Seq analizleri sonucunda elde edilen temiz okuma, ayıklanan adaptör, bilinmeyen baz ve düşük kalitedeki okuma sayıları 66
Çizelge 4.3. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyon değerleri 68
Çizelge 4.4. Klemantin mandarini 3. gün ve Orlando tangelo 3. gün arasında istatistiki olarak önemli tespit edilen yolaklar..... 83
Çizelge 4.5. Zeatin biyosentezine katılan genlerden farklı seviyelerde ifade olanları ve fonksiyonları..... 85
Çizelge 4.6. Kumar ve ark. (2014)'nın nüseller poliembriyoni ile ilişkili olduğunu belirttiği genlerden tez çalışmasında tespit edilenleri 86
Çizelge 4.7. Nakano ve ark. (2012)'nın turunçgillerde poliembriyoni lokusu ile ilişkili olarak bildirdiği genlerden tez çalışmasında tespit edilenleri..... .88

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Türkiye toplam turunçgil üretiminin türlere göre dağılımını gösteren grafik. 3

Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan turunçgil genotiplerinin meyve görüntüleri. A. Fremont mandarini, B. Klemantin mandarini, C. Orlando tangelo 28

Şekil 3.2. Orlando tangeloda melezlemede seçilen çiçek boyutu 29

Şekil 3.3. Melezleme çalışmaları. A. Fremont mandarinine ait anterler. B ve C. Pens yardımıyla gerçekleştirilen emaskülasyon işlemi D. fırça yardımıyla çiçek tozlarının stigma üzerine aktarılması..... 40

Şekil 3.4. Orlando tangeloda melezlemeler sonrasındaki genel görünüm 41

Şekil 3.5. Orlando tangeloda histolojik analizlerde kullanılan antesis öncesine ait 3 farklı çiçek boyutu..... 42

Şekil 3.6. A. FPA 70 çözeltisinde bulunan örnekler B. Örneklerin yıkama setine alınması. C. Örneklerin yıkanması..... 43

Şekil 3.7. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen histolojik analiz aşamaları. A. Örneklere Johansen çözeltisi eklenmesi. B. Örneklerin havalarının alınması. C. Kesit alınması. D. Örneklerin alkol serilerinden geçirilmesi. E. Örneklerin boyama sıvısı içerisinde bekletilmesi. 46

Şekil 3.8. İncelemelerin gerçekleştirildiği floresan mikroskobu..... 47

Şekil 3.9. RNA-Seq Analizlerinde Kullanılan Cihaz 50

Şekil 3.10. RNA Sekanslama İşlemleri 51

Şekil 4.1. A. Orlando tangelo meyvesi ve tohumları, B. Orlando tangelo tohumunun poliembriyoni durumu..... 56

Şekil 4.2. A, B, C. Orlando tangelo meyvesine ait poliembriyonik tohumlar, D. Klemantin mandarini meyvesine ait monoembriyonik tohum 56

Şekil 4.3. Orlando tangelo ve Klemantin mandarininde çiçek tozu çim borusu uzama yüzdeleri..... 58

Şekil 4.4. Orlando tangelo (A) ve Klemantin mandarini (B) çeşitlerinde çiçek tozu çim borusu ilerlemesi 59
Şekil 4.5. Orlando tangeloda farklılaşmış nüseller embriyo hücreleri. A. Antezisten sonraki 3. gün, B. 4. gün, C. 5. Gün..... 61
Şekil 4.6. Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyalden izole edilen RNA'lara ait agaroz jel görüntüsü. M1: 1kb DNA Marker, 1: Orlando tangelo balon, 2: Orlando tangelo 1. gün, 3: Orlando tangelo 3. gün, 4: Orlando tangelo 5. gün, 5: Klemantin mandarini balon, 6: Klemantin mandarini 3. Gün..... 63
Şekil 4.7. Agilent Bioanalyzer ile yürütülen RNA Analiz Sonuçları. A. Orlando tangelo balon aşaması, B. Orlando tangelo 1.gün, C. Orlando tangelo 3. Gün, D. Orlando tangelo 5. Gün, E. Klemantin mandarini balon aşaması, F. Klemantin mandarini 3. Gün..... 65
Şekil 4.8. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyonu 68
Şekil 4.9. Örneklerin gen ifadeleri açısından kümelenmesini gösteren dendrogram..... 69
Şekil 4.10. Örnekler arasında ortak ve farklı ifade olan gen sayıları 70
Şekil 4.11. Örnekler arasında farklı ifade olan gen sayıları 72
Şekil 4.12. Örnekler arasındaki farklı ifade olan genlerin HeatMap görüntüsü. 1. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün, 2. Klemantin mandarini balon ve Orlando tangelo 3. gün, 3. Klemantin mandarini balon ve Orlando tangelo 3. gün. 73
Şekil 4.13. Örnekler arasındaki farklı ifade olan genlerin HeatMap görüntüsü. 1. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 5. gün, 2. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 1. gün, Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. Gün..... 74
Şekil 4.14. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması..... 75
Şekil 4.15. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini balon arasındaki gen ontoloji şeması..... 76

Şekil 4.16. Orlando tangelo 1. gün ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması..... 76
Şekil 4.17. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 5. gün arasındaki gen ontoloji şeması..... 77
Şekil 4.18. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması..... 77
Şekil 4.19. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar 79
Şekil 4.20. Klemantin mandarini ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar 80
Şekil 4.21. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 1. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar 80
Şekil 4.22. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 5. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar 81
Şekil 4.23. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar 81
Şekil 4.24. Zeatin biyosentezi yolağı 84

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
4CL	: 4-kumarat-CoA ligaz
A6PR	: Aldoz-6-fosfat redüktaz
ABC	: ATP-bağlayıcı kaset
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AGO	: Argonaute
ANS	: Anthocyanidin sentaz
BAC	: Bacterial artificial chromosome
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CHI	: Kalkon izomeraz
CHS	: Kalkon sentaz
cM	: Santimorgan
CTAB	: Sietiltrimetil amniyum bromid
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
DFR	: Dihidroflavonol 4-redüktaz
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen daimin tetra asedik asit
EST	: Expressed Sequence Tag
F3'H	: Flavanon 3'-hidroksilaz
F3H	: Flavanon-3-hidroksilaz
FAO	: Food and Agriculture Organization
FPA	: formaldehit propionik asit
FPKM	: Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped
g	: Gram
GO	: Gene Ontoloji
GST	: Glutathione S-transferase
HPLC	: high performance liquid chromatography

ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
ORF	: Open Reading Frame
PAL	: Fenilalanin amonyak-liyaz
PCR	: Polymerase chain reaction
PVP	: Polyvinilpirolidon
RAPD	: Randomly Amplified Polymporhism of DNA
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNAi	: RNA interference
SDS	: Sodyum doesil sulfat
SERK	: somatik embriyogenesis reseptör kinaz
SNP	: single nucleotide polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat
UFGT	: UDP glukoz: flavonol 3-Oglukosiltransferaz
µg	: Mikrogram

1. GİRİŞ

Turunçgiller dünyada yetiştiriciliği yapılan en önemli meyve gruplarından biridir. Turunçgil grubunun sahip olduğu tür ve çeşit zenginliği, meyvelerinin olgunlaşmasının uzun bir döneme yayılması ve olgunlaşan meyvelerin ağaç üzerinde bekletilebilmesi turunçgillerin önemini artırmaktadır.

Dünyada turunçgil üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarıküre'de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarıküre'de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya'da ekonomik olarak üretilmektedir (Karahocagil, 2003). Turunçgiller, portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limon (*Citrus limon* (L.) Burm. F), mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) ve altıntop (*Citrus paradisi* Macf.) gibi "*Citrus*" cinsine ait türleri içermektedir. Zengin bir C vitamini içeriğine sahip olan turunçgiller insan sağlığı için çok önemlidir. Taze olarak tüketiminin yanında meyve suyu, konsantre, reçel, marmelat olarak çeşitli ürünlere işlenebildiği gibi kabuklarından da esans elde edilmektedir (Güven, 2010).

Anavatanı Güneydoğu Asya olan turunçgiller günümüzde Dünya'da geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiştir. Bu anlamda turunçgiller içerisinde hızlı bir çeşit dinamiğinin var olması, farklı ıslah yöntemleriyle değişik iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilen anaç ve çeşitlerin elde edilmesinde önemli bir etken olmuştur. Tropik ve semitropik kökenli olan turunçgillerin sofralık olarak yetiştiriciliği daha çok subtropik bölgelerde yoğunlaşmış durumdadır. Akdeniz havzası içerisinde yer alan ülkemiz, kaliteli sofralık üretim bakımından uygun ekolojik koşullara sahiptir (Tuzcu, 1998). Turunçgiller genel olarak diploid (2n=2x=18) olarak bilinir ve 9 adet haploid kromozom taşırlar. Turunçgil cins ve türleri kendi aralarında melezlenebilmektedir. Doğal ve yapay melezlemeler ile turunçgillerde birçok çeşit geliştirilmiştir.

Dünya genelinde 100'den fazla ülkede turunçgil yetiştiriciliği yapılmaktadır. Başlıca turunçgil yetiştiricisi ülkeler Brezilya, ABD, Çin, İspanya, Meksika, Hindistan, İran, İtalya, Mısır, Arjantin, Türkiye, Japonya, Pakistan, Güney Afrika, Yunanistan, Tayland, Fas, İsrail, Endonezya, Kore ve Avustralya'dır.

Dünya turunçgil üretiminde ilk üç sırada Çin, Brezilya ve ABD yer almaktadır. 2013 yılı verilerine göre Türkiye 3.681.158 ton üretim değeri ile 9. sırada yer almaktadır. Dünya turunçgil üretiminin %57'sini portakal, %23'ünü mandarin, %11'ini limon, %4'ünü altıntop ve %5'ini diğer turunçgiller oluşturmaktadır. Türkiye dünya limon üretiminin %4.7'sini, mandarin üretiminin %3.23'ünü, altıntop üretiminin %2.82'sini, portakal üretiminin %2.43'ünü karşılamaktadır (FAO, 2016).

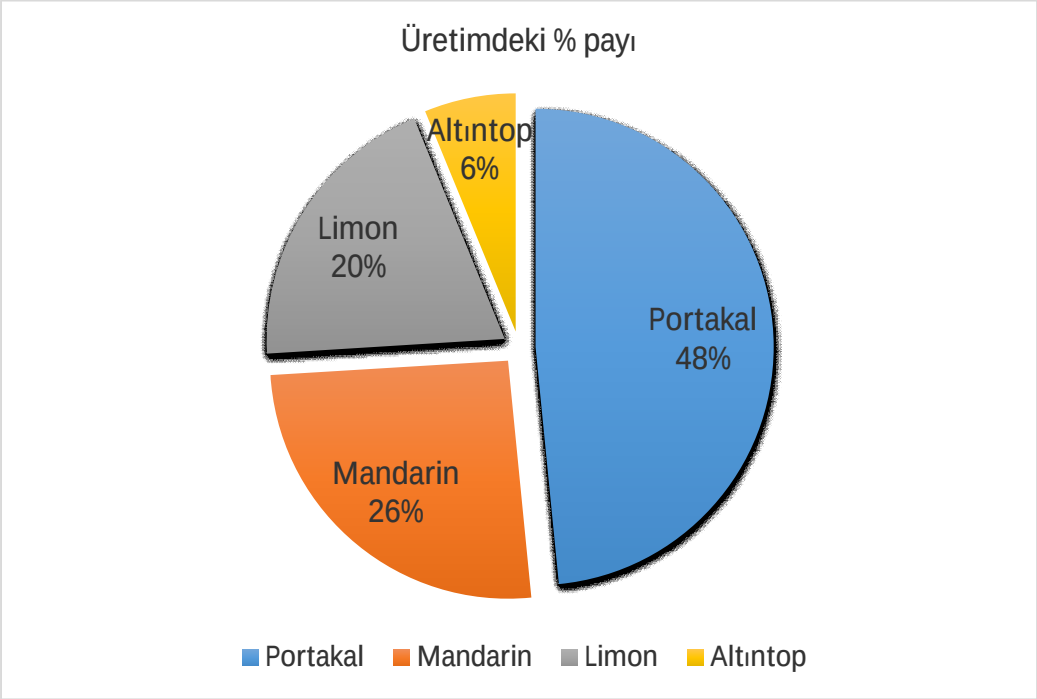
Turunçgil üretimi Dünya'da ve Türkiye'de yıllar bazında genel olarak artış eğilimi göstermiştir. 2013 yılı üretim değerlerine göre Dünya'daki toplam turunçgil üretimi 135.169.941 tondur (FAO, 2016). Dünya'da ve Türkiye'de yıllara göre toplam turunçgil üretim miktarları Çizelge 1.1'de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Dünya ve Türkiye turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı (FAO, 2016)

Yıllar	**Dünya (Ton)**	**Türkiye (Ton)**
2003	107.048.620	2.487.650
2004	114.005.972	2.707.500
2005	112.206.114	2.913.000
2006	118.402.061	3.220.439
2007	119.336.436	2.988.669
2008	126.446.293	3.026.940
2009	127.170.587	3.513.772
2010	128.373.876	3.572.376
2011	132.696.520	3.613.766
2012	131.412.876	3.524.528
2013	135.169.941	3.681.158

Ülkemiz coğrafi konumu, iklim koşulları ve toprak yapısı açısından turunçgil yetiştiriciliği için oldukça elverişlidir. Akdeniz ülkeleri arasında Ülkemiz turunçgil yetiştiriciliği ve ihracatı bakımından önemli bir potansiyele sahiptir. Yıllar bazında değerlendirildiğinde, Ülkemiz turunçgil üretiminde sürekli bir artış görülmektedir. Türkiye'nin toplam turunçgil üretimi 2013 yılı verilerine göre, 3.681.158 tondur.

Bunun 1.781.258 tonunu portakal, 942.226 tonunu mandarin, 726.283 tonunu limon, 228.799 tonunu altıntop ve 2.592 tonunu diğer turunçgiller oluşturmaktadır. Bu değerler ile Türkiye turunçgil üretiminin yaklaşık olarak % 48.3'ü portakal, % 25.5'i mandarin, % 19.7'si limon, % 6.2'si altıntop ve %0.1'i diğer turunçgil meyvelerinden oluşmaktadır (Şekil 1.1) (FAO, 2016).



Şekil 1.1. Türkiye toplam turunçgil üretiminin türlere göre dağılımını gösteren grafik.

Apomiksis, döllenme olmadan tohum oluşumunu ifade etmekte olup, tarımda çok önemli bir özellik olan bir sonraki kuşakta ana bireyin genetik özelliklerinin aynısının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Apomiktik bitkilerde döller, mayoz bölünme sırasında sporofitik veya gametofitik orijinli indirgenmemiş bir hücreden döllenme olmaksızın üretilmektedir (Spillane ve ark., 2001).

Sporofitik apomiksis embriyo kesesi dışındaki tohum taslağına ait dokularda gerçekleşmektedir. Embriyoların oluşum yerlerine göre nüseller embriyoni ve integümenter embriyoni olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Gametofitik apomiksiste ise indirgenmemiş hücrelerin önce bir megagametofit hücre oluşturması gerekmektedir.

Gametofitik apomiksis de yine kendi içinde diplospori ve apospori olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Maheshwari,1950).

Turunçgillerde, nüseller embriyoni tohum üretiminin daha çok olağan dışı bir özelliğidir. Nüseller embriyoni terimi, embriyonun etrafını saran nüsellus olarak adlandırılan maternal dokudan embriyoların gelişmesini ifade eder. Nüseller embriyoni bazı turunçgillerde görülen kalıtsal bir özelliktir. Poliembriyoni (bir tohum içinde birden fazla embriyo olması) nüseller embriyoni ile ilişkilidir. Çünkü poliembriyonik tohumların çimlenmesi sonucunda birden çok bitkinin bir tohumdan çıktığı gözlenmektedir. Nüseller embriyoni embriyo kesesini saran somatik nüsellus hücrelerinin birden fazla embriyo oluşturmasıdır. Nüseller embriyoni apomiktik çoğaltımın adventif bir formudur. Yani nüsellus dokusunun somatik hücrelerinin embriyonik bir gelişme göstermesidir. Nüseller embriyolar gelişmeye genellikle döllenmeden önce, yaklaşık olarak antezisten 10 gün önce başlamaktadır. Fakat bu durum genotiplere göre değişiklik gösterebilir. Çoğu tohum taslağı değişik sayılarda nüseller hücresi içermektedir. Bu hücreler bölünmeye ve gelişmeye başlarken büyüyen embriyo sayısında bir azalma meydana gelir. Daha sonraki aşamalarda ise embriyo kesesinde mikropilin ucuna doğru daha büyük embriyolar ilerler (Kepiro ve Roose, 2007).

Turunçgillerde nüseller embriyoni normal eşeyli üremeyi engellemez. Bu durum poliembriyoni gösteren turunçgil çeşitlerinin iki tip embriyo içeren tohumlara sahip meyveler üretmesi ile sonuçlanır. Bu tohumlardaki embriyolar;

1. Döllenme sonucu elde edilen embriyolardan “zigotik embriyo”
2. Genetik olarak anneyle aynı olan “nüseller embriyo”

Nüseller embriyoni gösteren birçok genotip ayrıca yüksek bir oranda çoklu embriyo oluşturmaktadır. Çünkü nüsellus dokusundaki hücrelerin çoğu embriyogenesisi başlatır ve birkaç embriyo olgunlaşabilir.

Nüseller embriyoniye sahip bir ağacın oluşturduğu her tohum çoklu olgun embriyolara sahip değildir. Bir genotipte nüseller embriyoni sonucunda elde edilen tohumlar bulunabilirken ayrıca normal eşeyli üreme de meydana gelebilir. Örneğin

daha önce literatürde bildirildiği gibi bir genotip farklı tiplerde tohum üretebilir. Bunlar;

1. Eşeyli üreme sonucu oluşan olgun bir embriyo içeren tohum
2. Bir olgun nüseller embriyo içeren tohum
3. Birden fazla olgun nüseller embriyo içeren tohum
4. Eşeyli üreme sonucu oluşan olgun bir embriyo ve bir ya da daha fazla olgun nüseller embriyo içeren tohum.

Tohumlar ayrıca anormal olarak gerçekleşen döllenmeler sonucunda bir takım olgunlaşmamış embriyolar da içerebilir. Bunun nedeni; 1) Döllenme sonucu oluşan zigotun olmaması nedeniyle nüsellus dokusundan embriyo gelişiminin olamaması 2) endosperm oluşumu için gerekli olan döllenmenin gerçekleşmemesidir. Nüseller embriyoların gelişimi endosperm gelişimi olmazsa, globular safhanın ileri aşamalarında durur. Döllenmelerin çoğu çift döllenme şeklinde olmaktadır. Bu döllenme endosperm gelişimi için polar çekirdeğin döllenmesi şeklinde olmaktadır. Nüseller embriyo ve zigotik embriyolar arasındaki rekabet zigottan gelişen genotipler dahil, olgunlaşmayı etkilemekte ve tohumlardaki olgun nüseller embriyolar, olgunlaşmamış zigotik ve nüseller embriyoların gelişmelerini olumsuz etkileyerek daha sonra çimlenmelerine engel olur.

Oluşan embriyo sayısı ve tipleri ağaçtan ağaca farklılık gösterdiği gibi aynı ağaç üzerinde de farklılık olabilir. Bu farklılıkların bazı minör genler, çevre koşulları ve polen kaynakları tarafından kontrol edildiği ileri sürülmektedir.

Turunçgillerin nüseller embriyolar oluşturabilme özellikleri sayesinde özellikle turunçgil anaçlarının tohumla çoğaltılması mümkün olmaktadır. Meyvelerden elde edilen tohumların çimlendirilmesi sonucunda elde edilen bitkiler ana materyalin aynısı olup, herhangi bir açılım meydana gelmemesinden dolayı turunçgil anaç üretiminde nüseller embriyoni özelliğinden faydalanılmaktadır. Nüseller embriyoni özelliğinin bu olumlu katkısı yanında özellikle çeşit ve anaç ıslahında yapılan melezlemeler sonucunda herhangi bir açılımın olmaması, ıslahçılar için olumsuz bir özellik olmaktadır. Melezlemeler sonucunda melez bireyler elde

edilememesi ıslahçıların melezlemerde kullanılan genotiplerin gerçek özelliklerini görmelerini engellemektedir. Turunçgillerde nüseller embriyo oluşum mekanizmasında rol oynayan genlerin belirlenmesi ile nüseller embriyoni özelliği taşıyan yeni bitkilerin elde edilmesi ve nüseller embriyoni özelliği gösteren genotiplerde bu genlerin susturulması mümkün olabilecektir (Kepiro ve Roose, 2007).

Bitki biyoteknoloji çalışmalarının son yıllarda hızlı bir ilerleme göstermesi ile diğer bitki gruplarında olduğu gibi turunçgillerde de birçok çalışma yürütülmüş ve biyoteknolojik çalışmalar halen hızla devam etmektedir. Geride bıraktığımız yüzyılda DNA'nın keşfi ve Moleküler Biyoloji biliminin hızla ilerlemesi ile ortaya çıkarılan birçok moleküler teknik sayesinde bitki moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları da hızla artmış ve ıslah programlarında uygulanmaya başlanmıştır. Moleküler markırların kullanım alanı olarak; bitki tür ve çeşitlerinin DNA parmak izlerinin belirlenmesi ile yapılan taksonomik çalışmalar, genetik haritalama çalışmaları, moleküler işaretleyiciler yardımıyla yapılan erken seleksiyon çalışmaları, Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) tanımlanması, mutasyonların belirlenmesi, varlığını bildiğimiz genlerin allelik çeşitliliğinin araştırılması, gen ifadelerinin belirlenmesi ve bunun gibi pek çok çalışma sayılabilir (Şimşek, 2009).

Gen ifadesi mRNA işleme veya gen transkripsiyonu yoluyla DNA'da depolanan bilgilerin yorumlanmasını sağlamaktadır. Gen ifadesinin belirlenmesinde farklı yöntemler (cDNA-AFLP, microarray, qPCR) bulunmaktadır. RNA-Seq tekniği, gen ifadesinin belirlenmesi amacıyla son dönemlerde geliştirilen ve yaygın olarak kullanılmaya başlanan yeni bir modern tekniktir.

Son yıllarda kullanımı hızlı bir şekilde artan yeni nesil dizileme teknolojilerinden önce daha eski ancak halen geçerliliği olan dizileme stratejileri uygulanmaktaydı. DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar ilk olarak 1960'lı yıllarda başlamıştır. 1977 yılında Allan Maxam-Walter Gilbert (Maxam ve Gilbert, 1977) ve Frederick Sanger (Sanger ve ark., 1977) tarafından geliştirilen iki farklı DNA dizi analizi yöntemi yaygın kullanım alanı bulmuştur. Enzimatik DNA sentezine dayanan ve günümüzde en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniği olan Sanger yönteminde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp

olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır (Klug ve Cummings, 2000). Sanger dizileme tekniği ile büyük ölçekli kompleks nükleik asitlerin dizilenmesi nükleik asitlerin parçalara ayrılarak vektörlere klonlanmasını gerektirir (Brautigam ve Gowik, 2010). Floresan temelli otomatik dizi analizi ise Smith ve ark. (1986) tarafından geliştirilmiştir.

Son yıllarda geliştirilen ve günümüzde kullanılan en önemli teknolojilerden biri olarak karşımıza çıkan yeni nesil DNA dizileme teknolojileri yüksek doğrulukla, yüksek hızlı olarak, dizleme yapabilme kapasiteleri sayesinde transkriptom analizi, ploidi seviyesinin belirlenmesi, moleküler markır geliştirme ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılabilmektedir (Dönmez ve ark., 2015).

Yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak gerçekleştirilen RNA-Seq tekniği, transkriptomların belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem kullanılarak yapılan çalışmalar, ökaryotik transkriptomlara bakışı değiştirmiştir. RNA-Seq yöntemi, diğer yöntemlere göre transkriptlerin izoformlarının seviyelerinin çok daha hassas ölçümünü sağlar. RNA sekanslama tekniği yüksek düzeyde DNA sekanslamayı, transkriptomların ileri analizini ve haritalamayı mümkün kılmaktadır. RNA sekanslama tekniği şu ana kadar ortaya atılan diğer bütün tekniklerden daha üst bir ökaryotik transkriptom analizi ortaya koymaktadır. Transkriptom, belirli bir gelişim aşaması ya da fizyolojik koşulda bir hücre içerisindeki transkriptlerin toplamı ve sayısı olarak ifade edilmektedir.

RNA-Seq tekniği son zamanlarda geliştirilen ileri düzey transkriptom analiz tekniğidir. Genel olarak toplam RNA fragmentlerine adaptör takılarak (tek veya çift) cDNA fragmentleri oluşturulmaktadır. Daha sonra her bir molekül amplifikasyonlu veya amplifikasyonsuz bir şekilde sekanslanmaktadır. Sekansların uzunluğu kullanılan teknolojiye göre 30-400 bç aralığında olabilmektedir (Wang ve ark., 2009).

RNA sekanslama diğer gen ifadesi teknikleri (Tilling microarray, cDNA veya EST sekanslama) ile karşılaştırıldığında önemli avantajlar sağlamaktadır. RNA sekanslama tekniğinin hibridizasyona dayalı yaklaşımların aksine transkripsiyon analizinde herhangi bir sınırı bulunmamaktadır. Bu durum model olmayan organizmaların transkriptom analizinde genom ön bilgisi olmadan ileri düzeyde bir analiz yapma fırsatı tanımaktadır. RNA sekanslama transkripsiyon sınırının lokasyonunu tam olarak bulunduğu yeri tek baz çözünürlüğü (ayırt edilebilirlik) ile belirleyebilmektedir. Bunun yanı sıra 30 bç'lik kısa okumalar iki ekzonun nasıl birleştiği ile ilgili bilgi verirken; daha uzun okumalar çok sayıda ekzonun nasıl birleşebileceğini ortaya çıkarmaktadır. Bu faktörler RNA-sekanslama tekniğini kompleks transkriptom çalışmalarında oldukça kullanışlı kılmaktadır. Ek olarak RNA sekanslama transkripsiyona uğramış bölgelerde bulunan SNP gibi baz varyasyonlarını ortaya çıkmasını sağlamaktadır. RNA sekanslama qPCR (quantitive PCR) ile karşılaştırıldığında yüksek oranda bir doğrulukla gen ekspresiyon seviyesini tespit edebilmektedir. Ayrıca RNA sekanslama yüksek tekrar edilebilirlik kapasitesine sahiptir.

RNA dizileme için kullanılan yeni nesil dizileme teknolojileri ticari olarak Illumina, Roche 454, Helicos BioSciences ve Life Technologies olmak üzere 4 firma tarafından ulaşılabilir durumdadır ve yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Illumina teknolojisinde meydana gelen sekanslama ve enzimatik olayların tamamı bir akış hücresinde meydana gelmektedir. Illumina platformları köprü amplifikasyonunu kullanarak senteze dayalı sekanslama prensibine göre çalışmaktadır.

Parçalanabilir ve tekrar birbirinden ayrılabilir forward ve reverse oligonükleotidler adaptörlere uygun şekilde amplifikasyon süresince kullanılır. Bu oligonükleotidler Illumina platformunun yüzeyine yapışık ve yerleşik olarak kullanılır. Illumina hücrelerine kütüphane yüklemenin ilk aşaması, dsDNA (çift zincirli) denatürasyonudur. Bu aşamada dsDNA ssDNA'ya (tek zincirli) dönüşür. Bu tek zincirli DNA'lar Illumina hücreleri üzerine yerleşik olarak bulunan oligonükletidlerle hibridize olur. Bu aşamada oligonükleotidler primer olarak kullanılarak tek zincirli DNA çift zincirli DNA'ya çevrilir. Bu aşamadan sonra başlangıç kütüphane molekülleri kaldırılır ve kopyalanmaz. Geriye kalan ve

hücrelerdeki oligonükletidlere bağlı olarak bulunan fragmentler identik kopyalar üretmek için kullanılır. Bu kopyalara cluster (küme) adı verilir. Bu olay denatürasyona, bağlanma ve uzamaya aracılık eden üç spesifik tampon çözeltinin döngüsel değişimi ile yapılır. Bu aşamalar 60 °C sıcaklıkta gerçekleşir. Her döngü sonrasında oluşan fragmentler 3’ ile biter ve bir başka yüzeye bağlı olignükleotid ile köprü oluşturur. Son aşamada oligonükleotidlerin dış yüzeyinde bulunan ayrılabilir bölge kullanılarak çift zincirli DNA’nın bir zinciri alınmaktadır. Daha sonra 3’ ile biten sıralar ddNTP kullanılarak bloke edilmektedir. Bloke edilen sıralar yeni bir döngünün başlamasını engelleyerek aynı fragmentlerin belirli bir orandan sonra sürekli üretilmesini engellemektedir (Buermans ve Dunnen, 2014).

Fragmentlerin amplifikasyonu floresan boyalarla etiketlenmiş dNTP’ler ile gerçekleşmektedir. Floresan etiketli dNTP’ler uzama sırasında uygun komplamenter baz karşılığına denk gelecek şekilde yerleşir ve floresan ışıma yapar ve bu ışımalar görüntülenir. Her dNTP (A, T, G, C) kendine özgü bir terminatör floresan ışıma yapar böylece hatalı okumalar en aza indirgenir. Illumina teknolojisinde her döngü yaklaşık bir saat sürer. Bir saatlik döngünün uzun bir kısmını görüntüleme kısa bir süresini ise enzimatik reaksiyonlar oluşturur. Görüntüleme süresi değiştirilerek döngü süreleri daha da kısaltılabilir. Illumina yeni nesil dizileme teknolojisi bitkilerde en çok kullanılan platformdur.

Bu tez çalışmasının amacı; turunçgillerde nüseller embriyo mekanizmasında rol oynayan genlerin Illumina platformu kullanılarak RNA-Seq analizleri ile belirlenmesidir. Bu amaçla yüksek oranda nüseller embriyo üreten Orlando tangelo ile monoembriyonik bir çeşit olan Algerian Tangerin Ranch Selection Klemantin Mandarininin transkriptomları nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı dönemlerde dizilenmiş ve karşılaştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Turunçgillerde Nüseller Embriyoni İle İlgili Yürütülen Çalışmalar

Turunçgillerde nüseller embriyoninin özelliği uzun zamandır çalışılan bir konu olmuştur. Webber (1900) “Complications in Citrus Hybridization Caused by Polyembryony” isimli makalesinde nüseller embriyoninin özelliğini tanımlamıştır. Apomiksis ise Asker ve Jerling tarafından 1992’de eşeysiz üremenin bir çeşidi olarak ifade edilmiş ve derlenmiştir.

Parlevliet ve Cameron (1959), yaptıkları bir çalışmada nüseller embriyoninin tek bir dominant genle kontrol edildiği, bu genin üç yapraklılarda heterozigot olarak bulunduğu ve bir şadok olan 'Chandler' de bulunmadığı belirtilmiştir. Ayrıca bazı minör genlerin de bu genin ifade seviyesini kontrol edebileceğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada nüseller embriyoni ve poliembriyoniyi kontrol eden birkaç gen olduğu ve nüseller embriyoni ve poliembriyoninin konrolünün birbirinden bağımsız olduğu belirtilmiştir.

Oiyama ve Kobayashi (1990), monoembriyonik diploid iki çeşit (Klemantin ve MiyauchiIyokan) ile tetraploid yapıdaki bir çeşidin ('Kawano Natsudaidai') melezlenmesi sonucunda oluşan tohumların büyük bir çoğunluğunun (Klemantin’de %99’unun, MiyauchiIyokan’da %85’inin) normal gelişme göstermediğini bildirmişlerdir. Çalışmada bu tohumların Klemantin’de %58.1’inin monoembriyonik, %16.6’sının poliembriyonik, %25.3’ünün ise embriyosuz olduğu; MiyauchiIyokan’da ise %55.5’inin monoembriyonik, %21.1’inin poliembriyonik, %23.4’ünün ise embriyosuz olduğu belirlenmiştir. Poliembriyonik tohumların embriyo sayımları sonucunda Klemantin’de bir tohumdaki embriyo sayısının 2-17 adet arasında, MiyauchiIyokan’da ise 3-20 adet arasında değişen miktarlarda olduğu tespit edilmiştir.

Koltunow (1993), yapmış olduğu çalışmada, turunçgillerde nüseller başlangıç hücrelerinin ilk bölünmesinin zigotun ilk bölünmeye başladığı sırada meydana geldiğini bildirmiştir. Gerçekleştirilen histolojik incelemeler sonucunda sadece mikropil kısmında konumlanmış başlangıç hücrelerinin bölünüp embriyo

oluşturabildiği ve söz konusu embriyoların bölünmeye başladıklarında bilinmeyen bir mekanizma tarafından embriyo kesesine doğru gelişme gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada bu embriyoların gelişmesi sırasında yeni nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin de mikropil bölgesindeki nüsellusta farklılaşarak embriyo oluşturmaya devam etmekte olduğu bildirilmiştir.

Koltunow ve ark. (1995), 'Valencia' portakalında döllenmiş ve döllenmemiş ovüller kullanarak yaptıkları histolojik çalışmalarda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin ovül içerisinde antezisten hemen önce belli olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin iri nükleusları ve koyu boyanan sitoplazmalarıyla dikkat çekici oldukları ve embriyo kesesini çevreleyen bir eliptik bölgede ortaya çıktıkları bildirilmiştir.

Bowman ve ark. (1995), 3 turunçgil çeşidinde ('Smooth Flat Seville', 'Yuma' ve 'Cipo') tohumların poliembriyoni oranı ve her tohumdan elde edilen bitkicik sayısını araştırmışlardır. Ayrıca, oluşan bitkilerin nüseller veya zigotik oluşu izozim metoduyla belirlenmiştir. Çalışma sonucunda poliembriyoni oranlarının %29 ile %98 arasında olduğu, her tohumdan ise 0-4 arasında bitki oluştuğu belirlenmiştir. Yapılan izozim çalışmaları sonucunda ise çimlenen tohumların 'Smooth Flat Seville'de %53'ünün sadece zigotik, %31'inin sadece nüseller, %16'sının ise hem nüseller hem de zigotik bitkiler oluşturduğu; Yuma'da %30'unun sadece zigotik, %68'inin sadece nüseller, %2'sinin ise her iki tip bitkiler; 'Cipo'da ise %10 zigotik, %85 nüseller, %5 ise hem zigotik hem de nüseller bitkiler oluşturduğu belirlenmiştir.

Garcia ve ark. (1999), nüseller embriyo özelliği gösterdiği bilinen Volkamariana limonu ve üç yapraklı olan 'Rubidoux' melezlemesini yapmışlar ve yeni bireyler elde etmişlerdir. Melezleme sonucunda 50 melez elde etmişler ve tohum örneklerini çimlendirmişlerdir. 25 adet rastgele belirlenen bitkinin nüseller embriyoni ya da zigotik embriyodan köken aldığını belirlemek için izozim markırları kullanılarak bir genotipleme yapmışlardır. 8-10 arasında değişen tohumlarda, test populasyonundaki 50 bireyin 38'indeki poliembriyoni yüzdesi ve çoklu embriyo oluşumu değerlendirilmiştir. Markır tiplerinin bazıları ise haritalama analizlerinde kullanılmıştır. üç yapraklıda 73 polimorfik markır, Volkamarianada 97 polimorfik

markır belirlenmiştir. Çalışmada apomiksisi kontrol eden 2 QTL üç yapraklıda, 4 QTL ise Volkamerianada ileri sürülmüştür.

Hong ve ark. (2001), *Citrus* ve *Poncirus* cinslerinde apomiksis ile ilişkili genleri belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarında F_1 populasyonu elde etmek amacıyla monoembriyonik çeşitler olan Klemantin ve Wilking çeşitleri ile polyembriyonik portakal çeşitleri kullanmışlardır. Gerçekleştirdikleri melezlemeler sonucunda farklı apomiktik ve apomiktik olmayan farklı oranlarda açılım gösteren bireyler elde etmişlerdir. Wilking çeşidi kullanılarak gerçekleştirilen melezlemeler sonucunda toplam 23 monoembriyonik, 51 poliembriyonik bireyin 1:2 oranında, Klemantinde ise 84 monoembriyonik, 71 poliembriyonik bireyi 1:1 oranında elde etmişlerdir. Elde ettikleri verileri daha önce apomiksis kontrol mekanizmasının araştırıldığı yayınlanan veriler ile beraber değerlendirdiklerinde A1 ve A2 olarak adlandırılan iki farklı dominant genin *Citrus* ve *Poncirus* cinslerinde apomiksis mekanizmasını kontrol ettiğini bildirmişlerdir. A1 genini homozigot olarak taşıyanlar hariç, A1 ve A2 genlerine sahip olan turunçgil genotiplerinin apomiktik tohumlar üretebileceğini belirtmişlerdir.

Kepiro (2003), şadok ve üç yapraklı melezlerinden elde ettikleri 88 bireyde nüseller embriyoninin kalıtımını çalışmışlardır. Çalışmada melezlerden elde edilen ortalama 283 tohumun çimlendirilmesi sonucunda oluşan bitkileri sayarak bir değerlendirme yapmışlardır. Yalnızca 17 birey %8.5'un üzerinde poliembriyoni oluşturmuşlardır. Haritalama ve QTL analizleri sonucunda üç yapraklıda heterozigot olan önemli ve dominant bir QTL belirlenmiştir.

Nageswara Rao ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada, mandarin ve şadok melezlemeleri gerçekleştirmişlerdir. Melezleme sonucunda elde ettikleri 204 bitkinin nüseller olup olmadıklarının kontrolünü RAPD ve EST-SSR markırları ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, bireyler arasındaki genetik benzerlik %67 ile %99 arasında çıkmıştır. Araştırıcılar RAPD ve EST-SSR markırlarının nüseller bitkilerin tespitinde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Nakano ve ark. (2008), *C. unshiu* 'Marcow' çeşidinde poliembriyoni ile ilişkili lokusun flanking olarak adlandırılan korunmuş bölgelerinin haritalamasını yapmışlardır. Turunçgillerde poliembriyoni ile ilişkili lokusun genetik haritasının

oluşturulması amacıyla ‘Kiyomi’ (‘Miyagawa wase’ (*C. unshiu* Marcow) × ‘Trovita’ orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck)) × ‘Miyagawa wase’ melezlemesi ile elde ettikleri F_1 populasyonunu kullanarak oluşturdukları bulked segregation analizinden DNA markırları elde etmişlerdir. Bulked segregation analizinde kullanılmak üzere toplam 12 bazdan oluşan 1681 primer EST sekanslarından tasarlanmıştır. Analiz sonucunda 5 markırın poliembriyoni lokusu ile bağlantılı olduğu tespit edilmiş ve bunların arasından 2 tanesi SCAR markırlarına dönüştürülmüştür. Bu markırlar daha önce CAPs markırları ile oluşturulmuş K9 bağlantı grubu içerisine yerleştirilmiştir. Yeni markırlar ile yenilenen bağlantı grubu 47 cM'lık bir alanı kapsamıştır.

Perez-Torneo ve Porras (2008), yaptıkları çalışmada, doğal koşullarda tozlanmış 27 limon çeşidinde tohumların %25-43’ünün poliembriyonik olduğunu belirlemişlerdir. Bu tohumlardaki embriyo sayılarının 1 ile 6 adet arasında değiştiği ve ortalama 1.3-1.6 adet arasında embriyo oluştuğu tespit edilmiştir.

Aleza ve ark. (2010), apomiktik tohum oluşturma özelliğine sahip olmayan bazı turunçgil genotiplerinin de poliembriyolar oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Bunun sebebinin 2n ve 4n melezlenmesi olduğunu bildirmişlerdir. Buradan yola çıkarak diploid-diploid ve diploid-tetraploid turunçgil genotiplerinin melezlemesini yapmışlar ve melezlerden elde edilen tohumların apomiktik özellikte olup olmadığını incelemişlerdir. Bu amaçla apomiktik özellik göstermeyen Klemantin mandarinlerinden ‘Bruno’, ‘Fina’, ‘Hernandina’, ‘Clemenules’ ve ‘Tomatera’ ana olarak kullanılmştır. Diploid ‘Nova’ mandarin [*C. clementina* × (*C. paradisi* × *C. tangerina*)] ve tetraploid ‘Nova’ mandarin, ‘Orlando’ tangelo (*C. paradisi* × *C. tangerina*) ve ‘Pineapple’ portakalı baba olarak kullanılmıştır. Melezlemeler sonrasında meyvelerden embriyolar kurtarılmış ve *in vitro* koşullarda bu embriyolar çimlendirilmiştir. Ayrıca nüsellus dokusuda *in vitro* şartlarda kültüre alınarak embriyolar elde edilmiştir. Tüm bu bitkilerin genetik analizleri ise 13 SSR markırı ile gerçekleştirilmiş ve ploidi seviyeleri ile apomiktik durumları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 2n ve 4n melezlemesinden elde edilen bitkiciklerin zigotik embriyo orjinli oldukları tespit edilmiştir.

Kepiro ve Roose (2010), AFLP markırları kullanarak nüseller embriyoni ile ilişkili genleri bulmayı amaçlamışlardır. Çalışmada, monoembriyonik bir genotip

olan *C. maxima v*e poliembryonik bir genotip olan *Poncirus trifoliata* melezlemesi sonucunda 88 birey elde etmişlerdir. Elde edilen bireylerin 100-500 arasındaki tohumları değerlendirilerek nüseller oranı tespit edilmiştir. Bu bireylerde toplam 256 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak moleküler analizler yapılmıştır. Çalışma sonucunda, nüseller embriyoni için önemli bir genle bağlantı sağlanmıştır.

Golein ve ark. (2011), 'Yashar' [(*C. changsha*) × (*C. paradisi* × *C. reticulata*)] genotipini maternal ebeveyn olarak, beş farklı genotipi ('Page' [(*C. clementina*) × (*C. paradisi* × *C. reticulata*)], 'Changsha' (*C. changsha*), 'Ponkan' (*C. reticulata*), 'Marrs' (*C. sinensis*) and 'Hamlin' (*C. sinensis*)) ise ebeveyn olarak kullanarak melezlemeler yapmışlardır. Toplam olarak 227 bitkicik elde etmişler ve bitkiciklerin zigotik ya da nüseller olduklarını ISSR markırlarıyla kontrol etmişlerdir. Çalışma sonucunda 67 bitkinin melez, 160 bitkinin nüseller olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç ISSR markırlarının turunçgillerde poliembriyoni tespitinde etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir.

Kishore ve ark. (2012), 'Sikkim' mandarin (*C. reticulate* Blanco), 'Thorny' mandarin (*C. deliciosa* Ten.), 'Kinnow' mandarin (*C. nobilis* Lour×*C. deliciosa* Ten.), 'Kleopatra' mandarin (*C. reshni* hort. ex Tanaka), 'Kalamondin' (*C. medurensis* Lour.); 'Nova' (Clementine (*C. reticulate*) × 'Orlando Tangelo' (*C. paradisi*×*C. reticulata*)), 'Minneola Tangelo' (*C. paradisi*×*C. reticulata*), 'Thornton' (*C. paradisi*×*C. reticulata*), 'Parramatta' (*Citrus sinensis* L. Osbek), 'Parson Brown' (*C. sinensis* L. Osbek), 'Smooth Flat Seville' (*C. aurantium* L.) ve 'Kaba limon' (*C. jambhiri* Lush.), genotiplerinin poliembriyo durumlarını ve nüseller bitki çıkışını araştırmışlardır. En yüksek poliembriyoni oranının %90 ile kaba limonda olduğunu, en düşük poliembriyoni oranının kalamondinde olduğunu belirlemişlerdir.

Nakano ve ark. (2012), farklı turunçgil tür ve çeşitleri arasında poliembriyoni mekanizmasıyla güçlü ilişki gösteren genomik dizilerin karakterizasyonunu ve bu dizilerin *Vitis* ve *Populus* cinslerinde hangi kromozomlarda bulunduğunu belirlemişlerdir. Çalışmalarında ilk olarak *C. unshiu* Miagava wase çeşidinde poliembriyoni lokusları ile ilişkili CAPs markırları kullanarak BAC kütüphanesi oluşturmuşlardır. Daha sonra bu BAC kütüphanesini BAC-end sequence (BES)'lerinden oluşturdukları primerler ile taramışlardır. Poliembriyoni ile ilşkili

lokusları içeren 3 BAC klonunun dizilemesini 454 GS FLX platformu ve Sanger dizilemesi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri dizileri FGENESH programında *Arobidopsis*'i model olarak kullanarak analiz etmişlerdir. Sonuç olarak poliembriyoni ile ilişkili 70 aday ORF (Open Reading Frame) tespit etmişlerdir. Tanımlanan poliembriyoni lokuslarına ait genomik dizilerin *Vitis* ve *Populus* genomları ile karşılaştırılmaları BLASTN hizalama aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BLAST analizleri sonrasında tespit edilen lokusların büyük bir bölümünün *Vitis vinifera*'nın 4. kromozomunda, *Populus trichocarpa*'nın da 6. bağlantı grubunda toplandığını tespit etmişlerdir.

Nakano ve ark. (2013), turunçgillerde *in vitro* somatik embriyogenesis ve poliembriyoni ile ilişkili genleri tanımlamışlardır. Turunçgilerde apomiktik embriyogenesisin moleküler mekanizmasını araştırmak amacıyla SSH (Suppression subtractive hybridization) yöntemini kullanmışlardır. Bu amaçla antezis aşamasındaki ovüllerden elde edilen total RNA'lar kullanmışlardır. Monoembriyonik ve poliembriyonik genotipler arasında farklı seviyelerde ifade olan ve dikkat çeken bazı genler seçilerek bu genlerde detaylı ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarında iki apomiktik, 3 tane de apomiktik olmayan genotipe spesifik gen tanımlamışlardır. Bu genler arasında *msg-2* somatik embriyogenesisin geç oluşum safhasında yüksek seviyelerde ifade olmuştur. Poliembriyogenesisin başlangıcında ise *msg-2* geninin ifade olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, *msg-2* geninin başlangıç hücrelerinin somatik embriyolara dönüşümünde görev aldığını göstermektedir. *msg-2* geninin cDNA dizileri incelendiğinde, küçük ORF'ler içerdiği, ancak herhangi bir fonksiyonu bilinen gen ile homoloji göstermediği tespit edilmiştir.

Kumar ve ark. (2014), nüseller embriyoni ile ilişkili genleri mikroarray analizleri ile araştırmışlardır. Bu amaçla çalışmalarında poliembriyonik bir çeşit olan 'Vaniglia Sanguigno' portakalı ile monoembriyonik bir çeşit olan 'Temple'yi kullanmışlardır. Çalışmada ilk olarak histolojik analizler gerçekleştirerek nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin hangi dönemde farklılaşmaya başladığını tespit etmişlerdir. Histolojik analizler sonucunda poliembriyonik çeşitte farklılaşmanın antesisten 2-3 gün önce başladığı belirlenmiştir. Elde ettikleri bu sonuca dayalı olarak mikroarray analizlerinde antesisten 2-3 gün önceki örnekler ile antezisten

sonraki 0-1 ve 5-7 gün arasındaki örnekleri kullanmışlardır. Mikroarray analizleri sonucunda yürüttükleri GO analizlerine dayalı olarak farklı ifade olan genleri gruplandırmışlardır. Mikroarray sonuçlarını qRT PCR ile doğrulamışlardır.

2.2. Turunçgillerde Yürütülen Gen Ekspresyonu Çalışmaları

Lang ve ark. (2005), dondurucu olmayan soğuk zararından sonra soğuk iklimin normal derecelere gelmesi sürecine tolerant bir turunçgil olan *C. unshiu'*nun soğuğa tolerans mekanizmasının anlaşılması için aşamalı bir soğutma sistemi uygulamış, böylece ifadesi gerçekleşen genlerin belirlenmesi için mRNA diferansiyel gösterim ileri transkriptaz – PCR (DDRT – PCR) ve real time PCR analizleri uygulamışlardır. Çalışma sonucunda toplamda 6 tane düzenleyici gen tespit edilmiştir. Bu genlerin 14-3-3 protein 40S ribozomal protein, aday 60S ribozomal protein, L15 nükleosit di fosfat kinaz-3 proteini, kromozom proteini düzenleyicisi ve aminoasit permeaz – 6 ile ilgili olduğu görülmüştür.

Zhang ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmada portakallarda olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyve kabuğu ve meyve suyunda farklı seviyelerde ifadesi olan transkriptlerin belirlenmesi için cDNA AFLP yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada toplam olarak 80–100 bç arasında değişen DNA bant profili veren 66 primer kombinasyonu kullanılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde koşularak analize tabi tutulmuş ve 27 adet farklı seviyelerde ifadesi olan transkript klonlanmış ve bu transkriptlerin DNA dizilemesi yapılmıştır. Bu DNA dizilerinden 22 tanesi BLASTing UniProd kullanılarak yapılan analizlerde Turunçgil EST'leri ile homoloji göstermiştir. Aday transkriptler fotosentez, solunum, fosfolipit metabolizması, sükroz ya da pektin metabolizması ve aminoasit metabolizması, protein 3 boyutlu yapısının oluşması ve degregasyonu, stres cevabı ve bitki savunması ile ilgili genlerle ilişkili çıkmıştır. Farklı seviyelerde ifadesi olan transkriptlerden seçilen 5 adet transkriptin çeşitli dokular arasında ve meyvelerin farklı gelişim aşamalarındaki ifade durumları real time PCR ile kontrol edilmiştir.

Bernardi ve ark. (2009), kan portakallarında olgunlaşma süresince ifadesi gerçekleşen genlerin varlığını mikroarray yöntemi ile tespit etmişlerdir. Uygun

çiplerin tasarlanmasında cDNA AFLP analizlerinden çıkan sonuçları kullanmışlar ve toplamda 301 prob dizayn etmişlerdir. Çalışma sonucunda portakalların olgunlaşma süresince ifadesi gerçekleşen bazı önemli genlerin meyvenin tadını oluşturan maddelerin sentezinden sorumlu genler, savunma ve sinyal iletimi gibi genler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu sonuçlar qRT PCR ile doğrulanmıştır.

Distefano ve ark. (2009), polen – pistil etkileşimini araştırmak için yaptıkları çalışmalarında kendine uyuşmaz olduğu bilinen bir klemantin mandarin çeşidi olan ‘Comune’ ve bir ‘Comune’ mutantı olan ve kendine uyuşur özellikte olduğu bilinen ‘Monreal’ çeşitleri, kendine ve çapraz tozlanma koşulları sonucunda histolojik olarak analiz edilmiştir. Tozlama çalışmalarının sonucunda kendine uyuşur çeşit olan ‘Monreal’ de mutasyonun stil dokularında meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca polen – pistil etkileşimi ve kendine uyuşmazlık mekanizmasına katılan aday genler herhangi bir tozlanma olmamış dokularda ve kendine tozlanmış dokulara ait stil ve stigmaların verdiği transkript profilleri cDNA AFLP yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Bu analizler sonucunda 96 adet unigen belirlenmiştir. Bu genler; stres indükleyen genler, kinaz benzeri reseptörler, fenolpropanoid oluşumuna katılan genler, transkripsiyon faktörleri ve kalsiyum – hormon sinyalizasyonuna katılan genler olarak tespit edilmiştir. Bu genlere ilave olarak LTR ve non–LTR retrotranspozanları tespit edilmiştir. Bu sonuç bu retrotranspozanların aktivitesinin tozlanmadan ve kendine uyuşmazlık genlerinin düzenlenmesindeki olası rolünü göstermektedir. Çalışmada seçilen bazı genlerin polen oluşturma ve polen tüpü uzaması sırasındaki gen ifade durumları her iki genotipte real – time PCR’la tespit edilmiştir.

Aka Kaçar ve ark. (2012), klemantin mandarinlerinde kendine uyuşmazlık mekanizmasını histolojik ve moleküler yöntemlerle araştırmışlardır. Bu amaçla klemantin mandarinlerinde kendilemeler yaparak kendine verimlilik durumlarını tespit etmişler ve cDNA-AFLP analizleri ile kendine uyuşmazlık mekanizmasında rol oynayan bazı aday genleri belirlemişlerdir.

Liu ve ark. (2016), kırmızı meyve etli şadok ve onun spontan tomurcuk mutantı olan 'Guanxi' şadok (*C. grandis* (L.) Osbeck) meyvelerinde lycopene beta -cyclase (-LCY) geninin özelliklerini ve likopen biyosentez yolağı ile ilişkili genleri araştırmışlardır. Likopen biyosentezi ve metabolizması ile ilişkili 8 genin ifade

düzeyi qPCR analizleri ile belirlenmiştir. Çalışmada beta-*LCY* cDNA'dan dört aminoasidin kırmızı etli ve 'Guanxi' şadok arasında farklı olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca likopen ve karoten birikimi de analiz edilmiştir. Kırmızı meyve etli şadok meyvelerinde likopen ve karoten birikimi likopen biyosentez yolağı ile ilişkili genlerin ifadelerinde değişiklik göstermiştir.

2.2.1. Turunçgillerde Yürütülen RNA-Seq Çalışmaları

RNA dizileme transkripsiyonel analiz, dizi varyasyon değerlendirmesi ve yeni transkript dizilerin belirlenmesinde güçlü bir araçtır. Bu nedenle son zamanlarda turunçgiller dahil birçok bitki grubunda RNA-Seq analizleri ile gerçekleştirilen çalışmalar yaygınlaşmaktadır.

Yu ve ark. (2012), portakalda meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında transkriptom değişikliklerini araştırmışlardır. 'Anliu' (WT) ve kırmızı meyve etli mutant 'Hong Anliu' (MT) portakal çeşitlerinin transkriptomları meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında farklı ifade olan genleri karşılaştırarak analiz etmişlerdir. WT ve MT'nin transkriptomları Illumina dizileme platformu kullanılarak 4 farklı gelişme aşamasında (çiçeklenmeden sonra 120, 150, 190 ve 220. günlerde hasat edilen meyveler) incelenmiştir. Toplam olarak MT çeşidinde 19.440, WT çeşidinde 18.829 gen belirlenmiştir. Hiyerarşik kümeleme analizleri belirlenen tüm gen setleri için 24 ekspresyon şablonu ortaya çıkarmıştır, bunlardan 20 tanesi MT ve WT arasında ortak bulunmuştur. %89'un üzerinde gen WT çeşidinde meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında farklı seviyelerde ifade olmuştur. Farklı seviyelerde ifade olan genlerin fonksiyonel sınıflandırması meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında farklı ifade olan genlerin en çok hücre duvarı biyosentezi, karbonhidrat ve sitrik asit metabolizması, karotenoid metabolizması ve stres cevabı ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Jiao ve ark. (2013), yüksek heterozigoti gösteren portakalda heterozigotinin gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla RNA-Seq analizleri ile tek nokta varyasyonları ile küçük insersiyon ve delesyonları tespit etmişlerdir. Ayrıca bu farklılıkların protein kodlanan sekanslarda olup olmadıkları araştırılmıştır. RNA-Seq

analizlerinde Solid Biyoscope platformu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda toplam 3542 adet delesyon, insersiyon ve inversiyon içeren 50 baz çiftinin üzerinde dizi tespit edilmiştir. Yaklaşık olarak geniş oranda delesyon içeren 296 gen bölgesinin düşük ekspresyon seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde 134 protein kodlayan genin bu sekanslar içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Bai ve ark. (2014a), *Poncirus trifoliata* köklerinde Fosfor (P) eksikliğinden kaynaklı transkriptomik değişiklikleri RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Çalışmada IIIumina HiSeq^{TM} 2000 teknolojisi kullanılarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda toplam 1135 gen P eksikliğine yanıtta farklı ifade olmuştur. Transkriptomik veriler ayrıca kantitatif real-time PCR ile doğrulanmıştır. Farklı seviyelerde ifade olan genler arasında 117 tanesinin P eksikliğinde bitki hormon sinyal regülasyonunda görev alan taşıyıcı ve transkripsiyon faktörü genleri olduğu tespit edilmiştir. *Arabidopsis* ve turunçgil arasında yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda ise P eksikliği altında P metabolizmasına katılan 174 ortak gen tespit edilmiştir.

Wu ve ark. (2014a), portakallarda meyve olgunlaşmasıyla ilişkili genleri RNA-Seq analizleri ile belirlemişlerdir. Bu amaçla çalışmalarında yabani tip fengjie 72-1 ile bu tipin doğal mutantı olan ve daha geç olgunlaşan fengwan kullanmışlardır. Meyve örnekleri çiçeklenmeden 150, 170, 190, 210 ve 240 gün sonra toplanmıştır. RNA-Seq analizlerinde IIIumina HiSeq^{TM} 2000 teknolojisini kullanmışlardır. Mutant tiple normal tip arasında 628 gen farklı seviyelerde ifade olmuşlardır.

Zhang ve ark. (2014), yapmış oldukları çalışmada 'Jincheng' portakalının geç olgunlaşan mutantı ve onun yabani tipi arasında meyve olgunlaşma süresince ABA, sükroz ve JA fonksiyonları arasında karşılaştırmalı olarak transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Transkriptom analizleri için Illumina HiSeq™ 2000 platformunu kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda 13.412 farklı ifade olan unigen (DEGs) bulunmuştur. Bu unigenlerden %75.8'inin yabani tipte down regüle olması meyve olgunlaşması sırasında yabani tipte mutant tipe göre transkripsiyon seviyesinin daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu farklı ifade olan genler metabolik yolak, bitki-patojen interaksiyonu, spliceosome, bitki hormonlarının biyosentezi ve

fenilpropanoidlerin biyosentezi olmak üzere başlıca 5 yolakta kümelenmiştir. Bu nedenle, ABA, sükroz ve JA metabolizması ve sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri 6 meyve olgunlaşma aşaması (antezisten sonra sırasıyla 139, 166, 182, 199, 215 ve 232. gün) süresince analiz edilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen bulgular portakallarda meyve olgunlaşma metabolizmasının düzenlenmesinin 4 bakış açısını takip ettiğini ortaya çıkarmıştır. Birincisi; daha olgun portakal meyvelerinin transkripsiyon seviyeleri daha düşük olmuştur. İkincisi; PME'nin ekspresyon seviyesi olgun meyvelerde artmıştır. Bu nedenle PME'nin ifade seviyesi portakal meyvesi olgunluğunun bir göstergesi olabilir. Üçüncüsü; PP2C, PYR/PYL ve SnRK2 interaksyonu portakal meyve olgunlaşmasına özgüdür. Dördüncüsü; ABA, sükroz ve JA tüm portakal meyve olgunlaşması prosesinde yer almıştır.

Zhang ve ark. (2015), kendine uyuşmazlık ile ilşkili genleri keşfetmek amacıyla Xiangshui limonunda *de novo* transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kendine uyuşmazlık ile ilişkili aday genler yüksek verimli Illumina RNA dizileme (Illumina HiSeq™ 2000) teknolojisi kullanılarak tespit edilmiştir. Toplamda 61224 unigen elde edilmiştir. Farklı eksprese olan genler kendine ve çapraz tozlanan stil ile stigmaların transkriptomları karşılaştırmalı olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonunda kendine uyuşmazlık ile ilişkili olabilecek çeşitli farklı ifade olan genler tespit edilmiştir. 12 genin ifade seviyesi kendine ve çapraz tozlanan stigmalarda oldukça farklı gözlenmiştir. Apoptoz ile ilişkili NADPH oksidaz genleri kendine tozlanan transkriptomlarda yüksek düzeyde up regüle olmuştur. Aday S-RNase geni kendine tozlanan stigmalarda en yüksek seviyede ifade olmuştur.

Coqueiro ve ark. (2015), portakallarda kitosan ve salisilik asit elisitör uygulamaları sonucunda ortaya çıkan transkripsiyonel farklılıkları RNA-Seq tekniği ile araştırmışlardır. Çalışmalarında 'Rangpur' laymı üzerine aşılı 7 aylık 'Pera' portakallarını kullanmışlardır. Salisilik asit (0, 1.25, 2.5 ve 5 mM) ve kitosan (0, 1, 2 ve 4 mg/mL) farklı konsantrasyonlarda bitkilere muamele edilmiştir. Uygulamadan 1, 12, 24 ve 48 saat sonra yaprak örnekleri toplanmış ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizleri öncesinde salisilik asit ve etilen yolaklarında

görev alan 4 genin (*NPR1-3, WRKY70, PR1* ve *PR4*) ekspresyonuna qRT PCR ile bakılmıştır. Real time PCR sonuçlarında bu genlerin yüksek oranda ifadesi tespit edildikten sonra RNA-Seq analizşerine geçilmiştir. RNA-Seq analizlerinde Genom Analyzer IIX plantformu (Illumina/Solexa) kullanılmıştır. Dizileme sonrasında transkriptler *C. clemantina* referans genomu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda salisilik asit uygulamalarında kitosana göre daha fazla genin ifade olduğu tespit edilmiştir. Salisilik asit uygulamalarında toplam olarak 1425, kitosan uygulamalarında ise 640 farklı seviyelerde ifade olan gen tespit edilmiştir.

Guo ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmada farklı perikarp renkleri ve içerikleri ile ilişkili farklı seviyelerde ifade olan genleri transkriptomik analizler ile araştırmışlardır. Bu amaçla Guanxi şadok geneotipi ile bu genotipin mutantı olan farklı bir tip kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan genotiplerden hasat edilen meyvelerde ilk olarak karotenoid analizleri yapılmıştır. Karotenoid analizleri HPLC ile gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizlerinde ise örnekler olgunlaşma aşamasında hasat edilmiş ve 3 biyolojik tekerrür olacak şekilde RNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışmada Illumina teknolojisi kullanılarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. HPLC analizlerine göre mutant tipin meyvelerinde β-karotenin yaklaşık 10 kat daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir. qRT PCR sonuçlarına göre karoten ile ilişkili genlerin mutant tipte daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Karoten miktarının mutant tipte fazla olması ancak ilgili genlerin ifadesinin düşük olması ile açıklanmıştır. RNA-Seq analizleri sonucunda mutant tipte gen ekspresyonunun önemli derecede değiştiği, 165 genin down regüle, 135 genin up regüle olduğu tespit edilmiştir.

Liang ve ark. (2015), Şadokta moleküler markır geliştirmek amacıyla *de novo* transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 'Shatian' şadok çeşidi kullanılmıştır. RNA-Seq analizlerinde materyal olarak genç yapraklar, petal, anter, flament, stil ve çiçek sapı kullanılmıştır. RNA-Seq analizlerinde Illumina teknolojisi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 12 Gb transkriptom verisi elde edilmiştir. Toplam 57212 unigen tespit edilmiş ve bu genlerden 39584'ü bilinen proteinlerle homoloji göstermiştir. Sekanslardan toplam olarak 1174 SSR lokusu belirlenmiştir. Bu SSR markırlarından 100 tanesi rastgele seçilerek test edilmiş, sonuç olarak 87 tanesi başarılı bir şekilde amplifikasyon vermiştir. Ayrıca dizilerde tespit edilen SNP'lerden

20 adet SNP primeri tasarlanmış ve test edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile şadokta güvenilir ve bilgi verici SSR ve SNP primerleri geliştirilmiştir.

Tan ve ark. (2015), diploid bir turunçgil anacı olan *C. junos* cv. 'Ziyang xiangcheng' ve bu anacın katlanmış diploidinde stres dayanıklılığı açısından karşılaştırmalı metabolik ve transkripsiyonel analizler gerçekleştirmişlerdir. Poliploidinin çevresel stres koşullarına adaptasyonunun daha kolay olduğu düşüncesiyle çalışmayı planlamışlardır. Çalışmada Ziyang xiangcheng'e ait yaprak örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq Illumina HiSeq™ 2005 platformu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda morfolojik olarak double diploid olanın diploide göre daha küçük bitki boyuna, daha geniş ve kalın yapraklara, büyük stoma, ancak daha küçük stoma yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda diploid ve tetraploid yapraklar arasında yalnızca 212 genin farklı seviyelerde ifade olduğu belirlenmiş ve bu genlerin çoğunlukla stres cevabı fonksiyonları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Terol ve ark. (2015), çalışmlarında toplam 28 örnek kullanarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirmişlerdir. Kök, floem, yaprak ve çiçek olmak üzere 4 farklı organ kullanmışlardır. RNA-Seq analizlerinde *C. medica, C. aurantifolia, C. limon, C. bergamia, C. clementina, C. deliciosa, C. reshni, C. maxima, C. paradisi, C. aurantium, C. sinensis* ve *Poncirus trifoliata* turunçgil türlerini kullanmışlardır. RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq™ 2000 teknolojisini kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda elde ettikleri 3421 milyon okumayı *C. clemantina* referans genomu ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada toplam 3326 yeni gen tespit edilmiştir.

Wang ve ark. (2015a), üç yapraklının soğuk stresine verdiği transkriptomik cevabı RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Bu amaçla üç yapraklı bitkilerine soğuk uygulaması gerçekleştirmişlerdir (4 ºC). Soğuk uygulamasını takiben yapraklar 0, 6, 24 ve 72. saatlerde toplanmıştır. Soğuk uygulaması ile beraber bitkilere 200 mM NaCl ilave edilerek tuz uygulaması da gerçekleştirilmiş ve soğuk uygulamasında olduğu gibi aynı saatlerde örnekler toplanmıştır. RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq™ 2000 platformu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 68 milyonun üzerinde kaliteli okuma elde edlmiş ve toplam olarak 77292 unigen tespit

edilmiştir. Bu genlerden 23846 tanesi bilinen genler ile homoloji göstermiştir. Soğuk uygulamasından sonra toplanan örnekler arasında 5549 tane farklı seviyede ifade olan gen belirlenmiştir.

Lin ve ark. (2015), Ponkan mandarinine ait meyvelerin 3 farklı gelişme aşamasında (S120: ilk gelişme aşaması, S195: ticari hasat aşaması, S205: gecikmiş hasat aşaması) şeker ve organik asit metabolizmasını RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Çalışmada RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq™ 2000 teknolojisi kullanılmıştır. RNA-Seq analizleri sonucunda 19504 gen *Citrus clementina* genomu ile eşleşmiştir. Meyve olgunlaşması sırasında 85 up regüle ve 59 down regüle gen tespit edilmiştir. Sükroz fosfat sentez (*SPS*) geni up regüle olan gruba dahil olmuş ve transkript oran dağılımı ile desteklenmiştir. Çalışma sonucunda 2 asparajin transferaz (*AST*) ve spesifik bir ATP-sitrat liyaz (*ACL*) ve glutamat dekarboksilazın ekspresyonlarının meyve olgunlaşması süresince arttığı tespit edilmiştir.

Teng ve ark. (2016), 'Powell' portakalının meyve etinin oda sıcaklığı ve soğukta muhafazası sırasındaki bozulması ile ilişkili transkriptomik ve metabolik değişimleri araştırmışlardır. Transkriptom analizlerinde RNA-Seq, metabolik analizlerde ise GC-MS teknolojilerini kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri için meyve etlerinden RNA izolasyonu gerçekleştirmişler ve Illumina dizileme teknolojini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda oda koşullarında ve soğuk koşullardan elde edilen örnekler arasında kontrole göre sırasıyla toplam 5701 ve 5984 farklı seviyede ifade olan gen tespit edilmiştir. Oda sıcaklığı koşullarından elde edilen örneklerde sakkaroz metabolizması, glikolizis, glukoneogenesis ve fermentasyon yolaklarına katılan up regüle genlerin varlığı belirlenmiştir. Sonuç olarak oda koşullarında muhafaza edilen örneklerin meyve yaşlanmasını düzenleyen kalsiyum, ABA ve etilen sinyal genlerinin olduğu, düşük sıcaklık koşullarında ise meyve kalitesinin korunmasını sağlayan oksin sinyal genlerinin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

2.3. Diğer Bitkilerde Yürütülen RNA-Seq Çalışmaları

Zhang ve ark. (2010), çeltikte (*Oryza sativa*) sekiz organ (kallus, 14 günlük fide kökü, 14 günlük fide sürgünü, kardeşlenme aşamasında yapraklar, çiçeklenme aşamasında sürgünler, başlama aşamasında salkım, çiçeklenme aşamasında salkım, doldurma aşamasında salkım) için ilk transkriptom atlasını sunmuşlardır. Çalışmada yüksek verimli Illumina GA RNA-Seq platformu kullanılarak düşük seviyede ifade olan transkriptlerin yanı sıra yeni transkriptler, ekson ve untransformed bölgeler açık bir şekilde belirlenmiştir. Çalışma sonunda 234 aday kimerik transkript belirlenmiştir.

Hansey ve ark. (2012), yapmış oldukları çalışmada Illumina (Illumina Genome Analyzer II) dizileme yöntemini kullanarak 21 kendilenmiş mısır (*Zea mays*) hattında RNA dizileme analizi gerçekleştirmişlerdir. Transkript analizi bu 21 hatta (%57'den %66'ya kadar) ifade olan genlerin toplam sayısında minimal varyasyon ortaya çıkarılmıştır. Transkribe gen setleri çalışmada kullanılan tüm mısır hatlarında %48.7 oranında ifade edilmiştir ve %23.4 oranında hiçbir hatta ifade edilmemiştir.

Zhang ve ark. (2012a), susam (*Fructus sesani*) bitkisinde RNA-Seq analizleri ile SSR markırları geliştirmişlerdir. Bu amaçla susam bitkisinden farklı büyüme ve gelişme aşamalarına sahip örnekler alınarak transkriptom dizileme analizleri gerçekleştirmişler ve bu dizilere dayalı SSR markırları geliştirmişlerdir. Dizileme çalışmaları sonucunda 260 milyon üzerindeki okumadan 42.566 unitranskript ve 24 cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Toplam olarak 15 bazın üzerinde 7.324 ve 18 bazın üzerinde 4.440 SSR tespit etmişlerdir. Ortalama olarak kb başına 6.55 15 bazdan büyük SSR, 10. 81 kb 18 bazdan büyük SSR tespit edilmiştir. Tekrar motifleri incelendiğinde %48 dinükleotid, %20 trinükleotid, %25 hekzanükleotid, %2.97 pentanükleotid, %2.12 tetranükleotid ve %0.57 mononükleotid tespit edilmiştir. Toplam olarak 2.164 SSR primeri 4.440 SSR bölgesi içeren dizilerden tanımlanmıştır. Bu SSR bölgelerinin içerisinden 18 bazdan büyük olan rastgele 300 SSR primeri seçilmiş ve doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Toplam 24 çeşitte 300 primerin 276 tanesinin PCR ürünü oluşturduğu tespit edilmiştir.

Zhang ve ark. (2012b), yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) bitkisinin tohum gelişimi sürecinde transkriptom karakterizasyonu, *de novo* analizleri ve SSR markır geliştirme çalışmaları yürütmüşlerdir. Bu amaçla farklı yağ içeriklerine sahip 3 yer fıstığı çeşidinin olgunlaşmamış tohumlarını kullanarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirmişlerdir. Toplam olarak 100 bç'den oluşan 27 milyonluk okuma gerçekleştirmişler ve 59.077 unigen belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda toplam olarak 3.919 mikrosatellit markırı geliştirmişler ve 160 tanesini kontrol etmişlerdir.

Li ve ark. (2012), kauçuk ağacında (*Ficus elastica*) yeni nesil DNA dizileme teknolojileri kullanarak EST-SSR markır geliştirme çalışmaları yürütmüşlerdir. Bununla beraber elde edilen dizilerde *de novo* analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Illumina dizileme teknolojisi kullanarak 30 milyon dizileme okuması gerçekleştirmişler ve toplam olarak 22.756 unigen tespit etmişlerdir. Ayrıca bu unigenlerden toplam 39.257 SSR tanımlamışlardır. Bu markırlar arasından 110 tanesi rastgele seçilerek 13 kauçuk ağaçında denenmiştir. Araştırıcılar bu çalışma sonucunda Illumina yeni nesil dizileme teknolojisinin transkriptom karakterizasyonu ve moleküler markır geliştirme çalışmalarında oldukça kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir.

Asya'da besinsel ve medikal özellikleri bakımından oldukça geniş kullanım alanına sahip olan *Auricularia polytricha* mantarında miselyum ve meyve dokusunda moleküler markır geliştirmek amacıyla transkript sekansları Illumina/Solexa sekanslama teknolojisi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. *De novo* analizlerinde 36483 EST ve N50 uzunluğunda 636 bç tespit edilmiştir. Tespit edilen EST'lerin 28108 tanesi bilinen protein data bankaları ile benzerlik göstermiştir. EST'ler en yüksek benzerliği *A. delicata* çeşidi ile göstermiştir. Gen ekspresyon profili analizleri 2057 EST'nin farklı ifade edildiğini bunlardan 1020'nin miselyumda, 1037'sinin ise meyveye dönüşen kısımda up regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 1715 potansiyel SSR markırı belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2014).

Azim ve ark. (2014), yapmış oldukları çalışmada mango bitkisinin yaprak transkriptom ve kloroplast genomunu yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak karakterize etmişlerdir. RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq 2000 platformu kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri ile 12 milyon okuma üretilmiştir. *De novo*

transkriptom analizleri sonucunda 30.509 unigen tespit edilmiştir. Genomik veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilen BLAST analizleri sonucunda 25.593 mango unigeni (toplamın %80'i) anote edilmiştir ve mangonun en yakın komşusunun *Citrus sinensis* olduğu belirlenmiştir. 9.141 (%37) unigen *C. sinensis* ile eşleşmiştir. GO ve Clusters of Orthologous Group analizleri sonucunda unigen dizileri sırasıyla 57 ve 25 sınıfa ayrılmıştır. 13.500 fazla unigen 293 KEGG yolağında görev almıştır. KEGG tabanlı gen anotasyonu biyoaktif flavon, flavonol ve flavonoidlerin biyosentezi, terpenoid ve ligninlerin biyosentezi ve bitki hormon sinyal iletimini kapsayan biyokimyasal yolakların dizilerinin varlığını göstermiştir. Çalışmada mango transkriptom dizilerinin proteolitik enzimlerin 5 katalitik sınıfa ait 235 proteaz ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Ophir ve ark. (2014), iki farklı nar (*Punica granatum*) çeşidinde ('Nana' ve 'Black') 454-GS-FLX Titanium teknolojisini kullanarak transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri veriler ile 7155 SSR ve 6500 SNP tespit etmişlerdir. Çalışmada 480 SNP ile Tarımsal Araştırma Örgütü (ARO) bünyesinde bulunan nar çeşitlerinin genetik yapısı incelenmiştir. Kullanılan SNP'ler polimorfik bulunmuştur ve bu SNP'ler ARO'da bulunan nar çeşitlerinin başarılı bir şekilde sınıflandırılmasında kullanılmıştır. Bu çalışma ile nar için yüksek verimli transkriptom analizleri ve genetik markır alt yapısı oluşturulmuştur.

Wu ve ark. (2014b), mango (*Mangifera indica* Linn) meyvelerinde transkriptom ve proteomik analizler gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, gelişme ve olgunlaşma evreleri sırasında ‘Zill’ mango meyve perikarp ve posasından elde edilen örneklerin transkriptom dizilemesinde lumina RNA-Seq teknolojisi kullanılmıştır. RNA-Seq analizleri sonucunda ortalama 858 bç uzunluğunda 54.207 transkript içeren toplam 68.419.722 okuma elde edilmiştir. Toplam olarak 42.515 (%78.43) transkript genel protein veri tabanları kullanılarak anote edilmiştir. KEGG analizleri sonucunda 23.741 (%43.79) transkriptin 128 yolakta görev aldığı belirlenmiştir. Bu yolakların daha önce bilinmeyen transkriptler olduğu ortaya çıkmıştır. Metabolizma kategorisinde yolaklar en fazla karbonhidrat metabolizması (2794 transcripts), yağ (1835 transcripts), amino asit metabolizması (1465 transcripts), nükleotid (1145) ve diğer sekonder metabolitlerin biyosentezinde (1084 transkript) temsil edilmiştir.

Karbonhidrat metabolizmasında, en fazla nişasta ve sükroz (512 transkript) metabolizması temsil edilmiştir. Bu durum mango meyvelerinde gelişim ve olgunlaşma sırasında bol miktarda nişasta ve sükroz sentezi, yağ bileşiği ve amino asit sentezinin yapıldığını göstermiştir.

Bai ve ark. (2014b), yapmış oldukları çalışmada elmada (*Malus communis*) mevcut olan referans transkriptomları arttırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla Illumina HiSeq 2000 teknolojisi kullanarak RNA-Seq analizleri yapmışlardır. Bu amaçla 'Golden Delicious' elma çeşidini kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda Golden Delicious çeşidinin farklı büyüme ve gelişme aşamalarında toplam 168.5 milyon okuma ile 14 set strand-spesifik RNA-seq verisi elde edilmiştir. Genome-guided ve *de novo* analizleri birlikte kullanılarak 53.654 orjinal olduğu tahmin edilen ve 17.524 yeni transkript olmak üzere toplam 71.178 elma referans transkriptomları geliştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların elma referans transkriptomlarının tamamlanmasında önemli bir adımı temsil ettiği bildirilmiştir.

Wang ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada, demir tolerant bir elma türü olan *Malus xiaojinensis* bitkisinde demir tolerantının mekanizmasını açıklamayı amaçlamışlardır. Transkript dizi verileri elde etmek ve demir eksikliği altında kök ve yapraklarda ifade olan genleri incelemek için RNA-Seq ve biyoinformatik analizler gerçekleştirerek demir eksikliğinden sonra demir emilimi ile igili mekanizmanın moleküler yapısını açıklığa kavuşturmuşlardır. RNA-Seq analizleri Illumina (Hiseq 2000) ve 454 (GS FLX Titanium) teknolojileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda ortalama 864 bç uzunluğunda 74.839 transkript elde edilmiştir. 21.037 transkript (GO biyolojik proses sınıflandırmasına dayalı demir alımı, demir taşınımı ve sinyal iletimi ile ilişkili transkriptler) demir eksikliğinden sonra kök ve yapraklarda farklı seviyelerde ifade olmuştur. Demir taşınımı demir eksikliğinden 2 gün sonra güçlenirken, demir alımı demir eksikliği uygulamasından 12 saat sonra artmıştır. Etilen ve reaktif oksijen tutucu (ROS)-temelli sinyal yolağı demir kıtlığından 12 saat sonra aktive olmuştur. Oksin iletim yolağı 12 saat inhibe edilmiştir ve demir kıtlığının 2. gününde aktive olmuştur. Absisik asit ve jasmonik asit sinyal yolağı demir eksikliğinden 2 gün sonra cevap vermiştir. Elde edilen bu

bulgular *M. xiaojinensis* bitkisinde demir alımı demir eksikliğinin erken döneminde, demir taşınımı ise demir eksikliğinin geç döneminde artığını göstermiştir.

Alkio ve ark. (2014), kiraz (*Prunus avium* L.) meyvelerinin gelişiminde ekzokarp ile ilişkili genlerin ifade profillerini araştırmışlardır. Bu amaçla çiçeklenme ve olgunluk arasında 14 farklı zamanda topladıkları örnekleri kullanmışlardır. RNA dizileme analizlerinde Illumina HiSeq 2000 platformunu kullanmışlardır. RNA dizileme analizleri sonucunda 665 milyon ham okuma elde edilmiştir. GO analizleri sonucunda biyolojik proses kategorisinde wax biyosentez prosesi, kütin biyosentez prosesi ve salisilik asit uyarımına cevap en fazla temsil edilen grup olarak belirlenmiştir. Salisilik asit sinyali patojen savunmasında önemli rol oynarken, wax ve kütin biyosentezinin kütikül oluşumunda gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Sanhueza ve ark. (2015), kontrollü atmosfer kullanarak soğuk koşullar altında depolanan nektarin meyvelerinde (*Prunus persica* 'Red Pearl') transkriptomik analizler gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada araştırıcılar hasat sonrası soğuk depolama sırasında nektarin meyvelerinde meydana gelen soğuk hasarı (CI) mekanizmasını aydınlatmayı amaçlamışlardır. Kontrollü atmosfer (CA; yüksek CO_2 konsantrasyonu ve düşük O_2) altında depolamanın soğuk hasarını önlediği tespit edilmiştir. Çalışmada henüz hasat edilen meyveler, depolanmayan meyveler, soğuk depolamasından sonra soğuk hasarından etkilenmiş meyveler ve CA ile soğuk depolama kombinasyonunda soğuk hasarı göstermeyen meyveler kullanılmıştır. Kontrollü atmosfer koşullarında depolamanın soğuk hasarını nasıl önlediğinin mekanizmasının anlaşılması için farklı koşullarda 'Red Pearl' nektarinlerinin transkriptomik değişimi RNA-Seq aracılığıyla analiz edilmiştir. Çalışmada Illumina HiSeq 2000 platformu kullanılarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda olgunlaşma sırasında, soğuk koşullara maruz bırakılmayan meyveler ile karşılaştırıldığında CA uygulamasına maruz kalan nektarinlerde genlerin benzer sayıda ifade olduğu belirlenmiştir. Sert meyvelerde yumuşak meyvelerden daha fazla sayıda farklı seviyede ifade olan gen tespit edilmiştir. Farklı seviyede ifade olan genlerin analizi soğuk koşullar ile düşük O_2 konsantrasyonu kombinasyonunun sadece soğuk depolamadan daha fazla metabolik prosesleri yavaşlattığını göstermiştir.

Wei ve ark. (2015a), kırmızı ve sarı kiraz (*Prunus avium* L.) meyvelerinde antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin transkriptom analizlerini karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada *P. avium* L.'nin referans transkriptomu dizilenmiş ve meyve renginin transkripsiyonel belirleyicileri tespit edilmiştir. Kırmızı ve sarı meyvelerden oluşturulan cDNA kütüphaneleri yeni nesil Illumina/Solexa dizileme platformu kullanılarak dizilenmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda 43.128 unigen içeren 66 milyonun üzerinde okuma gerçekleştirilmiştir. Meyve olgunlaşmasının dört aşaması arasındaki transkriptom farklılıkları Illumina dijital gen ifade (DGE) profili kullanılarak analiz edilmiştir. Biyolojik yolak analizleri antosiyanin biyosentezi ile ilişkili olan 72 unigeni ortaya çıkarmıştır. Fenilalanin amonyak-liyaz (*PAL*), 4-kumarat-CoA ligaz (*4CL*), kalkon sentaz (*CHS*), kalkon izomeraz (*CHI*), flavanon-3-hidroksilaz (*F3H*), flavanon 3'-hidroksilaz (*F3'H*), dihidroflavonol 4-redüktaz (*DFR*), anthocyanidin sentaz (*ANS*) ve UDP glukoz: flavonol 3-Oglukosiltransferaz (*UFGT*) kodlayan unigenlerin ifade şablonu meyve olgunlaşması sırasında kırmızı ve sarı meyveler arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca, antosiyanin biyosentezini kontrol edebilen bazı transkripsiyon faktör aileleri (*MYB*, *bHLH* ve *WD40* gibi) tespit edilmiştir. Antosiyanin enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan ifade seviyesi değişmiş 18 unigen qRT PCR analizleri ile doğrulanmıştır.

Wang ve ark. (2015b), *Malus sieversii* f. niedzwetzkyana ile *M. domestica* 'Fuji' melezlemesi sonucu elde edilen F_1 populasyonunda kırmızı ve beyaz meyve etli elmalarda karşılaştırmalı olarak transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla yüksek verimli RNA dizileme teknolojisi olan Illumina HiSeq 2000 platformunu kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda kırmızı meyve etli elmalarda toplam 114 farklı seviyelerde ifade olan gen elde edilmiştir. Bu genlerden 88'i up regüle, 26'sı down regüle olmuştur. Up regüle olan 88 genin flavonoid biyosentez prosesi ve stres cevabı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 20 up-regüle aday genin (10 flavonoid biyosentezi ile ilişkili, 2 *MYB* transkripsiyon faktörü, 8 stres cevabı ile ilişkili) 10 down regüle olan genin ifadesi qRT PCR ile doğrulanmıştır.

Ji ve ark. (2015), kırmızı etli elma kalluslarında (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*) oksin baskılanmış antosiyanin biyosentezinin transkriptom profilini ortaya çıkarmışlardır. *In vitro* kallus kültürlerinde antosiyanin biyosentezinin eksojen oksin konsantrasyonları tarafından güçlü bir şekilde etkilenmesi, ancak bu mekanizmanın büyük ölçüde bilinmemesi nedeniyle araştırıcılar bu konuyu açıklığa kavuşturmayı hedeflemişlerdir. Bu mekanizmanın moleküler temelini anlamak için global gen ifadesi NAA (0.3 ve 10 mg/L) ve 2,4-D (0.03 ve 0.6 mg/L) uygulanmış elma kalluslarında RNA-Seq kullanılarak analiz edilmiştir. RNA-Seq analizleri Illumina HiSeq^{TM} 2000 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2,4-D uygulamasında toplam 3070 ve NAA uygulamasında toplam 2533 gen farklı seviyelerde ifade olmuştur. Bu genlerden her iki oksin uygulamasında ortak olarak 937 gen up regüle, 902 gen down regüle olmuştur. Vakuollere antosiyanin ve flavonoid sentezi ve taşınımı ile ilişkili genler genellikle down regüle olmuştur. 2,4-D ve NAA'nın yüksek konsantrasyonları oksinin taşınımını kolaylaştırmıştır ve homeostatik feedback regulatory loop ile ilişkili genlerin ifadesini teşvik etmiştir. Oksin sinyal yolağında, 9 Aux/IAA gen ailesi ve 7 ARF gen ailesi up regüle olmuştur. Ayrıca, 298 transkipsiyon faktörü 2,4-D ve NAA uygulamalarında farklı seviyede ifade olmuştur.

Wang ve ark. (2015c), yapmış oldukları çalışmada, bademde (*Prunus mongolica* Maxim) kuraklık stresine cevabın mekanizmasını morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve yüksek verimli dizileme yaklaşımlarını kullanarak araştırmışlardır. RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq 2000 platformunu kullanmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda kontrol grubunda 28,713,735 ve kuraklık stresi uygulanmış grupta 26,650,133 okuma gerçekleştirilmiştir. Ortalama 874.44 bp uzunluk ile toplam 67,352 transkript elde edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3365 transkript kuraklık stresi uygulanmış grupta farklı seviyede ifade olmuştur. Farklı seviyede ifade olan transkriptlerden %55.75 (1876 transkript)'i up regüle, %44.25 (1489)'i down regüle olmuştur. Kuraklık stresinde tüm plazma membran intrinsic protein transkriptleri down regüle olduğu, nodulin intrinsic protein veya small basic intrinsic protein transcriptlerinin ifadelerinin ise kuraklıktan etkilenmediği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular *P.*

mongolica'nın kuraklık stresine verdiği cevabın moleküler mekanizmasının anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır.

Yan ve ark. (2015), yüksek oranda askorbik asit içeren ve medikal özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahip olan ***Rosa roxburghii*** Tratt. bitkisinde genomik bilgi eksikliğini gidermek amacıyla Illumina teknolojisini kullanarak transkriptomik sekanslama yapmışlardır. Çalışmada 53 milyon net okuma elde edilmiştir. Ortalama 343 bç uzunluğunda 106590 unigen ortaya çıkmıştır. Sekans benzerliğine bağlı olarak bilinen proteinlerle karşılaştırıldığında 9301 ve 2393 gen, Gen Ontology ve Clusters of Orthologous Group analizlerinde tespit edilmiştir. 124 yolakla ilgili 7480 gen KEGG yolak veri bankalarında karşılaştırma yapılarak ortaya konmuştur. BLAST analizlerinde meyve gelişimi ile ilgili çeşitli transkripsiyon faktörlerini kodlayan 498 transkript elde edilmiştir. Ek olarak 9131 potansiyel SSR lokusu identifiye edilmiştir.

Ipomoea nil bitkisinde çiçeklenme ve çiçek rengi ile ilgili bilgi elde etmek amacıyla Illumina platformu kullanılarak sekanslama yapılmıştır. Toplam olarak 268 milyon RNA sekansı elde edilmiştir. Bu okumalar 220117 contig olarak birleştirilmiş ve bunların 137307'si GO ve KEGG veri bankaları ile eşleştirilmiştir. Fonksiyonel eşleşmede 89781 contig GO veri bankasında tespit edilmiştir. 17418 contig yolak eşleştirmelerinde araştırılmış ve 144 KEGG yolağı ile eşleşme tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan 55 contig'in çiçeklenme ile ilgili genlerle ilişkili olduğu 25 contig'in ise fenilpropanoid biyosentezi ile ilgili olduğu bulunmuştur. Gen ekspresyon profiline bakıldığında fenilpropanoid'in sentezinin lignin biyosentezini baskıladığı görülmüştür. Buda çiçeklerde antiosiyanin içeriğinin fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca 15537 SSR MISA data bankası kullanılarak tespit edilmiştir (Wei ve ark., 2015b).

Zhu ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmada Çin kirazının (***Prunus pseudocerasus***) çiçek tohumlarında gen ekspresyon profilini Illumina RNA-Seq teknolojisi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada yaklaşık 47 milyon net okuma ortalama 837 bç uzunluğu ile 50604 diziden elde edilmiştir. Toplam 37650 unigen ilişkilendirimiştir. 128 yolak KEGG yolak analizleri aracılığıyla açıklanmıştır. Sekonder metabolitlerin biyosentezi ve bitki hormon sinyal transdüksiyonu çiçek

tomurcuklarında yüksek oranda tespit edilmiştir. Kritik bir dönem olan endodormanside 1644 farklı ifade olan gen (DEGs) ekspresyon profilinden elde edilmiştir. KEGG yolak analizlerinde, fitohormon metabolizması gibi çeşitli metabolik süreçler gösterilmiştir.

Niu ve ark. (2015), tarafından içerdiği uçucu yağ, karakteristik aroma, medikal ve ekonomik özelliklerinden dolayı önemli ağaç türlerinden biri olan *Lindera glauca* bitkisinin farklı dokulardaki esansiyel yağ oluşumu ve birikmesinin mekanizması açıklanmıştır. Çalışma kapsamında kök, gövde, yaprak ve çiçeklerde RNA sekanslama teknolojisi kullanılarak (Illumina) transkriptom analizleri yapılmıştır. Farklı *L. glauca* dokularından toplamda 27.2 GB'lık okuma (ortalama 92.7 bç) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen toplam 264831 unigen arasından 98141 unigen farklı data bankalarında eşleştirilmiş ve terpenoid biyosentezi ile ilgili 114 potansiyel unigen tespit edilmiştir.

Legay ve ark. (2015), elmalarda ekzokarpta meydana gelen ve russeting olarak adlandırılan bozulmanın mekanizmasını RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Bulk transkriptomik profilleme üç russeted ('Patte de loup', 'Reinette Parmentier', 'St Edmund's Pippin') ve üç mumlanan ('CRAW/Ma/AF42', 'CRAW/ma/AG94', 'Gala') elma çeşitlerinin ekzokarpları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizlerinde Illumina platformu kullanılmıştır. qPCR ile doğrulama temsilci genlerde ve ek çeşitlerde gerçekleştirilmiştir. GO analizleri russeted ekzokarplarda lignin ve kütikül biyosentez genlerinin baskılandığını, bununla birlikte suberin birikimi, stres cevabı, birincil algı, *NAC* ve *MYB* ailesi transkripsiyon faktörleri ve spesifik triterpen biyosentez genlerinin ifadesinin arttığını ortaya çıkarmıştır. Özellikle *MYB93* benzeri transkripsiyon faktörü ve anahtar suberin biyosentetik genleri arasında güçlü bir korelasyon (R^2 = 0.976) bulunmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışmaya ait bulgular russeting durumunun yalnızca suberin birikimi değil, aynı zamanda hücre duvarının tüm yapısını etkileyen stres cevabına yol açan kütikül biyosentez genlerinin ifadesinin azalmasıyla indüklendiğini göstermiştir.

Wu ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmada karbonhidrat metabolizması ve stres cevabı ile ilişkili elmada fotosentezin en önemli ürünü olan sorbitol sentez

mekanizmasının moleküler yapısını araştırmışlardır. Çalışmada sorbitol fonksiyonunu anlamak için aldoz-6-fosfat redüktaz (*A6PR*)'ın baskılanmış ifadesini sergileyen ‘Greensleeves’ elma kültürünün transgenik hatlarının yaprakları kullanılmıştır. İki antisens (A04 and A10) ve kontrol grubu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Transkriptom karakterizasyonu için RNA-Seq analizleri yapılmıştır. RNA-Seq analizlerinde Illumina Hiseq 2000 platformu kullanılmıştır. Antisens hatlarda 'stres ilişkili proses' kategorisine ait önemli ölçüde zenginleştirilmiş gen ontolojileri tespit edilmiştir. Bunlar absisik asit, salisilik asit ve jasmonik asit, nükleotid bağlayıcı site lösin-zengin tekrar (*NBS-LRR*) hastalık direnci genleri ve ATP-bağlayıcı kaset (*ABC*) taşıyıcı genlerin sentez/yıkımı ile ilişkili genleri kapsamaktadır. Bu elma ağaçlarında biyotik ve abiyotik strese cevapta sorbitolün önemli rol oynadığını göstermektedir.

Backiyarani ve ark. (2015), muzda (*Musa balbisiana*) yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. RNA sekanslama çalışmalarında *Musa balbisiana* türüne ait Attikol çeşidini kullanmışlardır. RNA-Seq analizlerinde İon Torrent platformunu kullanarak yaklaşık 4.5 milyon okuma gerçekleştirmişlerdir. Biyoinformatik analizler sonucunda ortalama uzunluğu 113 bç olan 82413 transkript tespit etmişlerdir. Transkriptlerin Swiss-Prot veri bankasında yapılan araştırmaları sonucunda 35783 transkript belirlenmiştir. Ayrıca 20696 transkriptin 455 farklı yolakta görev aldığı belirlenmiştir. Çalışma sonunda toplam 4780 SSR bölgesi tespit edilmiş ve toplam 2628 SSR primeri tasarlanmıştır. Bu primerler arasından rastgele seçilen 30 tanesinin etkinliğini muz genotiplerinde araştırılmıştır.

Garcia-Seco ve ark. (2015), böğürtlende RNA-Seq analizleri ile transkriptom dizilemesi gerçekleştirmişlerdir. Rosaceae türleri için çok geniş bir genomik verinin ulaşılabilir olduğunu, fakat *Rubus* cinsinde bu verilerin yetersiz olduğunu bu yüzden de yeni çeşitlerin ıslah edilmesi çalışmalarının kısıtlandığını bildirmişlerdir. Bu amaçla bahçe koşullarında yetişen olgun böğürtlenler kullanarak RNA dizileme çalışmaları yürütmüşlerdir. RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq 2000 teknolojisini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda 9 milyar baz dizilenmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda 42062 consensus dizisi elde etmişlerdir. Elde

ettikleri bu dizilerin fonksiyonel anotasyonunu farklı veri bankaları kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak, 34552 dizinin fonksiyonu bilinen genler ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular genomik bilginin oldukça az olduğu olgun böğürtlenler için önemli bir veri sağlamıştır.

Chen ve ark. (2016), yapmış oldukları çalışmada hasat sonrası çilek (*Fragaria vesca*) meyvelerinde eksojen oksin ve absisik asit yanıtında fizyolojik ve transkriptomik değişimleri araştırmışlardır. Eksojen IAA hasat sonrasında çileklerin olgunlaşma prosesini yavaşlatmakta iken ABA hasat sonrası olgunlaşmayı hızlandırmaktadır. Bununla birlikte, IAA ve ABA'nın birlikte uygulanması çilek meyvelerinde hasat sonrası olgunlaşmayı ne hızlandırmıştır ne de yavaşlatmıştır. Bu mekanizmanın araştırılmasında Illumina Hiseq 2000/2500 RNA dizileme platformunu kullanılmıştır. Moleküler düzeyde değerlendirildiğinde, AUX/IAA, ARF, TOPLESS ve E3 ubiquitin protein ligaz kodlayan genleri içeren IAA sinyali ile ilişkili genlerin ifadesi up regüle, pektin polimerizasyon, hücre duvarı degradasyonu, sükroz ve antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin ifadesi ise down regüle olmuştur. Eksojen ABA, meyve yumuşaması ile ilgili genleri ve *SKP1*, *HSPs*, *CK2*, ve SRG1'i kapsayan sinyal yolağı ile ilişkili genleri teşvik etmiştir. Farklı ifade olan genlerin %17'si IAA ve ABA'nın birlikte uygulandığı gruba özgü olmuştur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışmasında monoembriyonik bir çeşit olan 'Algerian Tangerin Ranch Selection Klemantin Mandarini' ve %99 oranında nüseller bitki üreten 'Orlando tangelo' kullanılmıştır. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin tespit edilmesi ve moleküler analizlerde kullanılmak üzere bu dönemlerde örnek temin edilmesi amacıyla melezleme çalışmaları yürütülmüştür. Melezleme çalışmalarında 'Fremont' mandarini baba olarak kullanılmıştır.

3.1.1. Fremont Mandarini (*C. clementina* Hort. ex Tan. X *C. reticulata* Blanco)

'Klemantin' ve 'Ponkan' çeşitleri melezidir. Erken yaşlarda meyveye yatar ve dik büyüme eğilimindedir. En koyu renkli mandarinlerden biridir. Çok verimli bir çeşittir ve periyodisiteye biraz eğilimlidir. Çok verimliliğinin yanında meyveler küçük olmaktadır. Soyulması güç, çok sulu ve çekirdekli bir çeşittir. Olgunluktan sonra ağaç üzerinde kalitesini kaybetmeden üç ay gibi uzun bir süre (Mart ayına kadar) kalabilir. Dünyada özellikle Türkiye'de Adana-Mersin bölgelerinde yetiştirilir. Genellikle Ortadoğu ülkelerine ihraç edilmektedir (Kafa ve Canıhoş, 2010). Nüseller embriyoniye eğilimi %50 oranındadır.

3.1.2. Klemantin Mandarini (*C. clementina* Hort. ex Tan)

Orijini hakkında farklı görüşler vardır. Birinci görüşe göre Akdeniz mandarini ile Granito turuncu arasındaki doğal melezleme sonucu meydana gelmiştir. Diğer bir görüş ise benzer özellikler taşıyan Çin'deki 'Canton' mandarini orijinli olduğu şeklindedir. 1890'lı yıllarda Cezayir'de göz mutasyonu ile meydana geldiği ve papaz Clement tarafından bulunduğu düşünülmektedir. Akdeniz havzası özellikle İspanya, Kuzey Afrika ve Güney Afrika'nın bir kısmında yetiştirilmektedir. İspanya ve Fas'ta en popüler mandarindir. Son dönemlerde çekirdeksiz seleksiyonları da elde edilmiştir

ve yüksek fiyattan pazarlanabilmektedir. Satsuma çeşidine göre daha sık taç oluşturur. Meyve kalitesi yüksektir ancak bazen meyveler küçük olmaktadır. Nemli subtropik ve tropik koşullara, Akdeniz iklimi kadar iyi adapte olamamaktadır. Eylül'den şubat'a kadar değişik dönemlerde olgunlaşan seleksiyonları vardır (Kafa ve Canıhoş, 2010). Klemantin mandarini monoembriyonik bir çeşittir.

3.1.3. Orlando Tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macfad)

'Duncan' altıntopu ile 'Dancy' mandarini melezidir ve 1931 yılında elde edilmiştir. Ağaçları büyük taç oluşturmakta ve Satsuma'dan sonra soğuklara en dayanıklı turunçgillerden biridir. Kabuk meyveye sıkı bağlıdır, soyulması kolay değildir. Tohum sayısı tozlayıcıların varlığı ve durumuna bağlıdır. Ortalama tohum sayısı 10-20'dir. Meyve eti sulu, portakal renkli ve kendine has bir tada sahiptir. Aralık-Ocak döneminde olgunlaşır. Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyallere ait resimler Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan turunçgil genotiplerinin meyve görüntüleri. A. Fremont mandarini, B. Klemantin mandarini, C. Orlando tangelo

3.2. Yöntem

3.2.1. Orlando Tangelo Çeşidinin Poliembriyoni Oranının Belirlenmesi

Orlando tangelonun poliembriyoni oranının belirlenmesi amacıyla meyve örnekleri toplanmıştır. Meyveler açılarak içerisinden çıkan tohumlar çeşme suyu altında yıkanarak temizlenmiştir. Her meyveye ait tohumlar ayrı ayrı değerlendirme

kapsamına alınmıştır. Meyvelerden çıkan tohumların tamamı bir toplu iğne yardımıyla parçalara ayrılarak birden fazla embriyo içerip içermediği belirlenmiştir. İki yıl üstüste yapılan sayım sonucunda bu çeşide ait poliembriyoni oranı tespit edilmiştir.

3.2.2. Melezleme Çalışmaları

Poliembriyonik olan Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin ne zaman farklılaşmaya başladığının histolojik olarak belirlenmesi, Orlando tangelo ve Klemantin mandarininde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin döllenmeden önce mi yoksa sonra mı oluştuğunun anlaşılması amacıyla çiçek tozu çim borusunun uzamalarının belirlenmesi ve moleküler analizlerde kullanılacak örneklerin temin edilmesi amacıyla melezleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla tez kapsamında kullanılan bitkisel materyallere ait balon aşamasındaki çiçeklerde emaskülasyon işlemi yapılmıştır. Emaskülasyon işlemi için çiçek salkımları üzerinde henüz açmamış, ancak açmak üzere olan olgun çiçek tomurcukları tercih edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Orlando tangeloda melezlemede seçilen çiçek boyutu

Seçilen tomurcuğun taç yaprakları ve erkek organları pistile zarar vermeden ince uçlu bir pens yardımıyla koparılarak alınmıştır. Bir gün öncesinden baba olarak kullanılan 'Fremont' mandarinine ait ağaçlardan toplanan anterler bir gece boyunca, sıcaklığı 20 °C'ye ayarlanmış bir ortamda parlak kağıtlar üzerinde bekletilerek patlaması sağlanmıştır. Melezleme için hazır hale getirilen çiçek tozları ışık almayan küçük kutulara yerleştirilmiştir. Çiçek tozları emaskülasyon işleminden sonra, pistilin stigması üzerine bir fırça yardımıyla aktarılmıştır. Melezleme çalışmaları için hazır hale getirilen çiçek tozları ile emaskülasyon işlemi ve fırça yardımıyla çiçek tozlarının stigma üzerine aktarılması Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Melezleme çalışmaları. A. Fremont mandarinine ait anterler. B ve C. Pens yardımıyla gerçekleştirilen emaskülasyon işlemi D. fırça yardımıyla çiçek tozlarının stigma üzerine aktarılması

Melezleme işlemi tamamlandıktan sonra dışarıdan herhangi bir yabancı çiçek tozunun stigma üzerine gelerek tozlanma olayını gerçekleştirmesini engellemek ve dış ortamdan izolasyonunu sağlamak için hava geçişine izin veren bez torbalar kullanılmıştır. Örnekler bez torbayla kapatıldıktan sonra etiketleme yapılmıştır. Melezleme çalışmaları sonrasında Orlando tangelonun genel görüntüsü Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4. Orlando tangeloda melezlemeler sonrasındaki genel görünüm

3.2.3. Histolojik ve Moleküler Analizler İçin Örneklerin Alınması

Melezleme işlemleri tamamlandıktan sonra, hemen ertesi günden başlayıp 15 gün boyunca bez torbalar içinden 250 tane pistil örneği alınmıştır. Histolojik analizler için alınan örnekler FPA 70 tespit çözeltisinin içine koyulmuş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir. 1 L FPA çözeltisi; 900 mL %70'lik alkol + 50 mL formaldehit (%40'lık formol çözeltisi) + 50 mL propionik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. 2013 yılında alınan örneklerin bir bölümü histolojik analizler için ayrılmıştır. Kalan bölümü ise moleküler analizlerde kullanılmak üzere sıvı azot (-196 °C) içerisine daldırılarak -85 °C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin tozlamadan daha önce gelişmeye başlayabileceği olasılığına karşı histolojik analizlerde kullanılmak üzere balon aşaması ve daha küçük aşamalara ait çiçekler de toplanmıştır. Çiçekler 3 farklı boya ayrılarak histolojik analizlerde kullanılmıştır. Orlando tangeloda balon aşaması ve daha küçük 2 boyuta sahip çiçeklerin görüntüsü Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Orlando tangeloda histolojik analizlerde kullanılan antezis öncesine ait 3 farklı çiçek boyutu

3.2.4. Histolojik Analizler

3.2.4.1. Çiçek Tozu Çim Borusunun Uzamasının Belirlenmesi

FPA 70 tespit çözeltisi içinde bulunan örneklerin her biri dokuların yıkanması için 1 gece yıkama setinde musluk suyu altında bekletilmiştir. Daha sonra, dokuların yumuşaması amacıyla 8 N NaOH çözeltisi içerisinde 5 saat bekletilmiştir. NaOH çözeltisinden çıkarılan örnekler tekrar yıkama setine alınıp yıkanmış ve daha sonra örnekler süzülerek anilin mavisi çözeltisi içine aktarılarak boyanmıştır (Eti, 1987). Çiçek tozu çim borusunun hangi günde karpel boşluğuna ulaştığını belirlemek amacıyla boyanan örnekler ile ezme preparatlar hazırlanmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Örneklerin yıkama setine alınması ve yıkanması aşamaları Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. A. FPA 70 çözeltisinde bulunan örnekler B. Örneklerin yıkama setine alınması. C. Örneklerin yıkanması

3.2.4.1.(1). Ezme preparat hazırlanması

Anilin mavisi çözeltisinden alınan örnek, bir lam üzerine alınarak dişicik borusunun yumurtalıkla birleştiği noktadan kesilmiştir. Yumurtalıktan ayrılan dişicik borusu, uzunlamasına ortadan ikiye kesilerek her birinin üstüne anilin mavisi damlatılmış ve üzerine lamel kapatılarak lam ile lamel arasında dikkatli bir şekilde ezilmiştir.

Ezme preperat haline getirilen örneklerde çiçek tozu çim boruları floresan mikroskopta incelenmiş ve ölçümleri öküler mikrometre ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çiçek tozu çim borularının uzunlukları dişicik borusu uzunluğuna oranlanarak çim borularının gelişme hızları belirlenmiştir.

3.2.4.2. Nüseller Embriyonun Başlangıç Hücrelerinin Belirlenmesi

Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin hangi dönemde farklılaşmaya başladığını tespit etmek amacıyla ovaryumlardan kesitler alınarak incelemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tozlamadan önce ve sonrasında temin edilen örnekler parafin bloklara yerleştirilmiş, ardından kesitler alınmış ve örneklerin boyanmasını takiben mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.2.4.2.(1). Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması

Örnekler parafin bloklar içerisine yerleştirilmeden önce sırasıyla %70, %85, %95, %100'lük Johansen çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Johansen karışımlarının içeriği Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Örnekler her bir alkol serisinde yaklaşık 2 saat bekletilerek ve vakum altında 30-35 dakika süreyle havaları alınmıştır. Daha sonra Tersiyer butil alkol (TBA-1) sıvısı içerisinde 1 gece, TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde 3'er saat bekletilmiştir. Daha sonra petri kapları içerisinde 60-65 °C'de eritilen sıvı parafin içerisine konulmuştur. Etüvde 60-65 °C'de 2-3 gün bekletildikten sonra, etüv dışına alınmış, buz üzerinde hızla soğumaya bırakılmış ve sertleşmesi sağlanmıştır (Gerlach, 1984).

Çizelge 3.1. Johansen karışımları

Alkol Karışım Konsantrasyonları (%)	Saf su (mL)	%96'lık Etil alkol (mL)	Tersiyer Bütil alkol (mL)
%70	300	500	200
%85	100	500	350
%95	-	450	550
%100	-	200	800

3.2.4.2.(2). Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması

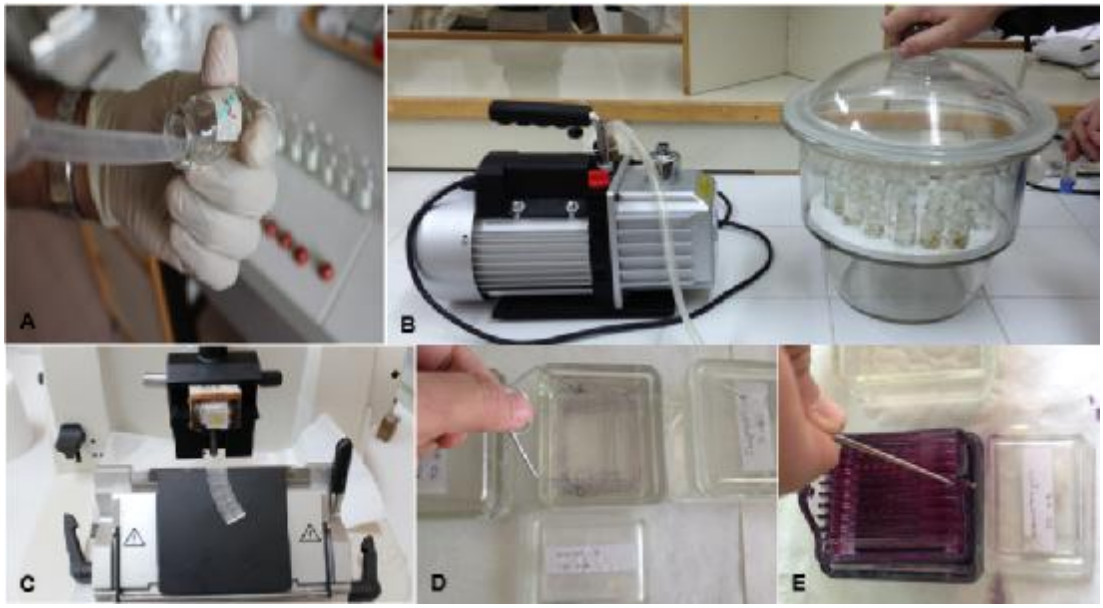
Örneklerin parafin bloklar içine alınması işleminden sonra örneklerin üzerindeki fazla parafin kesilmiştir. Daha sonra örnekler tahta bloklar üzerine yine parafin yardımı ile yapıştırılmıştır. Tahta bloklar üzerine alınan örneklerden rotasyon mikrotom kullanılarak 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitlerin etiketleme işlemi lamların kenarlarına yapılmıştır. Kesitlerin lamların üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla daha önceden hazırlanmış 1:1 oranındaki yumurta akı:gliserin karışımından oluşan sıvı, lamların üzerine sürülmüş ve daha sonra örneklerden alınan kesitler lamlara yerleştirilmiştir. Ardından lamlar 35-40 °C sıcaklığındaki sıcak yüzey (hot plate) üzerine konulmuştur. Sıcak yüzey üzerindeki her bir lama bir damlalık yardımıyla saf su ilave edilmiştir. Bu yolla kesitlerin su yüzeyinde yüzmesi

ve sıcaklığın yardımıyla suyun parafini gergin duruma getirmesi ve suyun buharlaşmasıyla birlikte kesitlerin lam üzerine gergin bir vaziyette yapışması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra lam üzerindeki kesitler bir gece boyunca 30-35 °C'deki etüv içerisinde bekletilmiştir.

3.2.4.2.(3). Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması

Lamlar, lam taşıyıcıları üzerine yerleştirilmiş ve 10'ar dk ksilol-1, ksilol-2'de bekletilerek parafinin erimesi ve örneklerden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamada örnekler ilk olarak izopropil alkol-1 ve izopropil alkol-2'de 5'er dk, daha sonra %96'dan başlayarak sırasıyla %70, %40, ve %20 olacak şekilde dereceleri azalan alkol küvetlerinde ve son olarak da saf su içerisinde 3'er dk bekletilmiştir.

Fiksasyon aşamasından sonra örneklerin boyanması işlemine geçilmiştir. Boyama işleminde hematoksilin boya çözeltisi kullanılmıştır. Hematoksilin boya çözeltisini hazırlamak için öncelikle 1 g hematoksilin, 6 mL etil alkol içerisinde eritilmiştir. Başka bir erlen içerisinde 12.5 g KAl_3SO_4 (potasyum aliminyum sülfat) 100 mL suda eritilmiş ve bu çözeltiye 0.18 g $KMnO_4$ (potasyum permanganat), 25 mL gliserin ve 25 mL metanol eklenmiştir. Daha sonra bu çözelti önceden eritilen hematoksilin ile karıştırılarak stok çözelti hazırlanmıştır. Boyama işleminde 1 birim stok çözelti, 10 birim saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Örnekler boyama sıvısı içerisinde 30 dk daha sonra su dolu bir kap içerisinde hafif akan çeşme suyu altında 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra boyanan örnekler başlangıçta izlenen alkol serilerinden ters yönde yeniden geçirilmiştir. Boyanan örnekler %20, %40, %70, %96'lık alkolde yine 3'er dk bekletilmiş ve izopropil alkolde 5'er dk bekletilerek ayrı bir ksilol kabı içerisine alınmıştır. Ksilol kabı içerisinden alınan lamların üzerindeki ksilol iyice süzülerek ve üzerlerine Entellan (yapıştırıcı) damlatılarak birer lamel ile kapatılmıştır. Bu şekilde devamlı preperat haline getirilen örnekler 30 ºC'deki etüvde bekletilerek incelemeye hazır hale getirilmişlerdir (Gerlach, 1984; Stösser ve ark., 1985). Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen histolojik analiz aşamaları Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen histolojik analiz aşamaları. A. Örneklere Johansen çözeltisi eklenmesi. B. Örneklerin havalarının alınması. C. Kesit alınması. D. Örneklerin alkol serilerinden geçirilmesi. E. Örneklerin boyama sıvısı içerisinde bekletilmesi.

3.2.4.2.(4). Örneklerin İncelenmesi

Boyama sonucunda incelemeye hazır hale gelen örnekler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Örneklerin incelenmsinde Olympus marka floresan mikroskop kullanılmıştır (Şekil 3.8). Mikroskobik incelemelerde Klemantin mandarini ve Orlando tangeloda çiçek tozu çim borularının tozlanmadan sonra kaçıncı günde karpel boşluğuna ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca Orlando tangeloda ovaryumlardan kesit alınan örneklerde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin hangi çiçek döneminde farklılaşmaya başladığı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. İncelemelerin gerçekleştirildiği floresan mikroskobu

3.2.5. Moleküler Analizler

Histolojik analizler sonucunda Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin tespit edilmesinin ardından moleküler analizlerde kullanılan örneklerin hangi dönemlere ait olacağı tespit edilmiştir. RNA-Seq analizleri için Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı tozlamadan sonraki 3. gün ile bu dönemin öncesindeki balon aşaması ve 1. gün ayrıca bu dönemin sonrasındaki 5. gün örnekleri kullanılmıştır. Örneklerin kendi içerisinde karşılaştırılmasına ek olarak monoembriyonik çeşit olan Klemantin mandarininde balon aşaması ile tozlanmadan sonraki 3. güne ait örnekler kullanılmıştır. Moleküler analizlerde kullanılan örneklerin stigma ve stil bölümleri koparılarak uzaklaştırılmıştır. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin gelişim gösterdiği ovaryum dokuları RNA izolasyonu amacıyla sıvı azot içerisine daldırılmış ve ardından -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.1. RNA İzolasyonu

Turunçgillerde nüseller embriyoni mekanizmasında görev alan genlerin belirlenmesi amacıyla öncelikle turunçgil ovaryumlarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonu için iki farklı ekstraksiyon buffer hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Buffer I: Bu solüsyonun hazırlanmasında %2 CTAB (Sietiltrimetil amniyum bromid), 25 mM EDTA (Etilen daimin tetra asedik asit), 100 mM Tris-HCL (Merck) (pH:8), 2.0 M NaCl (Merck), 0.5 g/L Spermidin (Sigma Aldrich) ve %2 PVP (Polyvinilpirolidon MA: 2.5g/mol Merck) kullanılmıştır.

Solüsyon 121 °C'de 20 dakika otoklav edilmiştir. Kullanılmadan önce 50 µg/ml proteinaz K (Qiagene) eklenmiştir.

Ekstraksiyon Buffer II: Bu solüsyonun hazırlanmasında %2 CTAB, 1 mM, 10 mM Tris-HCL (Merck) (pH:8), 1.0 M NaCl (Merck), 0.5 g/L Spermidin (Sigma Aldrich) ve %0.5 Sodyum doesil sulfat (SDS Merck) kullanılmıştır.

Ekstraksiyon Buffer II 121 °C'de 20 dakika otoklav edilmiş ve kullanılmadan önce 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır.

Diğer Solüsyonlar (Merck): RNA izolasyonunda ayrıca Kloroform isoamil alkol (24:1), Otoklavlanmış ve 4 °C'de muhafaza edilmiş 10 M Lityum Klorit, %70'lik Etanol (DEPC ile hazırlanmış saf etanol), İsopropanol (DEPC ile hazırlanmış) 3 M Sodyum Asetat (NaOAc, pH:5.2) solüsyonları kullanılmıştır.

3.2.5.1.(1). RNA İzolasyon Aşamaları

- Örnekler havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmüştür.
- Öğütülmüş örneklerden 100 mg alınarak 2mL'lik tüplere aktarılmış ve üzerlerine 65 °C'ye getirilmiş Ekstraksiyon Buffer I eklenmiştir. Daha sonra hızlı bir şekilde 20 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.
- Bu solüsyon 65 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
- Örnekler 10 000xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant 2 mL'lik tüplere transfer edilmiş ve eşit hacimli kloroform:isoamilalkol (24:1) eklenmiştir. Ardından 13 000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant yeni tüplere aktarılmış ¼ hacminde 10 M LiCl eklenmiştir. Tüpler yavaşça ters çevirilip 4 °C'de bir gece bekletilmiştir.
- Tüpler 20 000xg'de 40 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir.

- Pelet 500 µL %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır (Bu aşama iki defa tekrar edilmiştir).
- 300 µl önceden ısıtılmış ekstraksiyon buffer II pelete eklenmiş, 65 °C'lik su banyosu öncesinde 15 dakika erimesi beklenmiştir.
- Eşit hacimli 24:1 kloroform ve isoamilalkol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Karışım 13000 xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir (Bu aşama iki kere tekrar edilmiştir).
- Üzerine 0.1 oranında 3 M NaOAc (pH:5.2) ve 0.6 oranında isopropanol eklenerek karıştırlmış ve -20 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- Tüpler 20000xg'de 30 dk 4 °C'de santrifüj edilmiş ve pelet %70'lik etanol ve soğuk su ile yıkanmış, ardından 15 dk havlu üzerinde kurutulmuştur.
- Elde edilen RNA üzerine 30 µl DEPC su ve DNase I (1 ünite/L µg RNA) eklenmiştir.

3.2.5.1.(2). RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ve Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ile ölçülmüştür. RNA kalitesi ise 28S ve 18S ribozomal RNA alt birimlerinin varlığı ile değerlendirilmiştir. RNA'nın alt birimlerinin varlığı agaroz jel elektoroforezi ile belirlenmiştir. Bu amaçla %1 oranında agaroz gel hazırlanmıştır. Agaroz jel içerisine %0.05 oranında etidyum bromid eklenmiştir. İzole edilen RNA örneklerinden ise 1 µL alınmış üzerine 1 µL 6X yükleme boyası ve 5 µL ddH_2O eklenerek 120 voltta 2 saat süreyle koşturulmuştur. Agaroz jel UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.5.2. RNA Sekanslama Analizleri

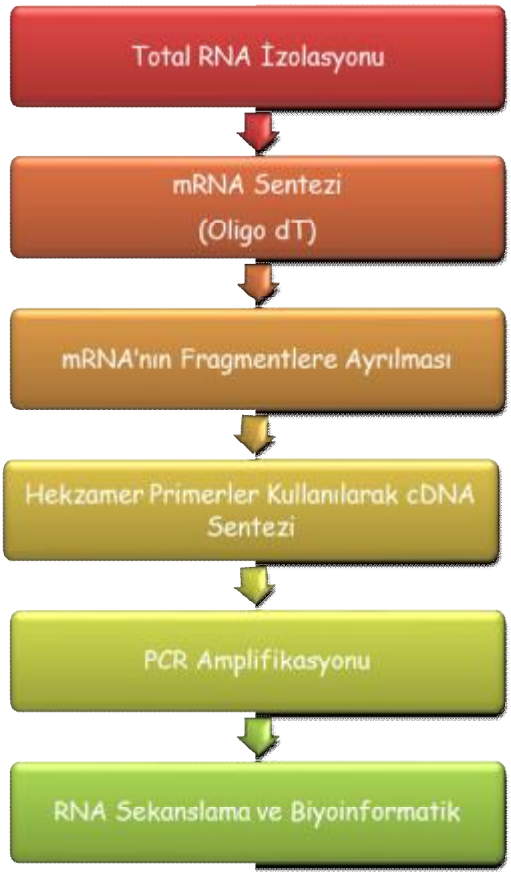
RNA sekanlama çalışmaları Beijing Genomics Institute (BGI) bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan örneklerin RNA izolasyonu ve herhangi bir DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla kullanılan Dnase 1 uygulamasından sonra mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA'lardan

mRNA'ların izole edilmesinde manyetik bilyeler kullanılmıştır. Yöntem olarak ise Oligo dT tekniği tercih edilmiştir. mRNA'ların izole edilmesinden sonra her örnek üzere fragmentasyon bufferı eklenerek mRNA'ların parçalara ayrılması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında mRNA'ların kalıp olarak kullanılması ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kısa cDNA zincirleri EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) buffer içerisinde çözülmüş ve saflaştırılmıştır. Bu şekilde RNA sekanslamada kullanılan kütüphane oluşturulmuştur. Daha sonra kütüphane Illumina HiSeq™ 2000 cihazı (Şekil 3.9) kullanılarak sekanslanmıştır.



Şekil 3.9. RNA-Seq Analizlerinde Kullanılan Cihaz

RNA sekanslama işlemleri sırası ile Şekil 3.10'da şematize edilmiştir.



Şekil 3.10. RNA Sekanslama İşlemleri

3.2.5.3. Sekansların Filtrelenmesi

RNA-Seq sonrasında elde edilen dizilerin tamamı ham veri olarak adlandırılmaktadır. RNA örneklerinin hazırlığı sırasında kullanılan adaptörler ve bilinmeyen okumaların sekanslardan çıkarılması gerekmektedir. Bunlar internal software kullanılarak aşağıdaki aşamalardan geçirilerek filtrelenmiştir.

1. Sekansların adaptörlerden ayrılması
2. Sekansların bilinmeyen baz okumalarından ayrılması
3. Düşük kaliteli sekansların ayrıştırılması (%10'dan küçük kalitede olan okumalar)

Filtreleme işleminden sonra ham sekanslar temiz sekanslar (Clean Reads) olarak ifade edilmektedir. Temiz okumalar FASTQ formatında saklanmıştır.

3.2.5.4. Sekansların Referans Genomla Hizalanması

Tez çalışmasında elde edilen RNA sekansları referans olarak kullanılan *Citrus clementina*'ya ait daha önceden ortaya çıkarılmış genom bilgisiyle karşılaştırılmıştır. Referans genom Uluslararası Turunçgil Genom Konsorsiyumu tarafından NCBI (National Center for Biotechnology Information) genom bankasına yüklenmiştir. Genom boyutu ise 301.365 Mb olarak bildirilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen diziler ile referans genom hizalanmıştır. Tüm örnekler için yapılan hizalama sonucunda ortaya çıkan mükemmel eşleşme oranı ortaya çıkarılmıştır. Genom hizalama verileri BAM formatında kaydedilmiş ve IGV (Ietegrative Genomics Viewer) programında görüntülenmiştir.

3.2.5.5. Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

RNA dizilerinin referans genomla karşılaştırılmasının ardından ifade olan genler ve ifade seviyeleri belirlenmiştir. Ekspresyon seviyesini belirlemek için FPKM metodu (Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped) kullanılmıştır. FPKM hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$FPKM= (10^6 \text{ X } C)/(NL/10^3)$$

FPKM değeri hesaplanırken kullanılan formüldeki C; hedef genle tam olarak eşleşen fragment sayısını, N; tüm genlerle tam olarak eşleşen fragment sayısını, L ise; hedef genin baz sayısını ifade etmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan tüm örneklerde ifade olan genler ve ifade seviyeleri FPKM değeri hesaplanarak belirlenmiştir. Böylece örnekler arasında ifade olan ortak ve farklı genler ortaya çıkarılmıştır. Bu farklılık ve benzerlikler örnekler arasında kümeler oluşturularak gösterilmiştir. Her örneğin FPKM değerleri

gözönünde bulundurularak örnekler arasında gen ifade seviyelerine dayalı olarak korelasyon değerleri de hesaplanmıştır.

3.2.5.6. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Belirlenmesi

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin belirlenmesi ve bu farklılıkların hesaplanması amacıyla "Poisson Distrubition" yöntemi kullanılmıştır. Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genler belirlendikten sonra gen ekspresyonu cluster analizleri javaTreeview programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cluster analizleri sonucunda elde edilen heatmap'lerde farklı seviyelerde ifade olan genler farklı renklerle temsil edilmiştir.

3.2.5.7. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Ontoloji (GO) Analizleri

Tez kapsamında kullanılan örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlere ait ontoloji analizleri http://www.geneontology.org veri bankası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GO moleküler fonksiyon, hücresel komponent ve biyolojik proses olarak üç farklı sınıflandırma içermektedir. Çalışma sonucunda örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genler bu sınıflandırmaya göre gruplandırılmıştır.

3.2.5.8. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Yolak Analizleri

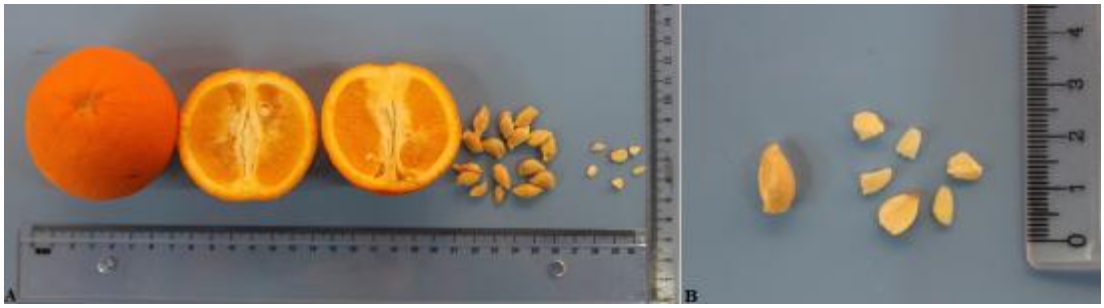
Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlere ait yolak analizleri KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri bankası kullanılarak tespit edilmiştir. Yolak analizleri ile genlerin biyolojik fonksiyonları daha detaylı olarak anlaşılmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında nüseller embriyo ile ilişkili genlerin tespit edilmesi amacıyla İllumina HiSeq 2000™ platformu kullanılarak RNA-Seq çalışmaları yürütülmüştür. RNA sekanslama analizlerinde kullanılan örneklerin belirlenmesi amacıyla ilk olarak poliembriyonik çeşit olan Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin hangi dönemde farklılaşmaya başladığı belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin tozlanma ve döllenmeden önce mi ya da daha sonra mı farklılaşmaya başladığını anlamak amacıyla çiçek tozu çim borularının uzaması da histolojik analizler ile incelenmiştir. Hem histolojik analizlerde kullanılan örneklerin hem de moleküler çalışmalar için gerekli örneklerin temini için melezleme çalışmaları yürütülmüştür. Bununla beraber Orlando tangelo çeşidinin poliembriyoni oranının belirlenmesi amacıyla meyve örneklerinden tohumlar alınarak embriyo durumları değerlendirilmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular Orlando tangelonun poliembriyoni oranının belirlenmesi, histolojik ve moleküler analizler olmak üzere üç ana başlık içerisinde sunulmuştur.

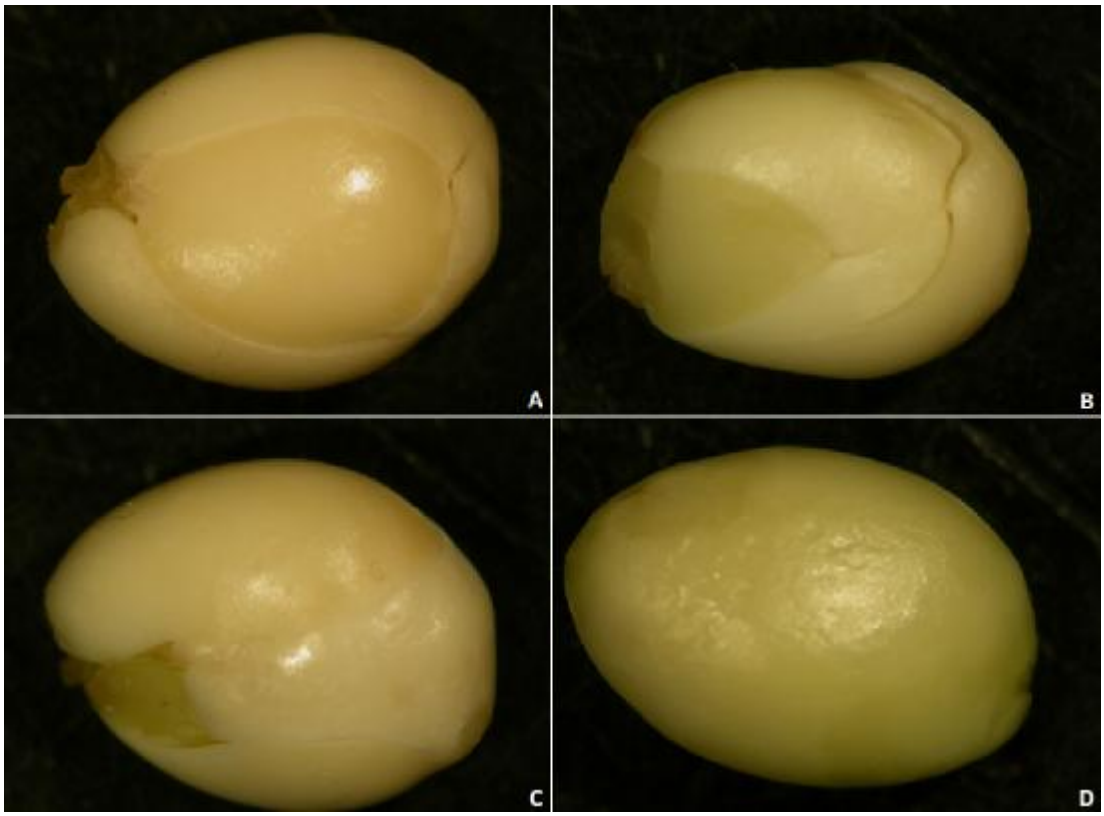
4.1. Orlando Tangelo Çeşidinin Poliembriyoni Oranının Belirlenmesi

Tez kapsamında yüksek poliembriyoni oranına sahip olmasından dolayı tercih edilen Orlando tangelonun poliembriyoni oranının teyit edilmesi amacıyla serbest tozlanma koşullarından meyve örnekleri toplanmıştır. Bu amaçla toplam 50 meyve toplanmıştır. Her meyve içerisinden çıkarılan tohumlar temizlendikten sonra bir toplu iğne yardımıyla embriyo taşıyan bölümleri ayrılmıştır. Bu şekilde birden fazla embriyo içerip içermedikleri tespit edilmiştir. Yapılan sayımlar sonucunda meyve başına düşen ortalama tohum sayısı 16.22 olarak tespit edilmiştir. Tohumlarda yapılan incelemeler sonucunda ise poliembriyoni oranının %99.16 olduğu belirlenmiştir. Tohum başına düşen embriyo sayısı ise ortalama 4.3 olarak hesaplanmıştır. Orlando tangelo meyvesinden elde edilen tohumlar ve embriyoların bulunduğu tohum parçalarına ait görüntü Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. A. Orlando tangelo meyvesi ve tohumları, B. Orlando tangelo tohumunun poliembriyoni durumu

Orlando tangelo meyvesine ait poliembriyonik tohumlar ile Klemantin mandarini meyvesine ait monoembriyonik tohumunun stereo mikroskop altında alınan görüntüleri Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. A, B, C. Orlando tangelo meyvesine ait poliembriyonik tohumlar, D. Klemantin mandarini meyvesine ait monoembriyonik tohum

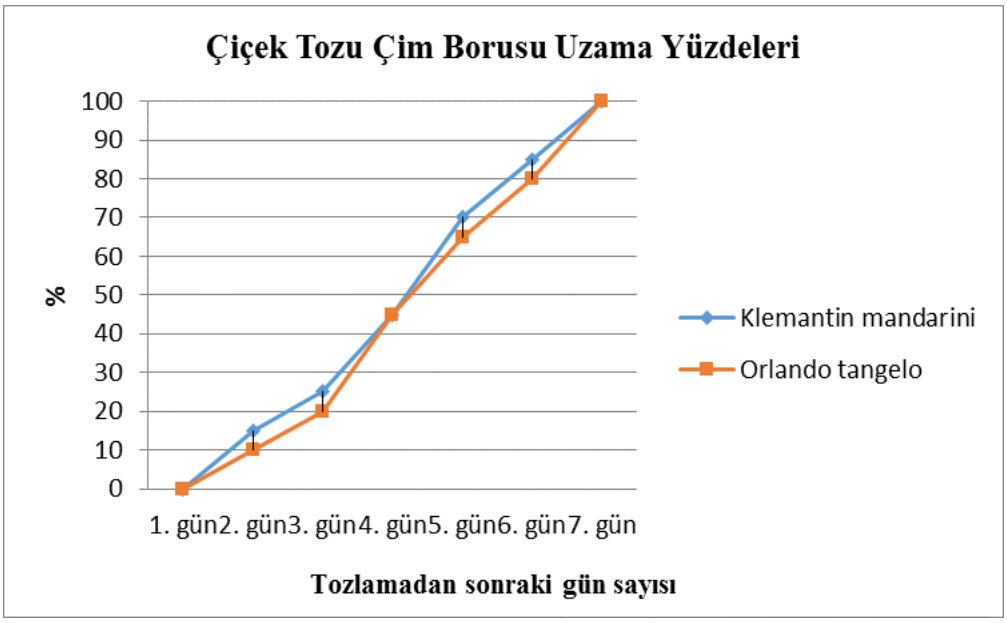
Şekil 4.2 incelendiğinde Orlando tangeloya ait tohumların poliembriyonik olduğu rahatlıkla anlaşılabilmektedir. Klemantin mandarininde ise tohumun tek embriyodan oluştuğu yani monoembriyonik olduğu görülmektedir.

Turunçgillerde poliembriyoni oranları ya da durumları tür ve çeşitlere göre farklılık göstermektedir. Anaçların tohumdan üretilebilmesi ya da bilimsel çalışmalarda tohumlardan açılım meydana gelmeden bitki elde edilebilmesi açısından yüksek poliembriyoni oranı önem arz etmektedir. Öte yandan özellikle ıslah çalışmalarında yüksek poliembriyoni oranı tercih edilen bir durum değildir. Melezleme çalışmaları sonrasında elde edilen tohumlarda açılım olmaması, elde edilen bitkilerin anne ebeveyn ile tamamen benzer olması sonucunda bu ebeveynlerin gerçek performansları görülememektedir. Turunçgillerde poliembriyoni oranının belirlenmesi için yürütülmüş birçok çalışma mevcuttur. Özellikle moleküler markırlar kullanılarak melezleme çalışmaları sonucunda elde edilen bireylerin melez olup olmadıkları kolaylıkla tespit edilebilmektdir. Moleküler markırların kullanımının yaygınlaşmasından önce izozim markırları kullanılarak turunçgilerde poliembriyoni oranları belirlenmeye çalışılmıştır. Bowman ve ark. (1995) 'Smooth Flat Seville', 'Yuma' ve 'Cipo' çeşitlerinde poliembriyoni oranını izozim markırlarıyla araştırmışlardır. Çalışma sonucunda poliembriyoni oranlarının %29 ile %98 arasında olduğu, her tohumdan ise 0-4 arasında bitki oluştuğu belirlenmiştir. Garcia ve ark. (1999), 'Volkameriana' limonu ve 'Rubidoux' melezlemesi sonucunda elde ettikleri bitkilerin nüseller embriyoni ya da zigotik embriyodan köken aldığını belirlemek için izozim markırları kullanmışlardır. Moleküler markır teknolojilerinin geçtiğimiz 20 yıl içerisinde hızla gelişim göstermesi ile turunçgillerde de kullanımları yaygınlaşmıştır. Farklı moleküler markır teknikleri poliembriyoni oranı ya da melez adayı bitkilerinin melez olup olmadıklarının tespitinde başarıyla kullanılmıştır. Nageswara Rao ve ark. (2008), mandarin ve şadok melezlemesi sonucunda elde ettikleri 204 bitkinin nüseller olup olmadıklarının kontrolünü RAPD ve EST-SSR markırları ile gerçekleştirmişlerdir. Golein ve ark. (2011) ise ISSR markırlarının nüseller bitkileri ayırma gücünü incelemiştir. Farklı turunçgil tür ve çeşitlerinde gerçekleştirdiği melezlemeler sonucunda elde ettikleri 227 bitkinin zigotik ya da nüseller olduklarını ISSR markırlarıyla kontrol etmişlerdir. Çalışma sonucunda 67 bitkinin melez, 160 bitkinin ise nüseller olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç ISSR markırlarının turunçgillerde poliembriyoni tespitinde etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir.

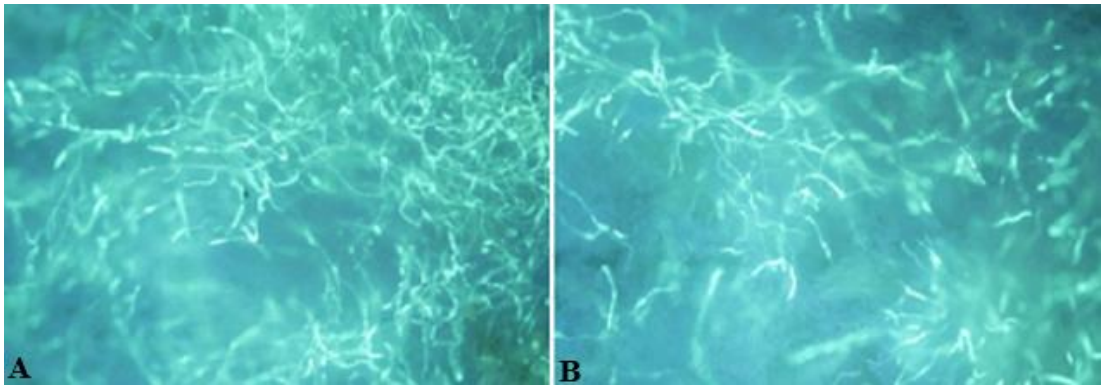
4.2. Histolojik Analizler

4.2.1. Çiçek Tozu Çim Borusunun Uzamasının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan ve yüksek oranda poliembriyoni oranına sahip Orlando tangelo ve monoembriyonik bir çeşit olan Klemantin mandarininde tozlamadan sonra çiçek tozu çim borusunun karpel boşluğuna kaçıncı günde ulaştığını tespit etmek amacıyla histolojik analizler yapılmıştır. Bu amaçla tozlanmadan sonraki günlerde alınan örneklerde ezme preparatlar hazırlanarak çiçek tozu çim borusunun gelişimi incelenmiştir. Orlando tangeloda yapılan incelemeler sonucunda çiçek tozu çim borusunun karpel boşluğuna tozlanmadan 7 gün sonra, Klemantin mandarininde ise 6 gün sonra ulaştığı tespit edilmiştir. Her iki çeşide ait çiçek tozu çim borusu uzama yüzdelerini gösteren grafik gün bazında Şekil 4.3'te çiçek tozlarının ilerlemesine ait elde edilen mikroskobik görüntülerden bazıları ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Orlando tangelo ve Klemantin mandarininde çiçek tozu çim borusu uzama yüzdeleri



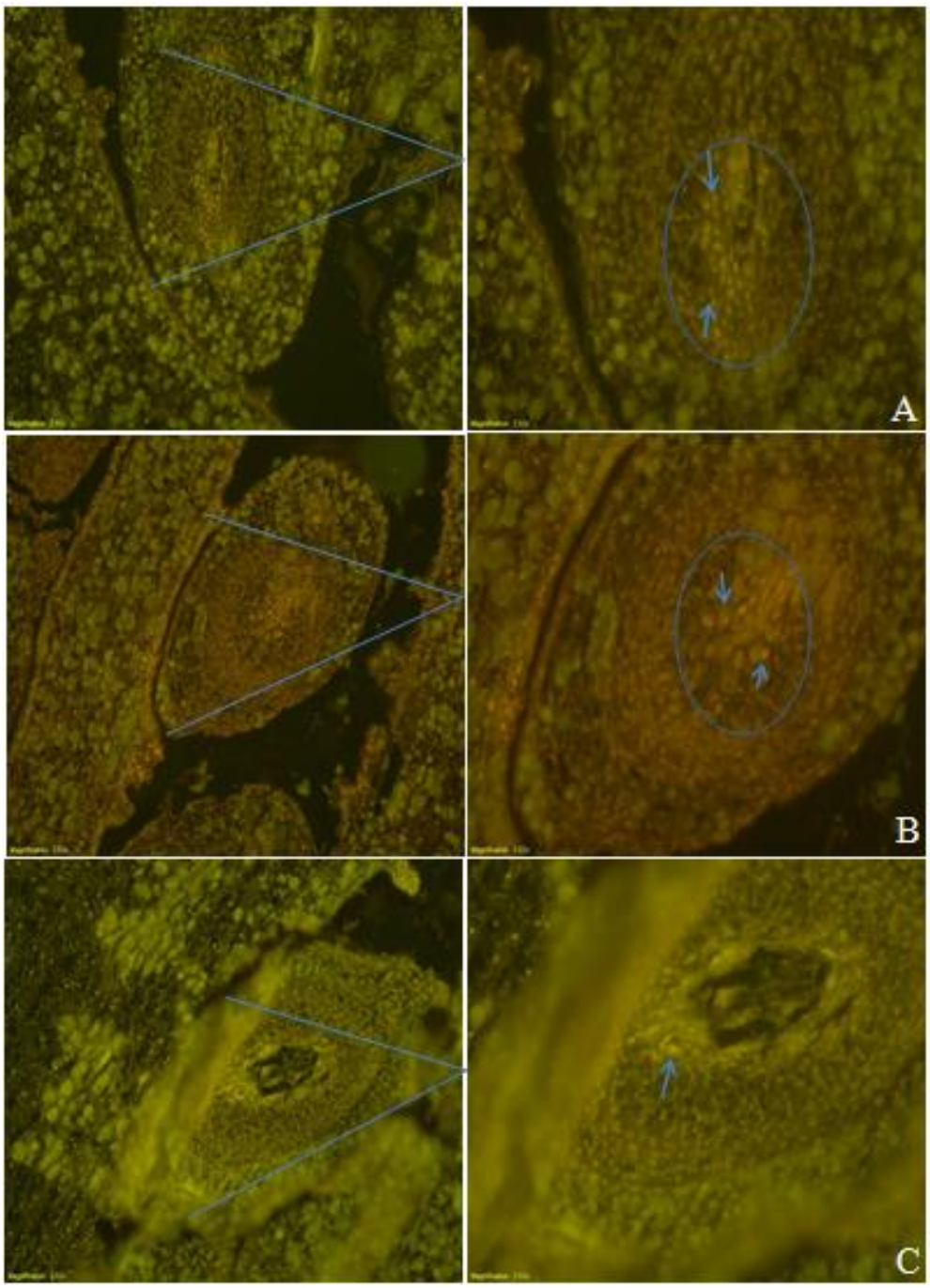
Şekil 4.4. Orlando tangelo (A) ve Klemantin mandarini (B) çeşitlerinde çiçek tozu çim borusu ilerlemesi

Turunçgillerde kendileme ve melezleme çalışmaları sonucunda çiçek tozu çim borularının uzaması ve karpel boşluğuna ulaşma sürelerinin farklı zaman aralıklarında olduğu görülmüştür. Bunun en büyük sebebi genotipsel farklılıklar ile o dönem içerisinde yaşanan iklim koşulları olarak gösterilebilir. Kahn ve DeMason (1988), Orlando tangeloda çiçek tozu çim borusu gelişimini incelemek amacıyla yürüttükleri çalışmada çiçek tozlarının ovaryuma tozlamadan sonraki 6. günde ulaştığını tespit etmişlerdir. Distefano ve ark. (2009) kendine uyuşur olduğu bilinen 'Monreal' klemantin mandarininde yaptıkları kendileme çalışmaları sonucunda çiçek tozu çim borusunun 144. saatte yani tozlamadan sonraki 6. günde karpel boşluğuna ulaştığını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, kendine uyuşmazlık özelliği gösteren Algerian Tangerine Ranch Selection Klemantin Mandarininde farklı tozlayıcı çeşitler kullanılarak çiçek tozu çim borusunun gelişimini incelemişlerdir. Çalışmada iki yıl üst üste yapılan melezlemeler sonucunda çiçek tozlarının karpel boşluklarına, tozlamadan sonraki 5-12 gün aralığında ulaştığını bildirmişlerdir (Eti ve Stösser, 1988). Tez çalışmasında ise Klemantin mandarininde çiçek tozu çim borusunun tozlamadan sonraki 6. günde, Orlando tangeloda ise 7. günde ulaştığı belirlenmiştir.

4.2.2. Nüseller Embriyoların Başlangıç Hücrelerinin Gelişim Zamanlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan ve poliembriyonik olduğu bilinen Orlando tangeloya ait histolojik incelemeler gerçekleştirilerek nuseller embriyo başlangıç hücrelerinin oluşum zamanları tespit edilmiştir. Histolojik analizlerde balon

aşamasındaki çiçek ve daha öncesine ait iki boyuttaki çiçeğe ait ovaryumlar ile tozlamayı takiben alınan örneklerde incelemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda tozlamayı takip eden 3. günde farklılaşmaların meydana gelmeye başladığı tespit edilmiştir. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin oluşum zamanlarını belirlemek için gerçekleştirilen bazı mikroskobik resimler Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Orlando tangeloda yapılan histolojik incelemelerde antezis aşamasından önce herhangi bir nüseller embriyo başlangıç hücresinin farklılaşma göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Orlando tangeloda farklılaşmış nüseller embriyo hücreleri. A. antezisten sonraki 3. gün, B. 4. gün, C. 5. gün

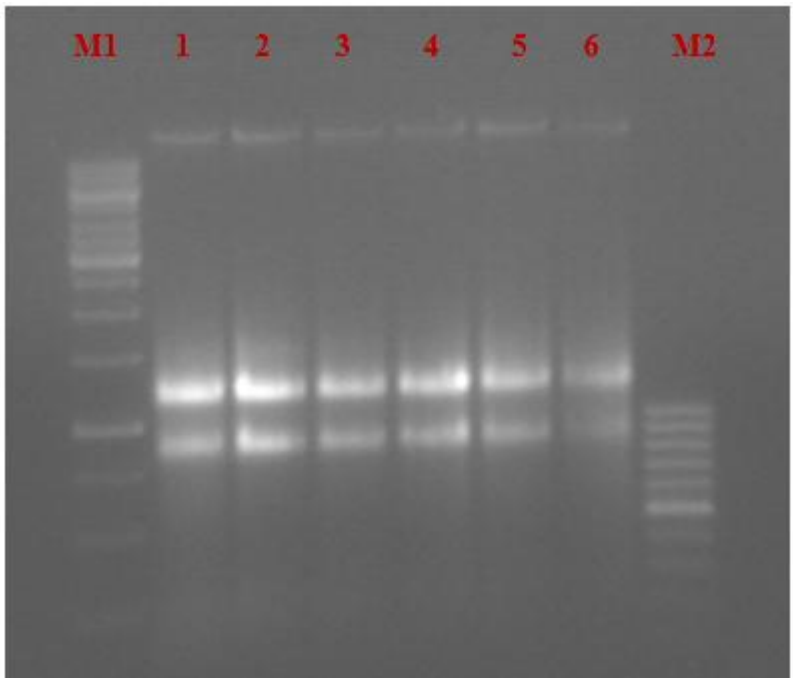
Turunçgillerde nüseller embriyo ve başlangıç hücrelerinin gelişimlerini inceleyen çalışmalara bakıldığında nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin genellikle çiçeklerin balon aşamasında farklılaşmaya başladığı tespit edilmiştir. Wakana ve Uemoto (1988), altı farklı turunçgil çeşidinde nüseller embriyo başlangıç

hücrelerinin antezisten önce oluştuğunu bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise Koltunow ve ark. (1995) 'Valencia' portakalında nüseller başlangıç hücrelerinin antezis aşamasında farklılaştığını bildirmişlerdir. 'Vaniglia Sanguigno' portakalında yürütülen bir çalışmada nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmasını histolojik olarak incelemişler ve farklılaşmanın antezisten 1-2 gün önce gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Kumar ve ark., 2014). Ancak turunçgillerde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin genellikle antezisten 1 hafta önce ya da 1 hafta sonrası kadar aralığında genotipe göre farklı zamanlarda farklılaşma gösterebileceği belirtilmiştir (Kepiro ve Roose, 2007). Yürütülen tez çalışmasında yüksek oranda nüseller embriyolar üreten Orlando tangelo genotipinde nüseller başlangıç hücreleri tozlamayı takip eden 3. günde tespit edilmiştir. Orlando tangeloda çiçek tozu çim borusunun 7. günde ovaryuma ulaştığı belirlenmiştir. Bu iki sonuç birleştirildiğinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı dönem döllenmeden önce olmaktadır. Apomiksis olayının oluşumunda döllenmenin gerekli olup olmadığı konusunda farklı görüşler ortaya atılmıştır. Tozlanmamış çiçeklerin ovüllerinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin oluştuğu, ancak gelişemediği bildirilmiştir (Esen ve Soost, 1977). Ancak bu görüşün aksine yürütülen bazı *in vitro* çalışmalarda tozlanmamış çiçeklere ait ovüllerin basit besin ortamında nüseller embriyo gelişimlerini tamamlayarak bitkicik oluşumunu sağladıkları belirlenmiştir (Wakana ve Uemoto, 1987, 1988; Koltunow, 1993; Koltunow ve ark., 1995). Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular değerlendirildiğinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin döllenme olmadan farklılaşmaya başladığı tespit edilmiştir. Farklılaşmanın tozlama sonrasında olması ise farklılaşma için tozlanmanın zorunlu olduğunu ifade etmemektedir. Bu farklılaşmanın genotiplere göre değişiklik gösterdiği görüşü daha ağır basmaktadır. Son yıllarda yürütülen histolojik çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (Koltunow ve ark., 1995; Kumar ve ark., 2014).

4.3. Moleküler Analizler

4.3.1. RNA İzolasyonu

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen moleküler analizler için bitkisel materyallerden RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda ovaryum örnekleri kullanılmıştır. RNA izolasyonları sonucunda elde edilen RNA kalite ve miktarları agaroz jelde koşularak, Nanodrop ve Agilent Bioanalyzer 2100 kullanılarak belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.6. Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyalden izole edilen RNA'lara ait agaroz jel görüntüsü. M1: 1kb DNA Marker, 1: Orlando tangelo balon, 2: Orlando tangelo 1. gün, 3: Orlando tangelo 3. gün, 4: Orlando tangelo 5. gün, 5: Klemantin mandarini balon, 6: Klemantin mandarini 3. gün

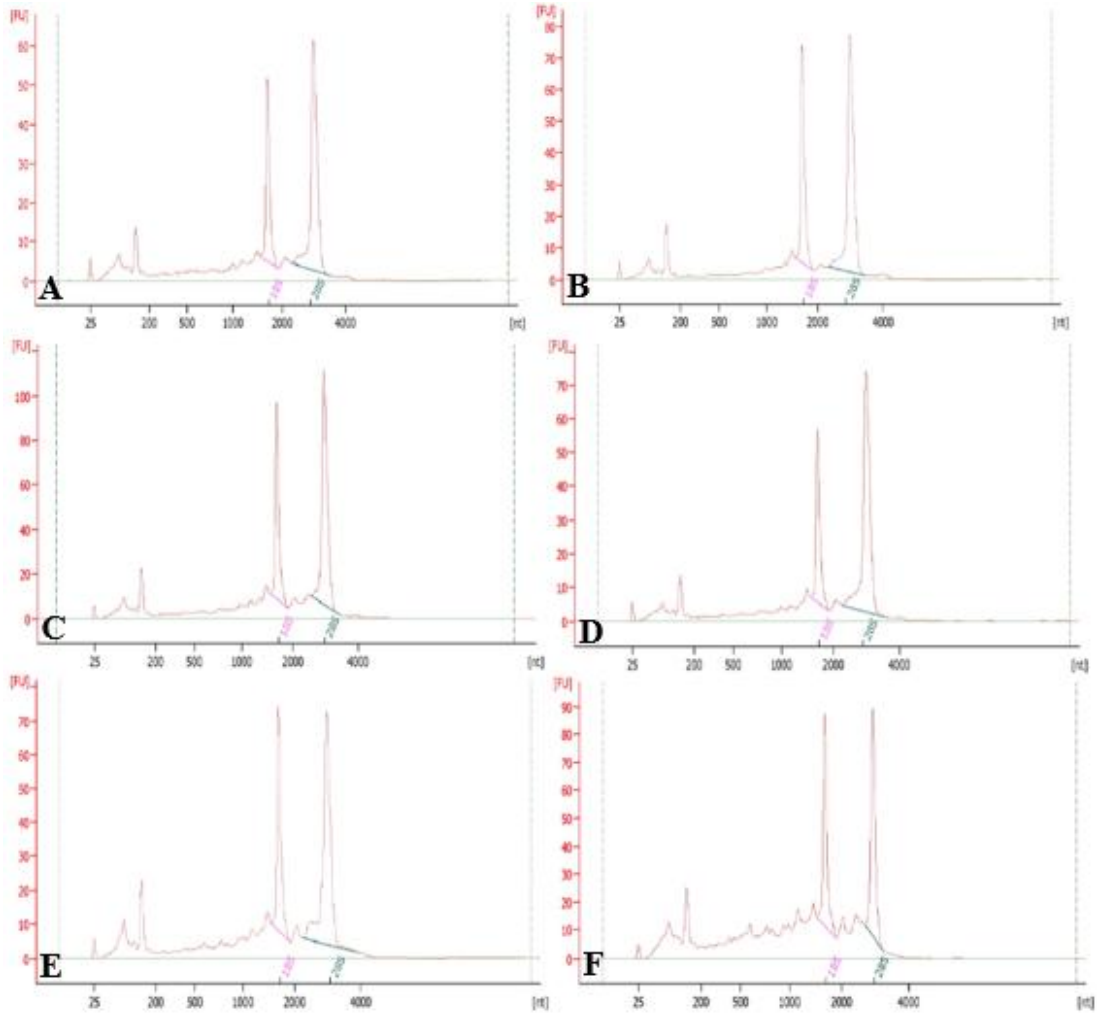
Agaroz jel elektroforezi sonuçları incelendiğinde ribozomal RNA'ların alt birimleri olan 28S ve 18S rRNA'ların net olarak gözlendiği ve 28S'in 18S'e göre daha parlak olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca silikte olsa 5s alt biriminin de varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında kullanılan RNA örneklerinin kalite ve

miktarlarına spektrofotometre araçlığıyla da bakılmıştır. Nanodrop ile yapılan ölçümler sonrasında elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan RNA örneklerinin Nanodrop ile yapılan ölçümlerine ait sonuçlar

Örnek	**ng/µL**	**A260**	**260/280**	**260/230**
Orlando tangelo balon aşaması	462.98	11.575	2.13	2.37
Orlando tangelo 1. gün	475.66	11.892	2.14	2.36
Orlando tangelo 3. gün	338.06	8.452	2.11	2.37
Orlando tangelo 5. gün	484.62	12.115	2.10	2.35
Klemantin mandarini balon aşaması	352.09	8.802	2.13	2.38
Klemantin mandarini 3. gün	304.27	7.607	2.14	2.26

RNA örneklerine ait spektroformetrik sonuçlar değerlendirildiğinde elde edilen RNA miktarlarının 304.27 ile 484.62 ng/µL arasında değiştiği belirlenmiştir. 260/280 nm verdikleri dalga boylarının da 2.10 ile 2.14 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bu sonuç RNA'nın yüksek kalitede olduğu ve protein kontaminasyonu içermediğini göstermektedir. 260/230 nm dalga boyundaki absorbans değerleri incelendiğinde RNA örneklerinin 2.26 ile 2.42 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde polisakkarit kontaminasyonu olmadığı belirlenmiştir. Çalışma kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen RNA'ların kaliteleri Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ile doğrulanmıştır. Bioanalyzer ile yapılan ölçümler sonucunda tüm örnekler için elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Agilent Bioanalyzer ile yürütülen RNA Analiz Sonuçları. A. Orlando tangelo balon aşaması, B. Orlando tangelo 1.gün, C. Orlando tangelo 3. gün, D. Orlando tangelo 5. gün, E. Klemantin mandarini balon aşaması, F. Klemantin mandarini 3. gün

Bioanalyzer sonuçları incelendiğinde tüm örnekler için RNA'nın alt birimleri olan 28S ve 18S'in başarılı bir şekilde elde edildiği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde izole edilen RNA'ların RNA-Seq analizleri için uygun olduğu belirlenmiştir.

4.3.2. RNA Sekanslama Analizleri

Turunçgillerde nüseller embriyo oluşum mekanizmasında görev alan genlerin belirlenmesi amacıyla yürütülen bu tez çalışmasında RNA-Seq analizleri Illumina

HiSeq™ 2000 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekanslama analizlerinde poliembriyonik bir çeşit olan Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı tozlamadan sonra 3. gün örneği ile 5. gün ve farklılaşmanın henüz başlamadığı 1. gün ve balon aşaması örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca kontrol olarak monoembriyonik bir çeşit olan Klemantin mandarininde tozlamadan sonra 3. gün ile balon aşamasına ait örnekler kullanılmıştır. Tüm örneklerde dizileme çalışmalarının tamamlanmasını takiben ham veriler elde edilmiştir. Genom hizalama ve gen ifadelerinin belirlenmesi çalışmalarından önce ilk olarak adaptörler dizilerden ayıklanmıştır. Çalışmada kullanılan örneklerden ayıklanan adaptör, düşük kalite ve bilinmeyen baz sayısı bilgileri Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. RNA-Seq analizleri sonucunda elde edilen temiz okuma, ayıklanan adaptör, bilinmeyen baz ve düşük kalitedeki okuma sayıları

Örnek	Temiz Okuma	Adaptör	Bilinmeyen Baz	Düşük Kalite
Orlando tangelo balon	44965352	238724	37504	194
Orlando tangelo 1.gün	43204308	1451608	14742	571534
Orlando tangelo 3.gün	42096154	526058	16162	342040
Orlando tangelo 5. gün	42168870	367652	17050	426974
Klemantin mandarini balon	44965352	238724	37504	194
Klemantin mandarini 3. gün	44975770	229524	37060	142

RNA dizilemesinden sonra örneklerde elde edilen temiz okuma sayıları 42168870 ile 44975770 arasında değişmiştir. Adaptörler, bilinmeyen baz ve düşük kalitedeki bazların ayıklanması sonucunda temiz okuma oranlarının %95.50-%99.41 arasında olduğu belirlenmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda elde edilen dizilerden adaptörlerin ayıklanması sonrasında hizalama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada referans genom olarak *C. clementina* kullanılmıştır.

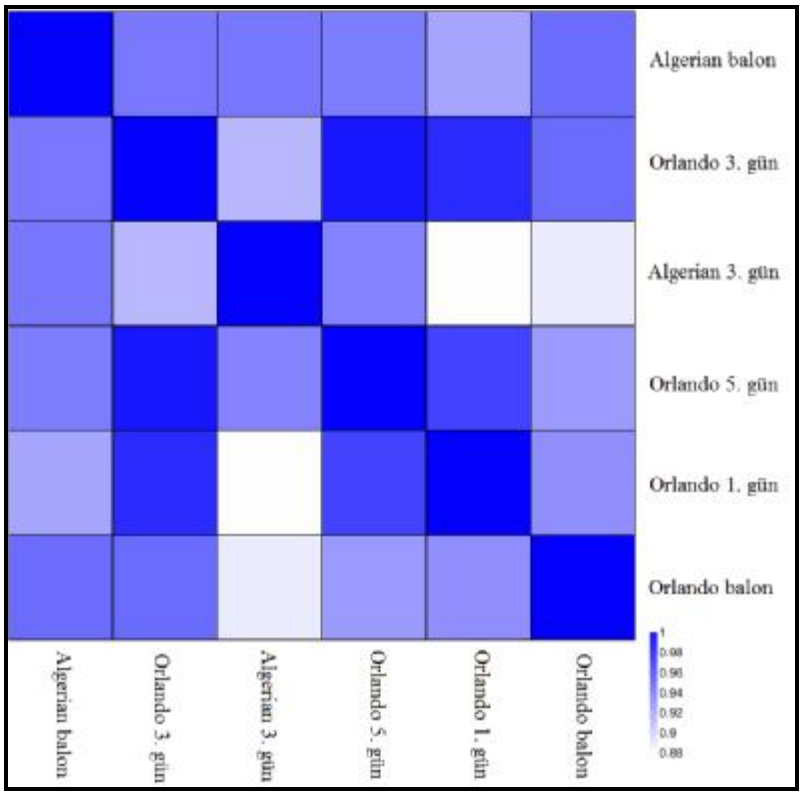
Turunçgillerde farklı mekanizmaları transkriptom seviyesinde araştırmak amacıyla özellikle son yıllarda RNA-Seq çalışmaları yürütülmüştür. Bai ve ark.

(2014a) *Poncirus trifoliata* köklerinde fosfor (P) eksikliğindeki transkriptom değişimlerini Illimuna platformu kullanarak RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Dizileme sonucunda kullandıkları örneklerde 11324528-11935107 arasında değişen temiz okuma elde etmişlerdir. Guo ve ark. (2015) şadokta farklı perikarp renkleri ve içerikleri ile ilişkili farklı seviyelerde ifade olan genleri transkriptomik düzeyde RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Çalışmalarda kullandıkları örneklerde 13347784-16084513 arasında temiz okuma elde edilmiştir. Zhang ve ark. (2014) portakallarda meyve olgunlaşması ile ilişkili genleri belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri RNA-Seq analizleri sonucunda 25629358-25801572 arasında temiz okuma elde etmişlerdir. Tez çalışmasında ise Orlando tangeloya ait dört farklı örnek, Klemantin mandarinine ait iki farklı örnek kullanılmıştır. RNA-Seq analizleri sonucunda elde edilen temiz okumalar 42096154-44975770 arasında değişmiştir.

4.3.2.1. Gen Ekspresyonu Analizleri

Tez çalışmasında kullanılan örneklerin RNA dizilemesi ve RNA dizilerinin referans genomla hizalanmasının ardından ifade olan genler ve ifade miktarları belirlenmiştir. Genlerin ifade seviyeleri FPKM değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm örneklere ait ifade olan genlerin listesi ve FPKM değerleri EK 1'de sunulmuştur.

Her örnek için gen bazında elde edilen FPKM değerleri kullanılarak örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyonları hesaplanmıştır. Örnekler arasındaki korelasyonu gösteren grafik Şekil 4.8'de, korelasyon değerleri ise Çizelge 4.3'te sunulmuştur.



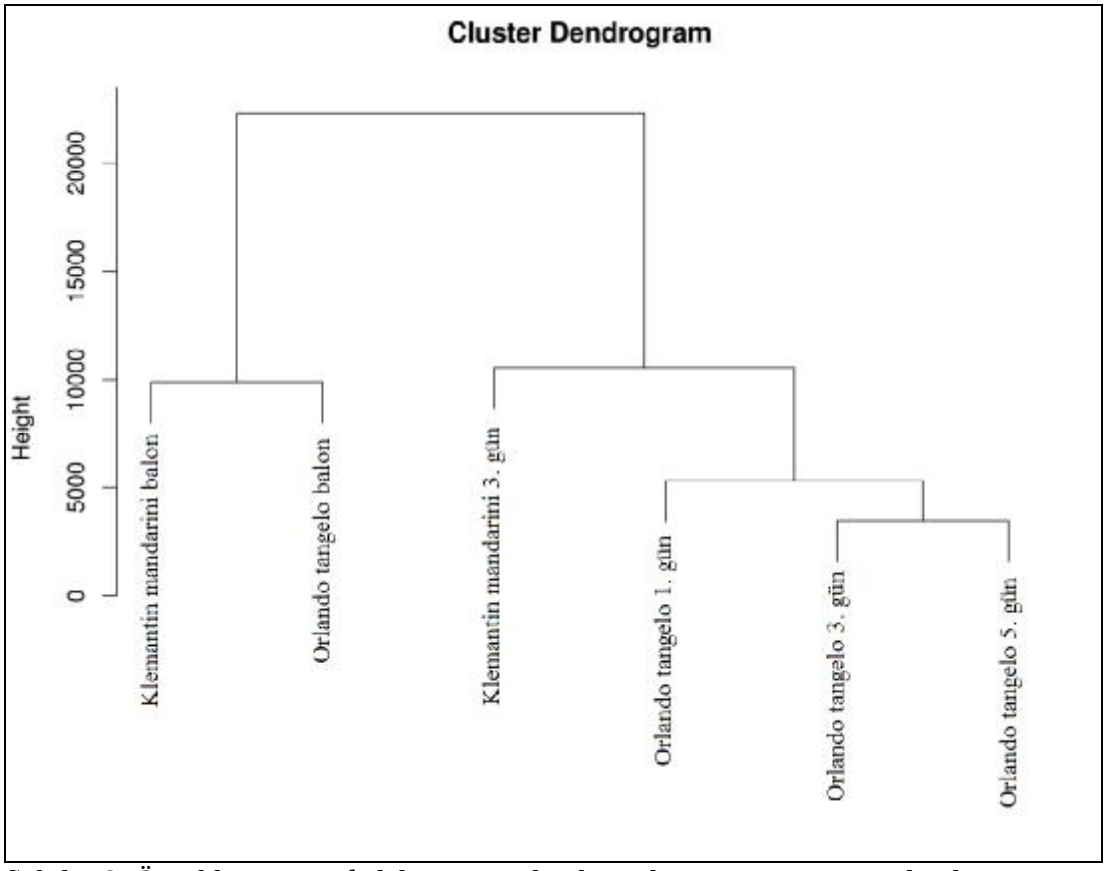
Şekil 4.8. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyonu

Çizelge 4.3. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyon değerleri

Örnek	Klemantin mandarini balon	Orlando tangelo 3. gün	Klemantin mandarini 3. gün	Orlando tangelo 5. gün	Orlando tangelo 1. gün	Orlando tangelo balon
Klemantin mandarini balon	1.00	0.94	0.94	0.94	0.92	0.95
Orlando tangelo 3. gün	0.94	1.00	0.91	0.99	0.98	0.95
Klemantin mandarini 3. gün	0.94	0.91	1.00	0.94	0.88	0.89
Orlando tangelo 5. gün	0.94	0.99	0.94	1.00	0.97	0.93
Orlando tangelo 1. gün	0.92	0.98	0.88	0.97	1.00	0.93
Orlando tangelo balon	0.95	0.95	0.89	0.93	0.93	1.00

Korelasyon verileri incelendiğinde Orlando tangelo 1. gün ile Klemantin mandarini 3. gün örnekleri arasındaki ilişkinin (0.88) en düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek benzerlik ise Orlando 3. gün ve 5. gün örnekleri arasında (0.99) olduğu tespit edilmiştir.

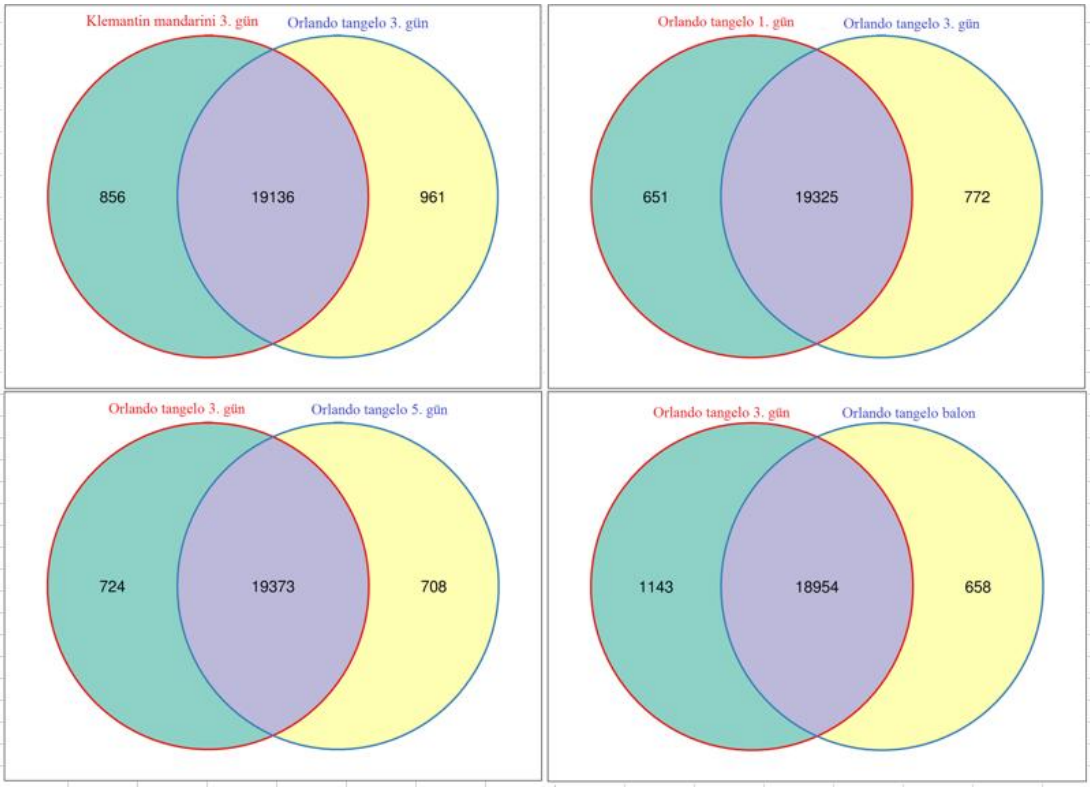
Örneklerde ifade olan genlerin benzerlik durumunun anlaşılması için FPKM verilerine dayalı olarak bir dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.9). Dendrogram incelendiğinde en yüksek benzerliğin Orlando tangelo 3. ve 5. gün örnekleri arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün ile 1 gün sonrası ve öncesi örnekler beraber kümelenmiştir.



Şekil 4.9. Örneklerin gen ifadeleri açısından kümelenmesini gösteren dendrogram

Gen ekspresyonu analizlerinde örnekler arasında ortak olarak ifade olan genler belirlenmiştir. Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün ile Klemantin mandarini 3. gün örnekleri arasında

toplam 19136 ortak genin ifade olduğu, Orlando tangeloda ifade olan ancak Klemantin mandarininde ifade olmayan 961 genin olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasında ortak ve farklı ifade olan gen sayıları Şekil 4.10'daki kümelerde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Örnekler arasında ortak ve farklı ifade olan gen sayıları

Yu ve ark. (2012) portakalda meyve gelişimi ve olgunlaşması ile ilgili genleri RNA-Seq yöntemi ile araştırmışlar ve kullandıkları örneklerde 18829-19440 arasında gen tespit etmişlerdir. Zhang ve ark. (2014) portakallarda meyve olgunlaşması ile ilişkili genleri belirlemek için Illumina teknolojisi kullanarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kullandıkları örnekler arasında 24034-57547 arasında değişen sayıda ifade olan gen tespit etmişlerdir. Zhang ve ark. (2015) kendine uyuşmazlık ile ilişkili genleri araştırmak amacıyla limonda RNA-Seq analizleri gerçekleştirmişler ve toplamda 61224 ifade olan gen belirlemişlerdir. Tez çalışmasında örneklerde ifade olan genler tespit edilmiştir. Bu genlerin sayıları kullanılan örneklerde 19612-20097 arasında değişmiştir. Farklı RNA-Seq

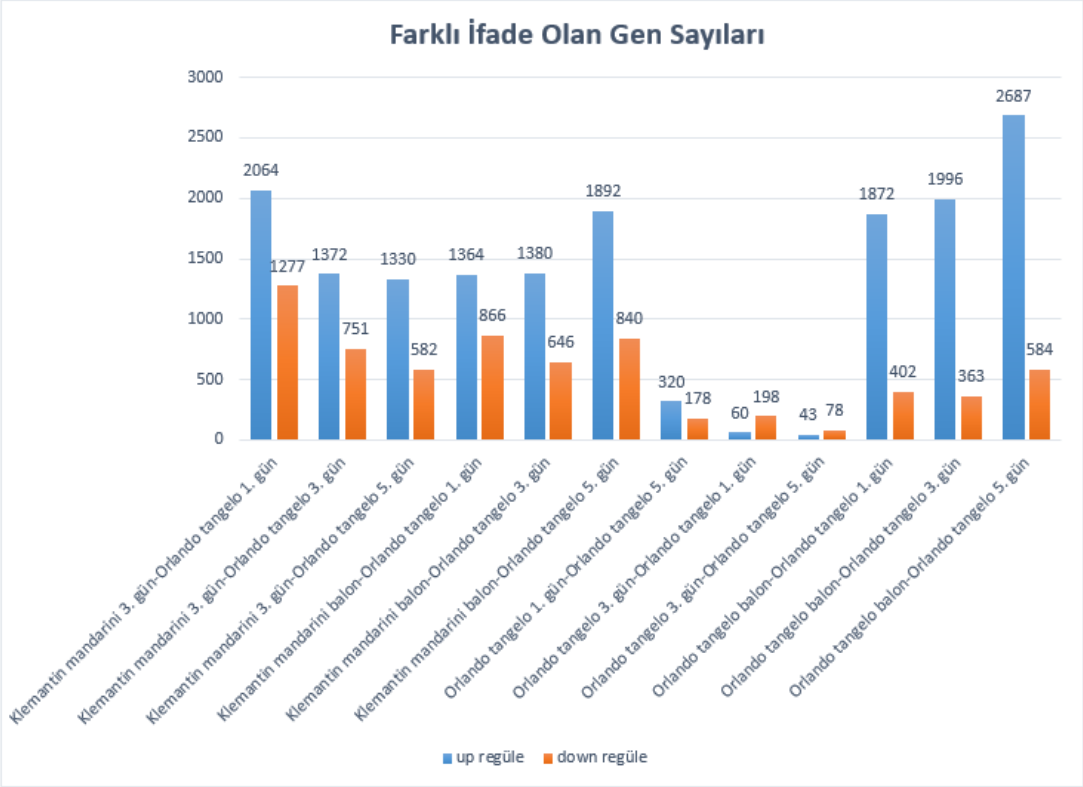
çalışmalarında kullanılan örneklerde ifade olan gen sayılarının oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Bunun en büyük sebebi RNA'da ortaya çıkan genlerin belirli bir dokuya, strese ve döneme bağımlı olmasındandır. Tez çalışmasında nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı döneme ait ovaryum örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden izole edilen RNA'larda ilgili dönemle ilişkili genlerin olması beklenmektedir.

4.3.2.2. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Analizi

Tez çalışmasında kullanılan örnekler arasında RNA-Seq verilerine dayalı olarak farklı seviyelerde ifade olan genler belirlenmiştir. Bu genlerin down ya da up-regüle oldukları da tespit edilmiştir. Örnekler arasındaki farklı ifade olan gen sayıları incelendiğinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı Orlando tangelo 3. gün örneği ile kontrol grubu olan Klemantin mandarini 3. gün örneği arasında farklı ifade olmuş gen sayısı 2123 olarak tespit edilmiştir. Bu genlerden 1372'sinin up 751'inin ise down regülasyon görev üstlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca Orlando tangelo genotipinde henüz bir farklılaşmanın tespit edilmediği balon aşaması ve hücresel farklılaşmanın tespit edildiği Orlando tangelo 3. gün örneği arasındaki farklı ifade olan gen sayısı 2359 olarak tespit edilmiştir. Örnekler arasında farklı seviyede ifade olan gen sayıları Şekil 4.11'de sunulmuştur.

Down regülasyon RNA veya protein gibi hücresel yapıların miktarında azalma olacak şekilde bir genin ifade olmasıdır. Up regülasyon ise hücresel komponentlerin artışını sağlayacak şekilde bir genin ifade olmasıdır.

Bir genin up veya down regülasyon özellik göstermesi bulunduğu doku, dönem ve/veya koşula göre farklılık gösterebilir. Örneğin nüseller embriyo oluşum mekanizmasında down regüle özellik gösteren bir gen farklı koşullar altında up-regüle olabilir.



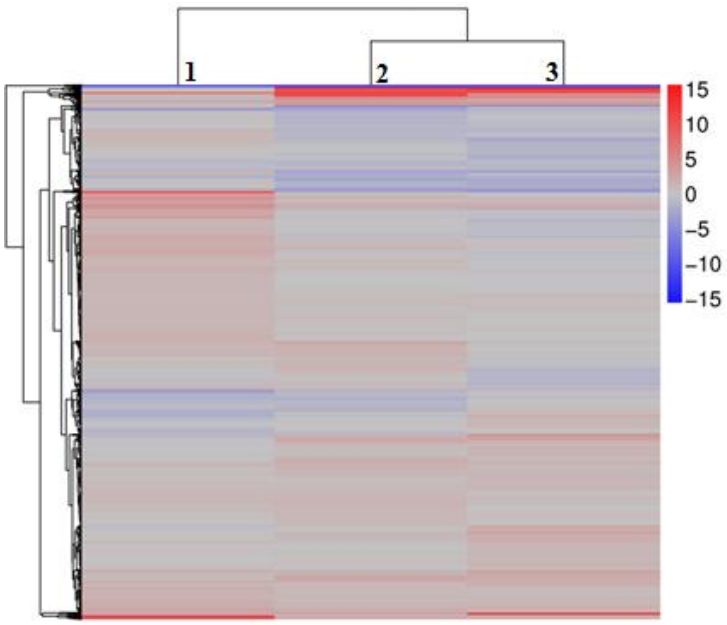
Şekil 4.11. Örnekler arasında farklı ifade olan gen sayıları

Örnekler arasındaki farklı ifade olan gen sayıları incelendiğinde en az gen sayısının Orlando tangelo 3-5. gün ve Orlando tangelo 1-3. gün arasına olduğu tepit edilmiştir. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklışmaya başladığı gün 3. gün olarak tespit edilmiştir. 3. gün ve öncesinde bunun için genetik tabanlı bir hazırlığın olduğu ve bu sürecin 5. gün örneğinde de devam ettiği düşünülmektedir. Bu örnekler arasındaki gen ifadesindeki farklılığın minimum olması bu varsayımı desteklemektedir. Diğer örnekler arasındaki farklı gen ifade sayıları Orlando tangelo 1-3 ve 5. gün örneklerine göre yüksek tespit edilmiştir.

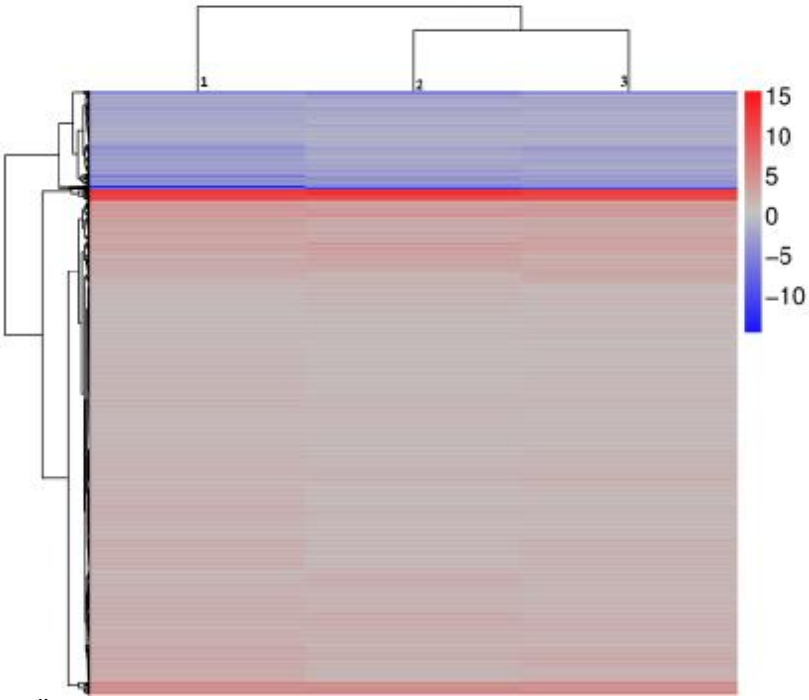
Zhang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada 'Jincheng' portakalı ve onun mutant tipinde meyve olgunlaşma süresince ifade olan genleri RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda 13.412 farklı ifade olan unigen bulunmuştur. Bu unigenlerden %75.8'inin yabani tipte down-regüle olmuştur. Coqueiro ve ark. (2015) portakallarda kitosan ve salisilik asit uygulamaları sonucunda ortaya çıkan transkripsiyonel farklılıkları RNA-Seq tekniği ile araştırmışlardır. Çalışma sonucunda salisilik asit uygulamalarında kitosana göre daha

fazla genin ifade olduğu tespit edilmiştir. Salisilik asit uygulamalarında toplam olarak 1425, kitosan uygulamalarında ise 640 farklı seviyelerde ifade olan gen tespit edilmiştir. Guo ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada 'Guanxi' şadok ve mutantında farklı perikarp renkleri ve içerikleri ile ilişkili farklı seviyelerde ifade olan genleri RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda mutant tipte gen ekspresyonunun önemli derecede değiştiği, 165 genin down regüle, 135 genin up regüle olduğu belirlenmiştir. Lin ve ark. (2015) 'Ponkan' mandarinine ait meyvelerin 3 farklı gelişme aşamasında şeker ve organik asit metabolizmasını RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. RNA-Seq analizleri sonucunda 19504 gen *C. clementina* genomu ile eşleşmiştir. Meyve olgunlaşması sırasında 85 up regüle ve 59 down regüle gen tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan örnekler arasında çoklu karşılaştırmalar gerçekleştirilerek gen tabanlı cluster analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücresel farklılaşmanın başladığı Orlando tangelo 3. gün ile Orlando tangelo balon, Orlando tangelo 3. ve 5. gün, Klemantin mandarini balon ve Klemantin mandarini 3. gün karşılaştırmasına ait HeatMap görüntüleri Şekil 4.12-13'te sunulmuştur.



Şekil 4.12. Örnekler arasındaki farklı ifade olan genlerin HeatMap görüntüsü. 1. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün, 2. Klemantin mandarini balon ve Orlando tangelo 3. gün, 3. Klemantin mandarini balon ve Orlando tangelo 3. gün.



Şekil 4.13. Örnekler arasındaki farklı ifade olan genlerin HeatMap görüntüsü. 1. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 5. gün, 2. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 1. gün, Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün

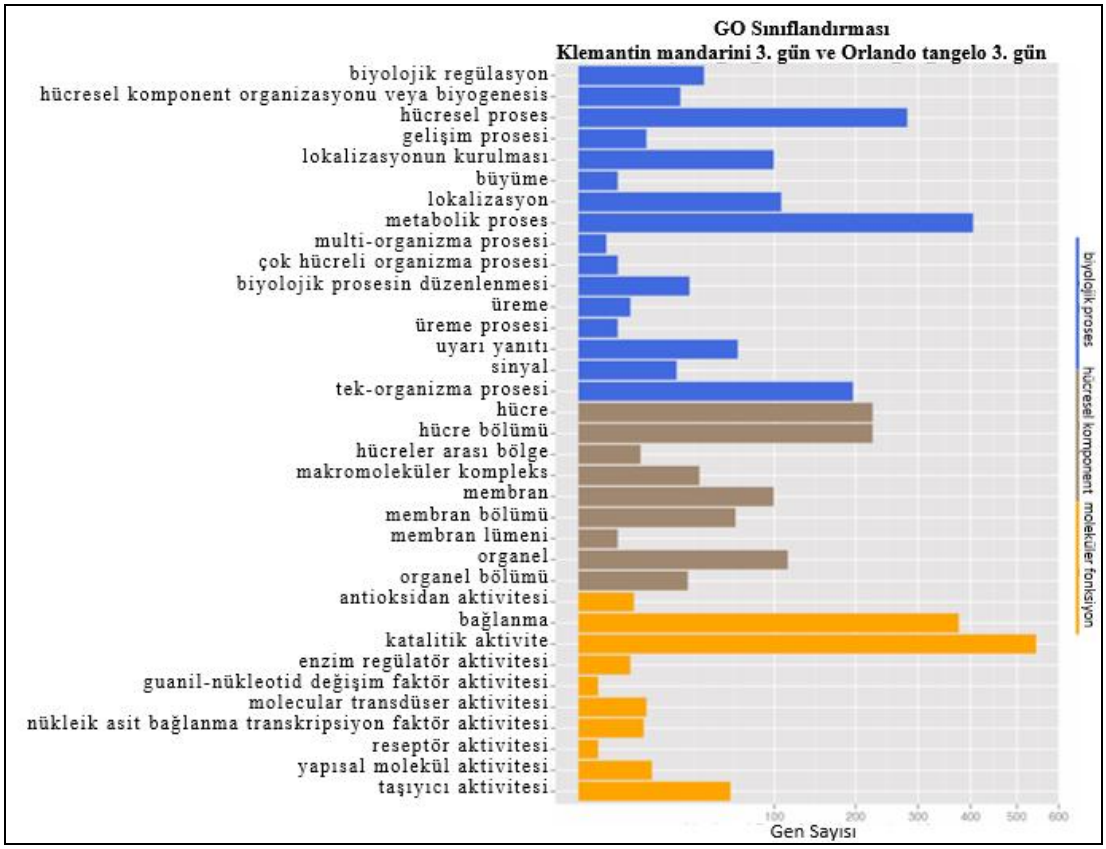
Farklı ifade olan genler ile yapılan HeatMap clusterları incelendiğinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı Orlando tangelo 3. gün örneği ile Klemantin mandarini balon ve Klemantin mandarini 3. gün örneklerinin bulunduğu clusterda ifade farklılığının arttığı net olarak gözlenmektedir (Şekil 4.12). Diğer yandan yalnızca Orlando tangelo örneklerinin farklı seviyede ifade olan genleri ile oluşturulan HeatMap grafiğinde daha dar bir ifade farklılığı olduğu gözlenmiştir.

4.3.2.3. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Ontoloji (GO) Analizleri

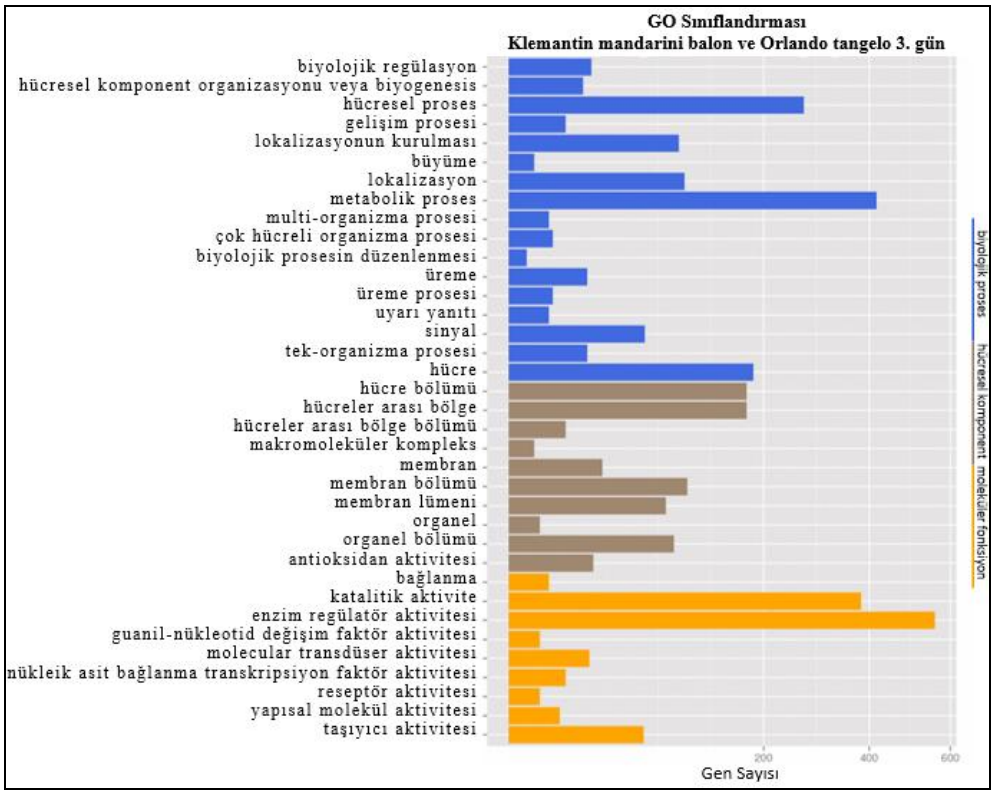
Gen ontoloji herhangi bir organizmada genlerin özelliklerini ve ürünlerini tanımlayan uluslararası standartize edilmiş gen fonksiyonel sınıflandırma sistemidir. Genlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için ve aynı fonksiyona sahip genlerin bir arada görüntülenebilmesi için GO oldukça önemli bir araçtır. GO sınıflandırması

moleküler fonksiyon, hücresel komponent ve biyolojik proses olarak üç grupta incelenmektedir (Guo ve ark., 2015).

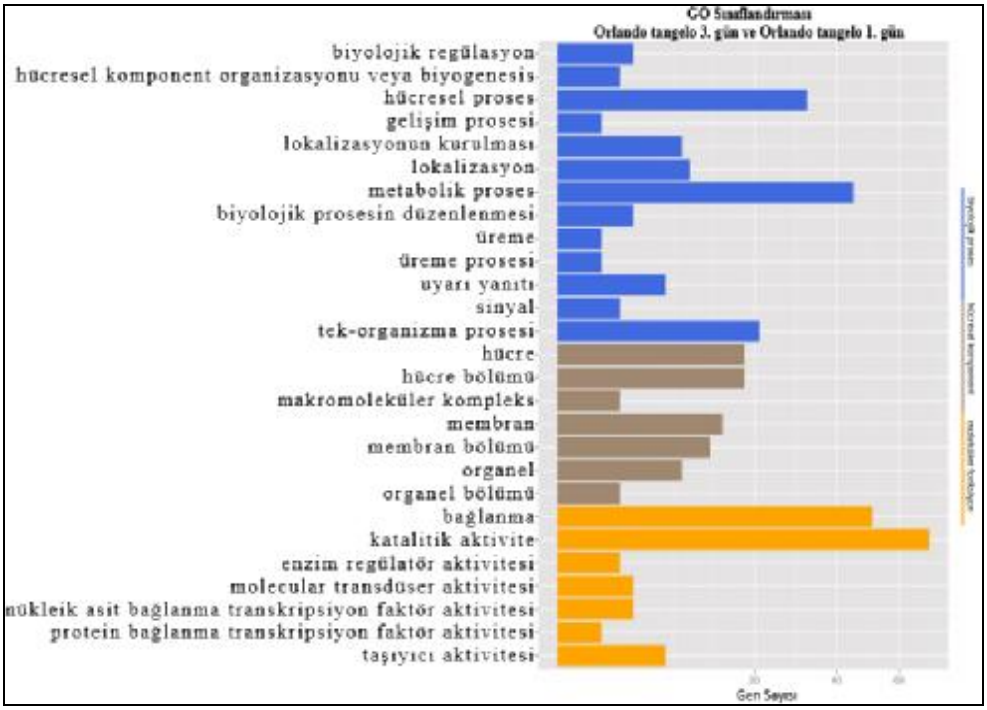
Biyoinformatik analizler ile tez çalışmasında kullanılan örnekler arasında farklı seviyelerde ifadesi gerçekleşen genlere ait ontoloji çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla örnekler karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek ortaya çıkan ve farklı seviyelerde ifade olan genlerin hangi ontolojik sınıflandırmaya ait olduğu tespit edilmiştir. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün ile diğer örnekler arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genlerin GO sınıflandırılmasına ait şemalar Şekil 4.14-18'de sunulmuştur.



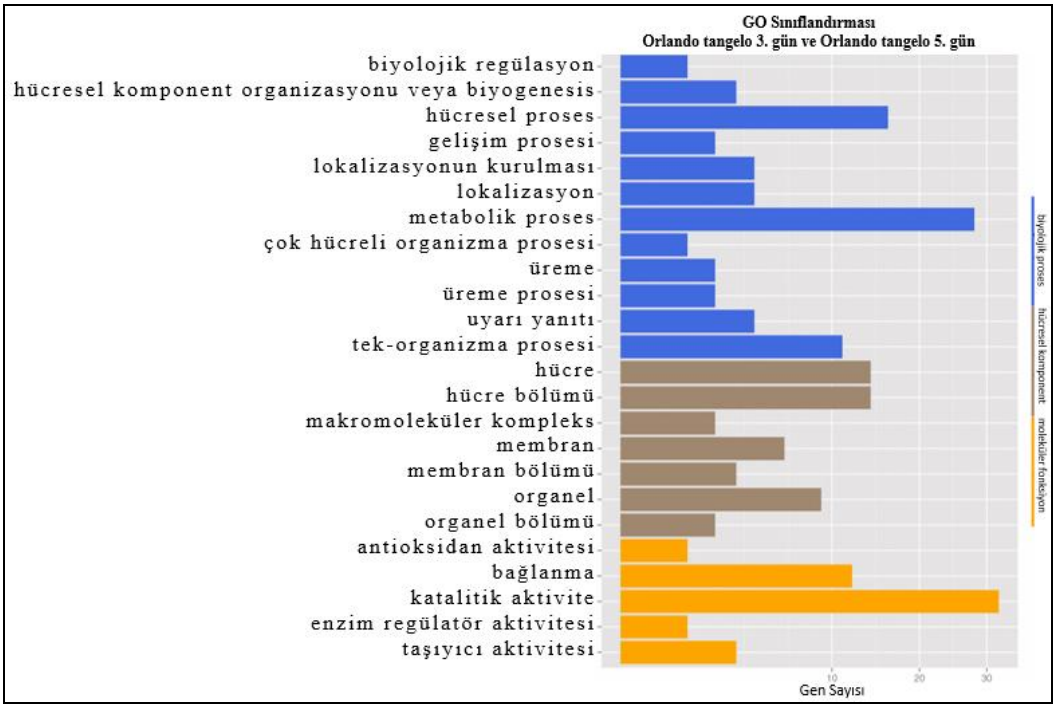
Şekil 4.14. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması



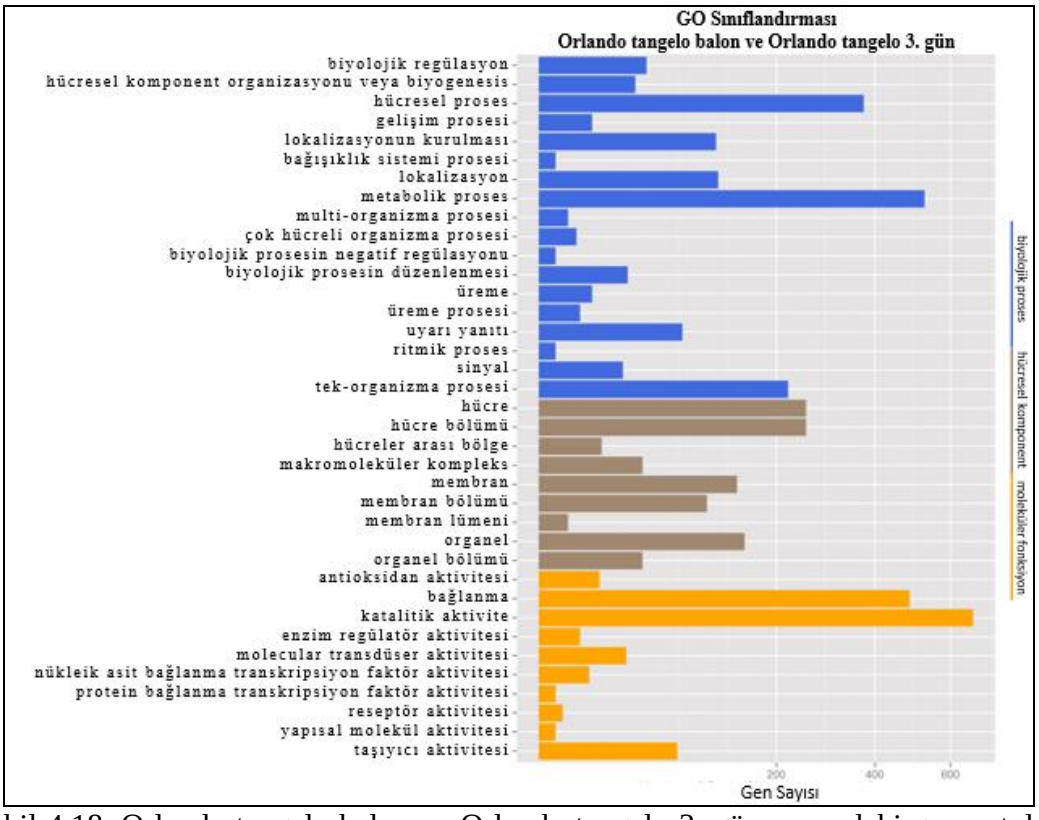
Şekil 4.15. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini balon arasındaki gen ontoloji şeması



Şekil 4.16. Orlando tangelo 1. gün ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması



Şekil 4.17. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 5. gün arasındaki gen ontoloji şeması



Şekil 4.18. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki gen ontoloji şeması

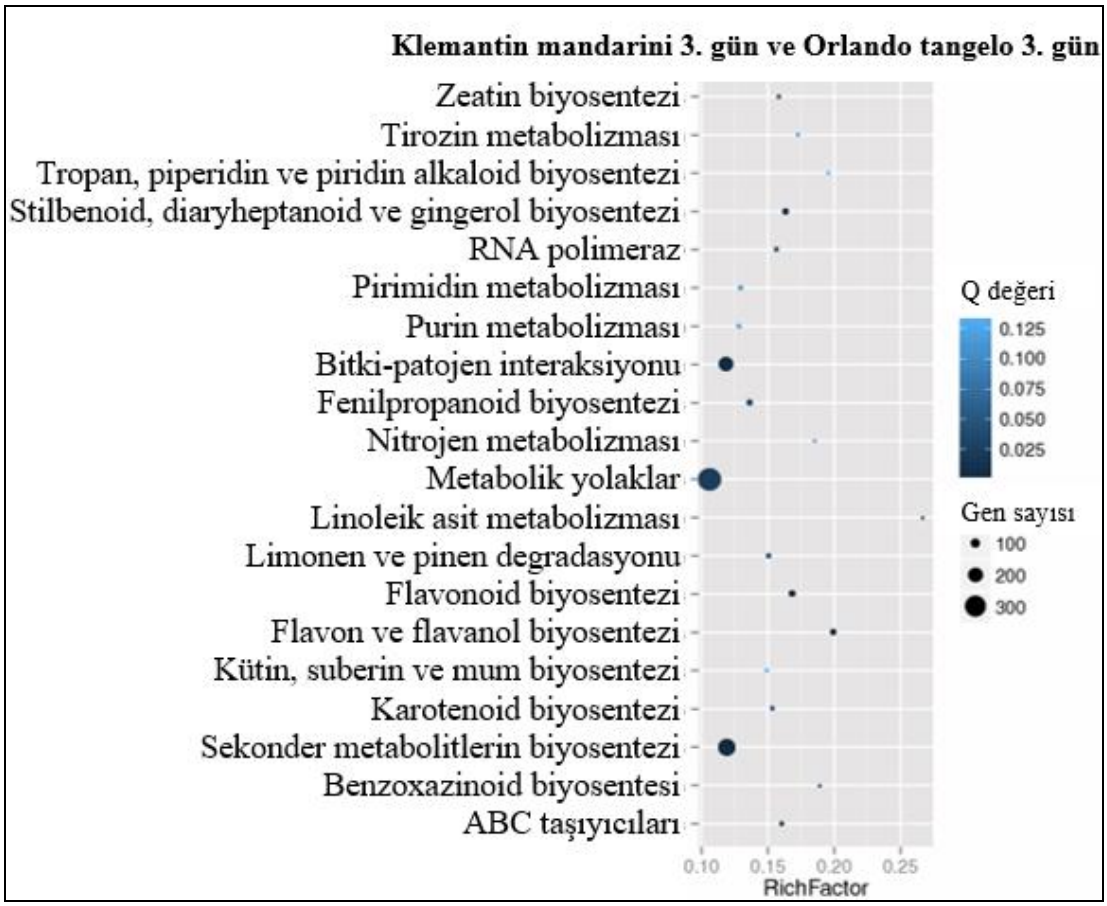
Tez çalışması kapsamında kullanılan örnekler arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genlerin ontoloji sınıflandırmaları değerlendirildiğinde biyolojik proses sınıflandırılmasında en fazla metabolik proses genlerinin olduğu belirlenmiştir. Hücresel komponent sınıflandırılması incelendiğinde en fazla genin hücre ve hücre bölümleri sınıflandırılmasında yer aldığı tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon sınıflandırılmasında ise en yüksek gen sayısının katalitik aktivite grubunda olduğu anlaşılmıştır.

Tan ve ark. (2015) *C. junos* cv. 'Ziyang xiangcheng' ve katlanmış diploidinde stres dayanıklılıklarındaki transkriptom farklılıklarını belirlemek için RNA-Seq analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında elde ettikleri farklı seviyelerde ifade olan genleri ontolojik olarak gruplandırmışlardır. Hücresel komponent sınıflandırılmasında en fazla genin hücre ve hücre bölümünde, moleküler fonksiyon sınıflandırılmasında en fazla genin bağlanma ve katalitik aktivitesi grubunda, biyolojik proses sınıflandırılmasında ise en fazla genin metabolik grubunda yer aldığını belirlemişlerdir. Guo ve ark. (2015) portakalda farklı perikarp rengine sahip genotiplerde yürüttüğü RNA-Seq analizlerinde elde ettikleri genlerin ontolojik sınıflandırmasını gerçekleştirmişlerdir. Benzer şekilde en fazla genin hücre, hücre bölümü, katalitik aktivite ve metabolik proses grubunda olduğunu tespit etmişlerdir. Jiao ve ark. (2013) portakalda genetik varyasyonların ekspresyon seviyelerini anlamak için RNA-Seq okumaları gerçekleştirmişlerdir. GO sınıflandırmasında hücresel komponent içerisinde en fazla genin hücre, hücre bölümü ve organel gruplarında yer aldığı, moleküler fonksiyon içerisinde en fazla genin bağlanma grubunda yer aldığı, biyolojik proses içerisinde ise en fazla genin metabolik işlev grubunda yer aldığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında yürütülen GO analizleri sonucunda en fazla genin yer aldığı gruplar turunçgillerde farklı mekanizmaların anlaşılması için gerçekleştirilen çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

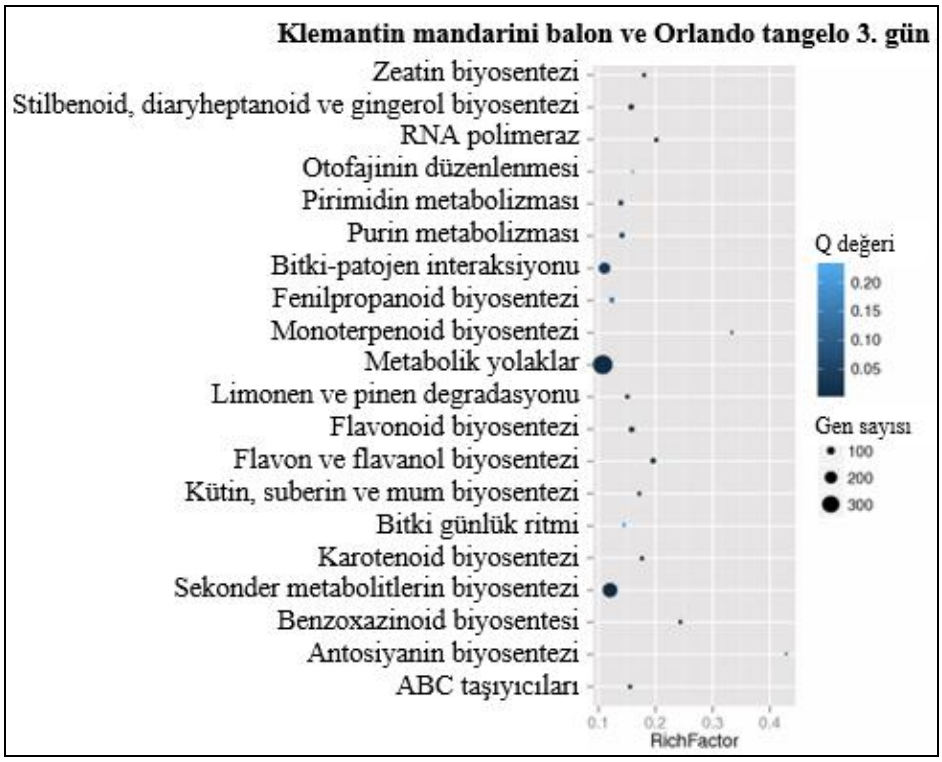
4.3.2.4. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Yolak Analizleri

Tez çalışmasında kullanılan örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin hangi yolaklarda görev aldığı ve bu genlerin hangilerinin down hangilerinin

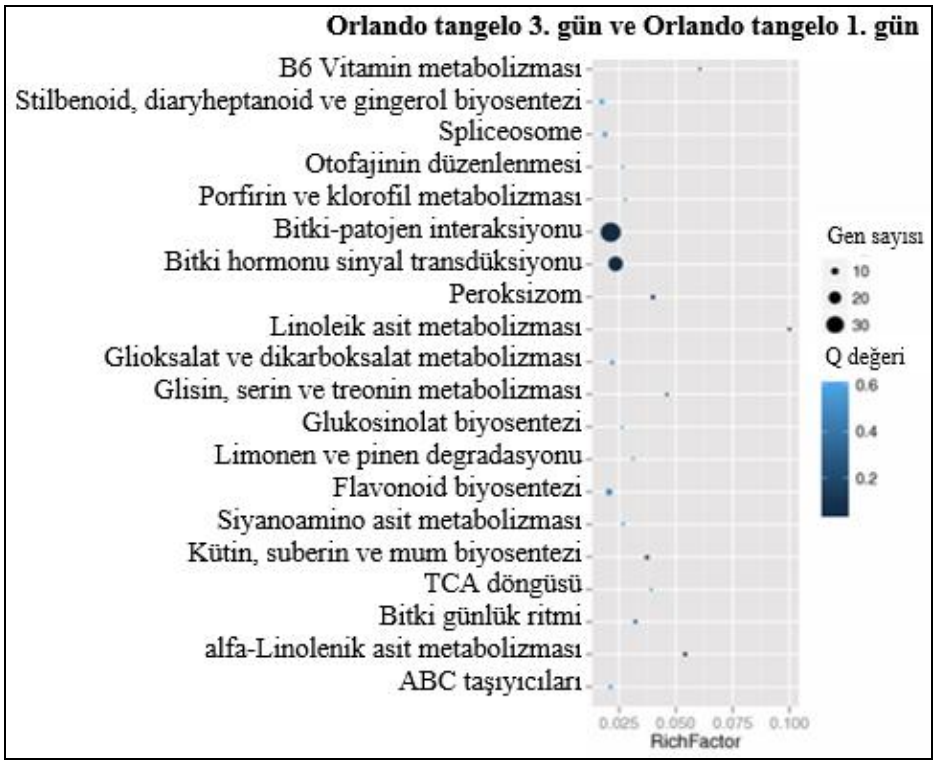
up regüle görev üstlendikleri belirlenmiştir. Bu amaçla KEGG veri bankası kullanılarak ilgili yolaklar araştırılmıştır. Nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün ile diğer örnekler arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genlerin hangi yolaklarda görev aldığı Şekil 4.19-23'te sunulmuştur.



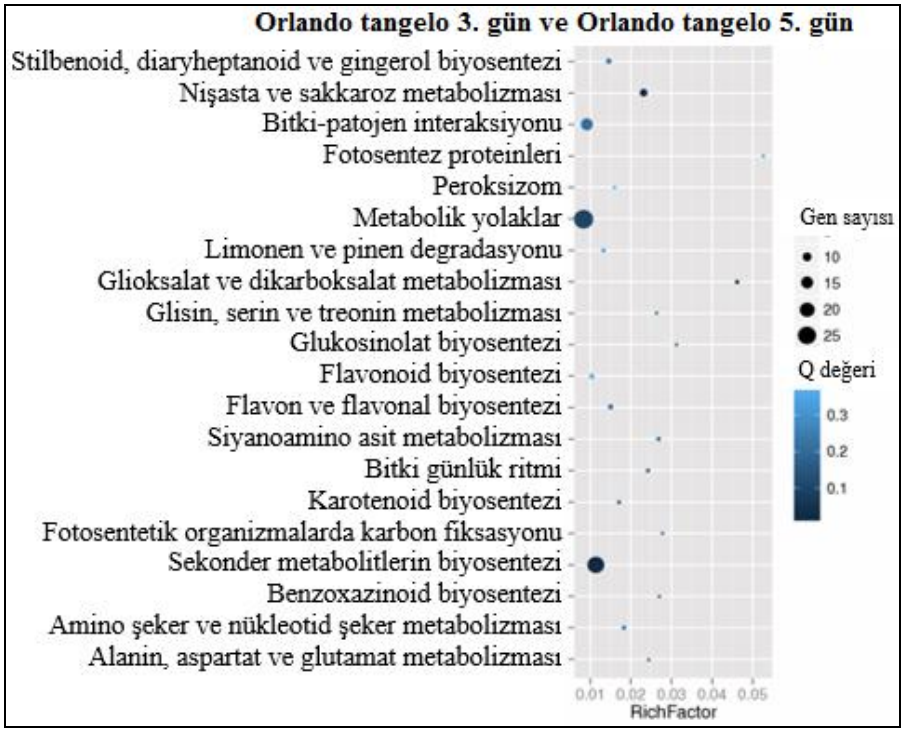
Şekil 4.19. Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar



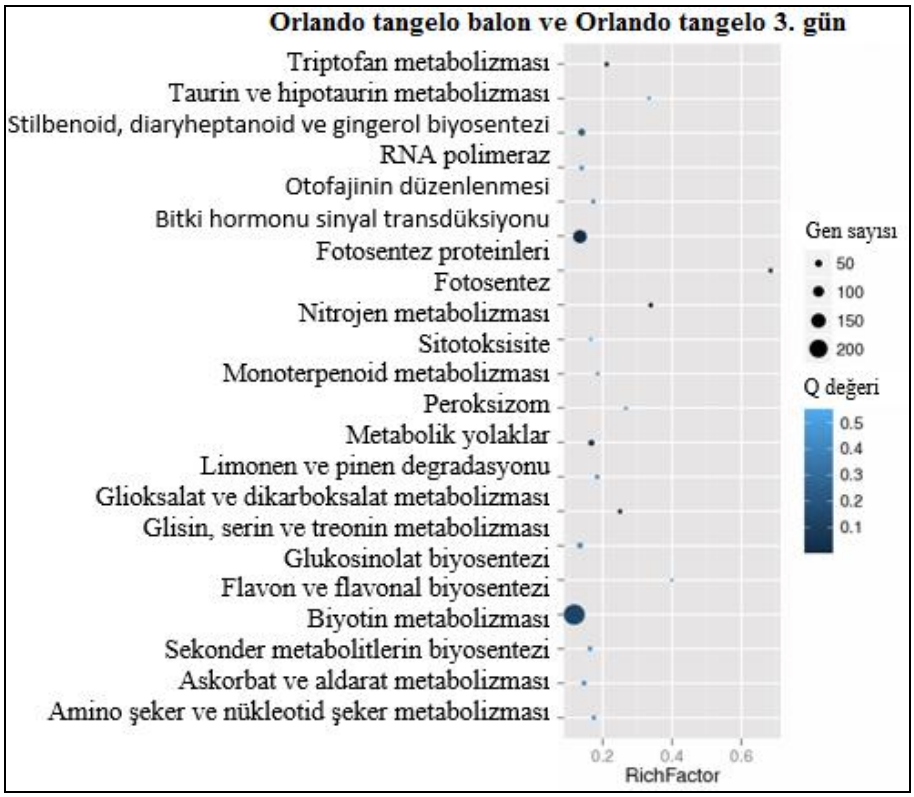
Şekil 4.20. Klemantin mandarini ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar



Şekil 4.21. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 1. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar



Şekil 4.22. Orlando tangelo 3. gün ve Orlando tangelo 5. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar



Şekil 4.23. Orlando tangelo balon ve Orlando tangelo 3. gün arasındaki genlerin katıldığı yolaklar

Biyoinformatik analizler sonucunda önemli olarak tespit edilen yolaklar değerlendirildiğinde farklı metabolik yolakların varlığı belirlenmiştir. Özellikle poliembriyonik çeşit olan Orlando tangelo ve monoembriyonik olan Klemantin mandarini arasında farklı ifade olan genlerin katıldığı yolaklar arasında zeatin biyosentezi ve RNA polimeraz dikkat çekmektedir. Orlando tangelo örneklerinin kendi içerisinde karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan önemli yolaklar arasında zeatin biyosentezi bulunmamaktadır. Benzer şekilde Orlando tangelo ve Klemantin mandarini örneklerinin karşılaştırılması sonucunda pürin ve pirimidin metabolizmasına ait yolaklar tespit edilmiş, fakat Orlando tangelo örneklerinin kendi içerisinde bu yolaklar önemli bulunmamıştır.

Guo ve ark. (2015) portakalda farklı perikarp rengine sahip genotiplerde yürüttüğü RNA-Seq analizleri sonucunda farklı ifade olan genlerin katıldığı yolakları tespit etmişlerdir. KEGG analizlerinde 3'ten fazla farklı seviyelerde ifade olan genin katıldığı toplam 7 yolak tespit etmişlerdir. Wu ve ark. (2014a) portakallarda meyve olgunlaşması sürecine dahil olan genleri RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Çalışmada belirledikleri farklı seviyelerde ifade olan genlerin katıldıkları yolakları KEGG veri bankası kullanarak belirlemişlerdir. Toplam 570 genin katıldığı 23 yolak tespit etmişlerdir. Liang ve ark. (2015) şadokta moleküler markır geliştirme amacıyla RNA dizileme çalışmaları yürütmüşlerdir. Bu amaçla 6 farklı çiçek organı ve genç yapraklar kullanmışlardır. Çiçek organları arasında tez çalışmasında olduğu gibi ovaryum örnekleri de kullanmışlardır. Yürüttükleri KEGG analizleri sonucunda 23219 genin katıldığı toplam 128 yolak belirlemişlerdir. Bu genlerin çoğunlukla yer aldığı yolakları kategorize etmişlerdir. Bu yolaklar global map, karbonhidrat metabolizması, lipit metabolizması ve sekonder metabolitlerin biyosentezidir. Tez çalışmasında monoembriyonik çeşit olan Klemantin mandarinine ait 3. gün örneği ile nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün örneği arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genlerin katıldığı yolaklar ve gen sayıları Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

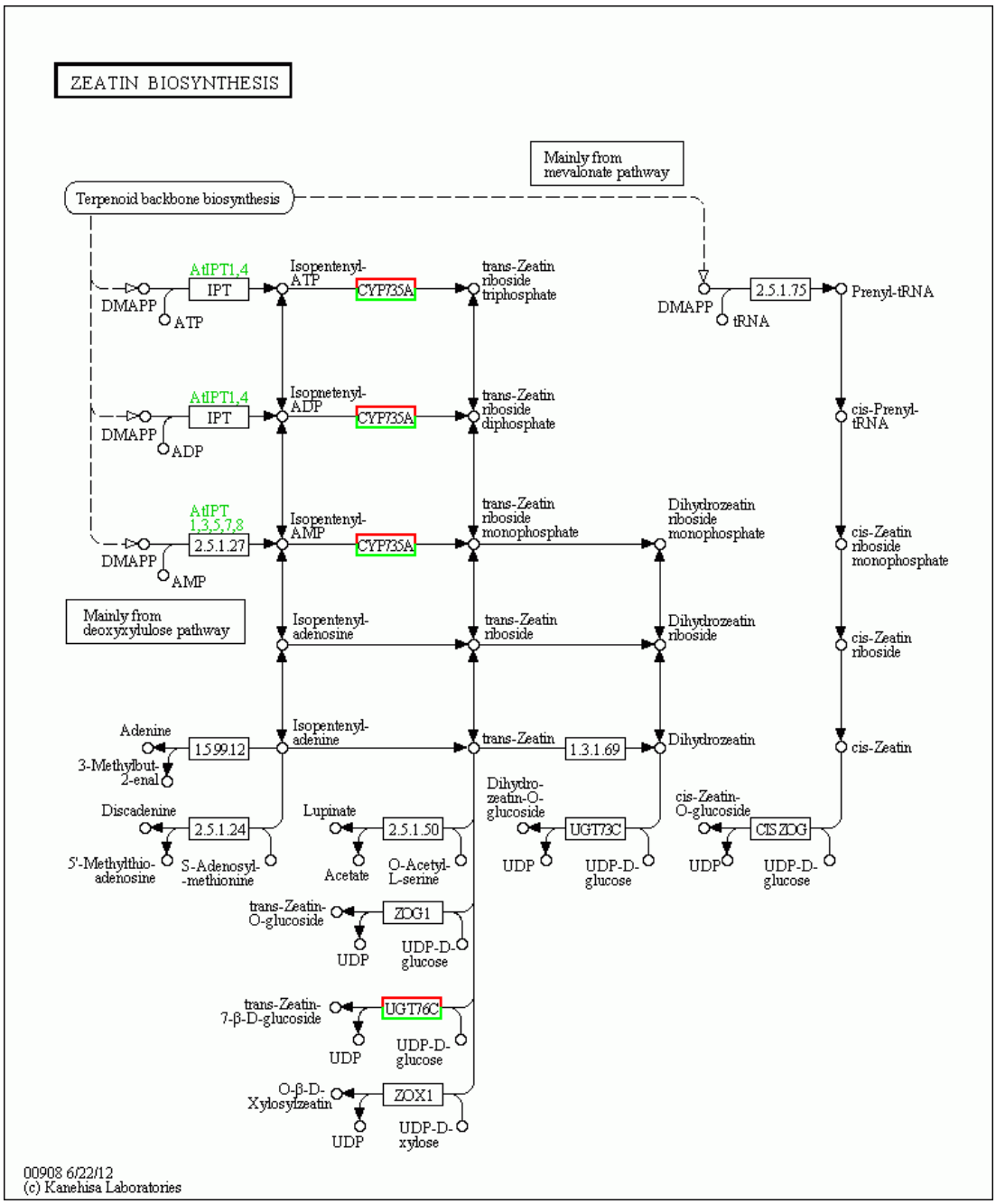
Çizelge 4.4. Klemantin mandarini 3. gün ve Orlando tangelo 3. gün arasında istatistiki olarak önemli tespit edilen yolaklar

No	Yolak	DEG'lerin yolak anotasyanları	Tüm genlerin yolak anotasyanları	Qvalue	Yolak ID
1	Flavon and flavonol biyosentezi	53 (4.01%)	266 (1.85%)	5.33e-06	ko00944
2	Flavonoid biyosentezi	65 (4.92%)	386 (2.68%)	5.97e-05	ko00941
3	Sekonder metabolitlerin biyosentezi	241 (18.24%)	2026 (14.07%)	2.18e-04	ko01110
4	Stilbenoid, diarylheptanoid ve gingerol biyosentezi	56 (4.24%)	343 (2.38%)	4.25e-04	ko00945
5	Bitki-patojen interaksiyonu	194 (14.69%)	1638 (11.38%)	1.65e-03	ko04626
6	Metabolik yolaklar	343 (25.97%)	3242 (22.52%)	2.08e-02	ko01100
7	ABC taşıyıcıları	30 (2.27%)	187 (1.3%)	2.97e-02	ko02010
8	Fenilpropanoid biyosentezi	53 (4.01%)	389 (2.7%)	3.30e-02	ko00940
9	Limonen ve pinen degradasyonu	34 (2.57%)	226 (1.57%)	3.59e-02	ko00903
10	RNA polimeraz	28 (2.12%)	179 (1.24%)	4.20e-02	ko03020
11	Linoleik asid metabolizması	8 (0.61%)	30 (0.21%)	4.92e-02	ko00591
12	Karotenoid biyosentezi	27 (2.04%)	176 (1.22%)	5.35e-02	ko00906
13	Benzoxazinoid biyosentezi	14 (1.06%)	74 (0.51%)	6.14e-02	ko00402
14	Zeatin biyosentezi	22 (1.67%)	139 (0.97%)	6.68e-02	ko00908

Klemantin mandarini ve Orlando tangelo örnekleri arasında istatistiki olarak önemli çıkan yolaklar EK 2'de, bu yolaklarda farklı seviyelerde ifade olan genlerin listesi ise EK 3'te sunulmuştur.

Tez kapsamında somatik embriyogenesis süreci için önemli olarak tespit edilen Zeatin Biyosentezi yolağında farklı seviyede ifade olan genler ve fonksiyonları Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Zeatin biyosentezi için farklı seviyede ifade olan genler incelendiğinde genlerin tamamının monoembriyonik çeşit olan Klemantin mandarininde daha yüksek seviyelerde ifade olduğu belirlenmiştir. Ancak genlerin

regülasyon seviyelerinde bakıldığında aynı fonksiyona sahip farklı gen izomerlerinin hem up hem de down regüle oldukları belirlenmiştir. Sonuçta Klemantin mandarininde ifade olan genlerin ürünlerinin arttığı ama aynı zamanda down regüle genler ile bu ürünlerin hücreden uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Zeatin biyosentezine ait yolak Şekil 4.24'te sunulmuştur.



Şekil 4.24. Zeatin biyosentezi yolağı

Zeatin biyosentezi yolağı incelendiğinde yeşil renkli çerçeve içerisinde yer alan genlerin down, kırmızı renkli çerçeveli genlerin ise up regüle oldukları tespit edilmiştir. Sonuç olarak somatik embriyogenesis sürecinde aktif rolü olduğu bilinen zeatin ile ilişkili genlerin Klemantin mandarininde daha yüksek seviyelerde ifade olduğu fakat bu genlerin hem up hem de down regüle olmaları sonucunda Orlando tangelo hücre seviyesinde daha fazla miktarda üretildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Zeatin biyosentezine katılan genlerden farklı seviyelerde ifade olanları ve fonksiyonları

No	Gen ID	Fonksiyon	Regülasyon
1	18035477	cytokinin-N-glucosyltransferase	Up
2	18039876	cytokinin-N-glucosyltransferase	Up
3	18034283	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
4	18035677	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
5	18050970	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
6	18039746	pathogen-inducible salicylic acid glucosyltransferase	Up
7	18035209	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
8	18035159	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
9	18042369	cyanohydrin beta-glucosyltransferase, cytokinin-N-glucosyltransferase, UDP-glucosyltransferase BX9, UDP-glucose:(indol-3-yl) acetate beta-D-glucosyltransferase	Up
10	18034982	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
11	18037288	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
12	18038757	cytokinin trans-hydroxylase	Up
13	18036876	cytokinin-N-glucosyltransferase	Up
14	18037957	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
15	18050969	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
16	18043666	cytochrome P450, family 734, subfamily A, polypeptide 1 (PHYB activation tagged suppressor 1), cytokinin trans-hydroxylase	Up
17	18041695	UDP-glucosyl transferase 73C	Up
18	18052075	UDP-glucosyl transferase 73C	Down
19	18039745	inducible salicylic acid glucosyltransferase	Down
20	18035314	UDP-glucosyltransferase BX8, cyanohydrin beta-glucosyltransferase	Down
21	18037740	cytokinin-N-glucosyltransferase, pathogen-inducible salicylic acid glucosyltransferase	Down
22	18043663	cytochrome P450, family 734, subfamily A, polypeptide 1 (PHYB activation tagged suppressor 1), cytokinin trans-hydroxylase	Down

Tez çalışmasında farklı örnekler kullanılarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler nüseller embriyo mekanizmasında görev alan genlerin belirlenmesine uygun olarak seçilmiştir. Bu amaçla yüksek oranda nüseller bitki üreten Orlando tangelo ve monoembriyonik çeşit olan Klemantin mandarini kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin nüseller embriyo mekanizması ile ilişkili olabileceği olgusu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle Orlando tangeloda kullanılan örnekler nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı dönemlerden seçilmiştir. Literatür incelendiğinde bu konuda yapılan araştırmaların oldukça kısıtlı kaldığı görülmektedir. Kumar ve ark. (2014) turunçgillerde nüseller poliembriyoni ile ilişkili genleri mikroarray analizleri ile araştırmışlardır. GO analizlerinde en fazla genin bağlanma aktivitesi grubunda yer aldığını bildirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda toplam 154 up regüle, 130 down regüle gen tespit etmişlerdir. Çalışmalarında nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin oluşumu öncesi ve sonrasına ait örneklerde farklı seviyelerde ifade olan bazı önemli genleri belirlemişlerdir. Bu genlerden tez çalışmasında kullanılan Orlando tangelo 3. gün ve Klemantin mandarini 3. gün örneklerinde tespit edilen genlerin listesi Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Kumar ve ark. (2014)'nın nüseller poliembriyoni ile ilişkili olduğunu belirttiği genlerden tez çalışmasında tespit edilenleri

Genler	Regülasyon
Peroxidase	down
Heat-shock protein	up
Alcohol dehydrogenase	up
MP3K protein kinase (mitogen-activated protein kinase)	down
Nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein pub1	up

Kumar ve ark. (2014)'nın nüseller poliembriyoni ile ilişkili olabileceğini belirttiği genlerin tez çalışmasında Orlando tangelo ve Klemantin mandarininde farklı seviyelerde ifade olduğu tespit edilmiştir. Peroxidase ve MP3K protein kinase (mitogen-activated protein kinase) geni Klemantin mandarininde daha düşük

seviyede ifade olmuştur. Diğer genler ise up regüle özellik göstermiştir. Bu genlerden Heat-shock protein ve Alcohol dehydrogenase Orlando tangeloda daha yüksek seviyede ifade olurken Nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein pub1 geni Klemantin mandarininde daha yüksek seviyede ifade olmuştur.

Nakano ve ark. (2012) poliembriyoni mekanizmasıyla ilişki gösteren genomik dizileri tanımlamıştır. Çalışmalarında gerçekleştirdikleri dizilemeler sonucunda poliembriyoni ile ilişkili 70 aday ORF tespit etmişlerdir. Belirledikleri genler arasında fonksiyonu bilinen 40 gen olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında belirlediğimiz genler arasında bu genler ile aynı fonksiyona sahip 23 gen olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Nakano ve ark. (2012)'nın turunçgillerde poliembriyoni lokusu ile ilişkili olarak bildirdiği genlerden tez çalışmasında tespit edilenleri

No	Genler
1	Methyltransferase
2	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase
3	Serine threonine kinase
4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
5	Heat shock protein
6	WD-40 repeat family protein
7	WRKY DNA-binding protein
8	Serine/threonine-protein kinase
9	Protein phosphatase 2c
10	Aminopeptidase
11	Ankyrin repeat family protein
12	Mitochondrial carrier protein
13	Spermidine synthase
14	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
15	Cytochrome P450
16	MADS-box protein (CitMADS8)
17	Ferredoxin-like protein
18	F-box / LRR-repeat protein
19	DNA excision repair protein
20	YGGT family protein
21	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
22	MADS-box protein
23	Myosin XI

Nakano ve ark. (2012) turunçgillerde 454 GS FLX platformu ve Sanger dizilemesi ile genomik DNA'lar kullanarak çalışmalarını yürütmüşlerdir. Çalışmada oluşturdukları BAC kütüphanelerini dizilemişler ve biyoinformatik analizlerle elde ettikleri dizilerin hangi genlere karşılık geldiğini belirlemişlerdir. Yürütülen tez çalışmasında ise RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizlerinde ise genomik DNA'lar yerine ilgili dokulardan özel dönemlere ait RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanılmaktadır. Tez kapsamında nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı dönemlerdeki örnekler ile kontrol örnekleri kullanılmıştır. RNA izolasyonunda ise nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin geliştiği ovaryum dokuları kullanılmıştır. Sonuç olarak nüseller embriyo

mekanizması ile ilişkili genlerin ortaya çıktığı doku direk olarak kullanılmıştır. Konu ile ilgili olarak yürütülen kısıtlı çalışmalarda elde edilen bulgular ile tez sonuçlarının ortak yönleri olduğu gibi farklılıklarında olduğu belirlenmiştir. Ancak genomik DNA'da tüm genoma ait genlerin var olması bazı fazla ve mekanizma ile ilgisiz genlerin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Nakano ve ark. (2012)'nın tespit ettikleri genler ile çalışmada tespit edilen ortak genlerin nüseller embriyoni mekanizması ile ilişkili olduğu fakat tez çalışmasında olmayıp Nakano ve ark. (2012)'nın belirlediği genlerin genomik DNA'dan kaynaklı sonuçlar olduğu düşünülmektedir.

Turunçgillerde nüseller embriyoların oluşması doğal bir somatik embriyogenesistir. Yani somatik dokulardan embriyo oluşması sonucunda ortaya çıkan bir olgudur. Bu süreç tüm bitkilere *in vitro* koşullarda uygulanabilen bir sistemdir ve bu süreçte farklı genlerin görev yaptığı bilinmektedir. Turunçgillerde bazı genotiplerde nüseller embriyoların oluşması fakat diğer bazı türlerde oluşmaması mekanizmasının teşvik edilmesi ve/veya susturulması ile mümkün olmaktadır. Tez çalışmasında somatik embriyogenesis ile ilişkili bir takım genler tespit edilmiştir. Bu genler arasında somatik embriyogenesis reseptör kinaz (*SERK*) protein ailesine ait genler ön plana çıkmaktadır. *SERK* somatik embriyogenesis ile ilişkili olarak tanımlanan ilk gen olarak karşımıza çıkmaktadır (Schmidt ve ark. 1997). *SERK* gibi reseptör protein kinazlar birçok sinyal iletim yolağında önemli rol üstlenmektedir (Becraft, 2002). Tez çalışması kapsamında *SERK1* ve *SERK4* genlerinin örnekler arasında önemli derecede farklı seviyede ifade olduğu tespit edilmiştir. Havuçta yürütülen somatik embriyogenesis çalışmasında *SERK* genlerinin erken embriyo gelişim aşamasında farklı seviyelerde ifade olduğu bildirilmiştir (Schmidt ve ark., 1997). *Arabidopsis thaliana*'da yapılan farklı bir çalışmada *SERK1* geninin ileri embriyo aşamasında çok düşük oranda ifade olduğu bunun sebebinin de erken aşamada zaten ifade olması olarak açıklanmıştır. Tez çalışmasında Orlando tangelo çeşidinin çiçeklerinin balon aşamasında *SERK1* geninin daha yüksek seviyede ifade olduğu, 5. gün örneğinde ise bu seviyenin düştüğü belirlenmiştir. Muhtemelen daha ileri aşamalarda bu seviyenin daha da düşeceği düşünülmektedir (Hecht ve ark., 2001; Salaj ve ark., 2008). *SERK* genlerinin somatik embriyogenesis

ile ilişkisi farklı bitki türlerinde de (*Helianthus annuus* (Thomas ve ark., 2004), *Theobroma cacao* (de Oliveira Santos ve ark., 2005), *Oryza sativa* (Hu ve ark., 2005) ve *Vitis vinifera* (Schellenbaum ve ark., 2008)) gösterilmiştir. Somatik embriyogenesis için önemli diğer bir gen ise *GST* (glutation-S-transferaz)'dir. *GST* bitkilerde, bir çok izoforma sahip olup bu formları farklı substratlara spesifik olan hücresel detoksifikasyon süreçlerinde görev almaktadır. Tez çalışmasında RNA-Seq analizleri sonucunda örnekler arasında farklı *GST* izofomlarının ifade olduğu belirlenmiştir. Pan ve ark. (2009) portakallarda *GST* genlerinin somatik embriyo gelişimi sırasında farklı seviyelerde ifade olduğunu bildirmişlerdir. Farklı enzimler ile birlikte oksidatif stres reaksiyonlarına katılan *GST* genlerinin somatik embriyoları tetiklemek için önemli redoks değişimlerini düzenlediklerini bildirmişlerdir. *Arabidopsis*'te yürütülen bir çalışmada ise chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (*CHD3*) geninin kök eksplantlarından somatik embriyoların oluşumu teşvik ettiği bildirilmiştir (Chanvivattana ve ark., 2004). Tez çalışmasında ise chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 geninin farklı seviyelerde ifade olduğu tespit edilmiştir.

RNA-Seq analizlerinde nüseller embriyo mekanizmasına katılan diğer önemli bir genin ise spermidine syntase olduğu tespit edilmiştir. Pan ve ark. (2008) portakallarda somatik embriyo oluşumu sırasında bu genin ifade olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Nakano ve ark. (2012)'de bu genin nüseller embriyo ile ilişkili lokusa ait bir gen olduğunu dizileme çalışmaları sonucunda ortaya çıkarmışlardır. Tez kapsamında up regüle olarak ifade olan bir spermidine syntase geninin (18055315) henüz nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başlamadığı balon aşaması örneğinde farklılaşmanın olduğu 3. gün örneğine göre 5 kat daha fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç hücre farklılaşması için bir hazırlık olduğu yönünde bir görüş oluşturmuştur. Diğer yandan aynı genin Klemantin mandarini 3. gün ve Orlando tangelo 3. gün örnekleri arasında kıyaslandığında down regüle ifade olduğu ve genin Klemantin mandarininde iki kat daha fazla ifade olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç değerlendirildiğinde Klemantin mandarininde hücre farklılaşması için gerekli olabilecek bu proteinin hücrede seviyesinin düştüğü böylece farklılaşmanın engellendiği ortaya çıkmaktadır. Spermidin bir alifatik

poliamin olup tüm canlı organizmalarda bulunan düşük moleküler kütleli polikatyonlardır (Martin-Tanguy, 2001; Bagni ve Tassoni, 2001). Bu büyüme düzenleyicisi hücre bölünmesi, morfogenesis, çiçeklenme başlangıcı, polen tüpü büyümesi ve yaşlanması dahil olmak üzere çeşitli bitki büyüme ve gelişme süreçlerinde rol oynamaktadır (Germana, 2006). Germana (2006), *in vitro* da anter kültüründe besin ortamına ilave edilen poliaminlerin embriyogenik kallus ve embriyo oluşumunu teşvik ettiğini bildirmiştir. Besin ortamına 2 mM spermidin ilave edildiğinde anter eksplantlarından gelişen embriyojenik kallus ve embriyoların oranının yükseldiğini belirlemiştir. Farklı bir çalışmada ise 'Valencia' portakalının yüksek somatik embriyo ürettiği ortamlardan alınan örneklerin içerisinde yüksek miktarda spermidin olduğu tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2009).

Çalışmada tespit edilen diğer önemli genler arasında ise Polycomb grup proteinler bulunmaktadır. Polycomb proteinleri kromatinleri modifiye ederek hücresel farklılaşma için gerekli olmayan genlerin ifadesini engellemektedir (Bratzel ve ark., 2010). Bir başka deyişle hücrelerde polycomb proteinlerinin olması hücresel farklılaşmayı dolaylı olarak tetiklemektedir. Tez çalışmasında 4 farklı polycomb proteini (18054563 (up regüle): polycomb protein EED, 18049121 (up regüle), 18044260 (down regüle), 18049121 (down regüle): enhancer of polycomb-like protein) tespit edilmiştir. Polycomb proteinlerinin örneklerde ifade seviyeleri incelendiğinde Klemantin mandarini ve Orlando tangelo örnekleri arasında Klemantin mandarininde daha yüksek seviyelerde ifade olduğu tespit edilmiştir. Polycomb proteinlerinin herhangi bir hücresel farklılaşmanın olmadığı Klemantin mandarininde daha yüksek seviyelerde ifade olması hücrede polycomb proteinlerinin varlığına işaret etmektedir. Ancak genlerin regülasyon durumlarına bakıldığında down regüle olan genlerden 180442260'ın Klemantin mandarininde Orlando tangeloya göre 4.7 kat, 18049121'in ise 3.7 kat daha fazla ifade olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak Klemantin mandarininde down regülasyon ifade ile polycomb proteinlerinin uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Hücresel farklılaşmanın henüz başlamadığı Orlando tangelo balon aşaması ile nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı Orlando tangelo 3. gün örnekleri arasında ise Polycomb proteinlerinin tamamının balon aşamasında daha yüksek seviyelerde ifade

olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Klemantin mandarininde down regüle olan 18049121 geninin Orlando'da up-regüle olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak Orlando tangeloda hücresel farklılaşma için gerekli olmayan genlerin ifadesinin baskılandığı ortaya çıkmıştır.

Turunçgillerde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmasında transkripsiyon faktörlerinin de önemli bir rolü tespit edilmiştir. CitMADS8 transkripsiyon faktörünün hücre farklılaşmasında çok önemli bir görev üstlendiği bildirilmiştir (Nakano ve ark., 2012). Tez çalışmasında CitMADS8'in farklı seviyelerde ifade olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında genlerin transkripsiyon sonrası susturulması ile ilişkili proteinlerin de varlığı tespit edilmiştir. Argonaute proteinleri RNAi (RNA interference) aracılığıyla genlerin post-transkripsiyonel olarak susturulmasında görev alan RNA-induced silencing complex (*RISC*)'lerin bir elemanı olarak görev yapmaktadır (Tolia ve Joshua, 2007). Tahir ve ark. (2006) *AGO* ailesine ait bir genin çamgiller familyasında yer alan *Picea glauca*'da somatik embriyoların gelişimi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde havuçta yapılan bir çalışmada da somatik embriyoların oluşumu sürecinde *AGO* homoloğu bir genin farklı seviyelerde ifadesini tespit etmişler ve somatik embriyogenesis için RNAi mekanizmasında görev alan bu genin gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Takahata, 2008). Tez çalışmasında belirlenen *AGO* genlerinin hücresel farklılaşmanın başlamadığı örnekler ile nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaştığı 3. gün örnekleri arasında önemli seviyede ifade farklılığı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu ile nüseller embriyoların oluşmasında RNAi mekanizmasının da etkin olduğu sonucuna varılmıştır.

Turunçgillerde nüseller embriyo oluşumu ile ilişkili genlerin daha önce yürütülen kısıtlı çalışmalarda bir veya birkaç lokustan oluştuğu tespit edilmiş fakat mekanizmanın tam olarak aydınlatılamadığı bildirilmiştir (Parlevliet ve Cameron, 1959; Hong ve ark., 2001; Kepiro ve Roose, 2010). Tez çalışması kapsamında belirtilen bu lokuslar ile muhtemel diğer lokuslarda bulunan genler araştırılmıştır. Turunçgillerde daha önce yürütülen çalışmalar ile benzer genlerin varlığı tespit edildiği gibi nüseller embriyo mekanizmasında yer alan yeni genler de tespit edilmiş ve tartışılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Turunçgil yetiştiriciliği Ülkemiz için son derece önemlidir. Dünya ve Ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğini kısıtlayan birçok biyotik ve abiyotik stres faktör karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle hem Dünya hem de Ülkemizde yeni çeşit ve anaçların elde edilmesi çalışmaları devam etmektedir. Islah stratejileri arasında melezleme ıslahı son derece önemli ve etkili bir yöntemdir. Turunçgillerde doğal ve yapay melezlemeler ile birçok anaç ve çeşit ortaya çıkarılmıştır. Turunçgillerde nüseller embriyo oluşumu ile melezlemeler sonrasında elde edilen tohumların çimlendirilmesi sonucunda anne bitkiye tamamen benzer bitkiler elde edilmektedir. Bu durum özellikle turunçgil ıslahçıları için melezleme çalışmalarını kısıtlayan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan nüseller embriyolardan gelişen bitkilerde herhangi bir açılım olmaması, tohumlar kullanarak klonal çoğaltımın önünü açabilmektedir. Bu durum özellikle anaç üretimi ve bilimsel çalışmalarda tohumdan homojen bitkilerin elde edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Farklı turunçgil tür ve çeşitleri farklı oranda nüseller embriyo üretme oranlarına sahiptir. Turunçgiller içerisinde monoembriyonik olarak adlandırılan ve hiç nüseller embriyo üretmeyen tür ve çeşitler olduğu gibi, neredeyse oluşturduğu tüm tohumların poliembriyonik olduğu tür ve çeşitler karşımıza çıkmaktadır.

Turunçgillerde nüseller embriyo oluşum mekanizmasının moleküler olarak incelenmesi ve bu mekanizmaya ait genlerin tespit edilmesi ile bu genlerin susturulması ve/veya bu genlere sahip olmayan tür ve çeşitlere aktarılması söz konusu olabilecektir. Ayrıca poliembriyoni ile ilişkili güvenilir markırların geliştirilmesi sonucunda moleküler teknikler ile seleksiyon yapılabilmesi mümkün olacaktır.

Bu tez çalışması kapsamında turunçgillerde nüseller embriyo oluşum mekanizmasında etkin olan genlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin belirlenmesi için histolojik analizler, bu dönemlerde de ifade olan ve bu mekanizmaya katılan genlerin belirlenmesi amacıyla RNA-Seq çalışmaları yürütülmüştür. Tez çalışmalarında bitkisel materyal olarak %99 oranında poliembriyonik tohumlar üreten Orlando tangelo ile monoebriyonik bir çeşit olan

Algerian Tangerin Ranch Selection Klemantin Mandarini kullanılmıştır. Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin belirlenmesi, çiçek tozu çim borusunun uzamasının incelenmesi ve moleküler analizlerde kullanılan örnekleri temin etmek amacıyla, Klemantin mandarininde ise çiçek tozu çim borusunun incelenmesi ve moleküler analizlerde kullanılan örnekleri temin etmek amacıyla melezleme çalışmaları yürütülmüştür. Melezleme çalışmalarında baba ebeveyn olarak ise Fremont mandarini kullanılmıştır. Melezleme çalışmalarını takiben tozlanmadan 1 gün sonra başlamak üzere 15 gün boyunca örneklemeler yapılarak histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca moleküler analizlerde kullanmak üzere her döneme ait ovaryum örnekleri -85 °C'de muhafaza edilmiştir. Histolojik analizlerin sonucunda Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin antezisten sonraki 3. günde farklılaşmaya başladığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Orlando tangeloda balon aşaması ve öncesine ait dönemlerdeki çiçek tomurcuklarında yapılan incelemelerde herhangi bir hücre farklılaşmasının olmadığı gözlenmiştir. Çiçek tozu çim borusunun uzamasının incelenmesi sonucunda ise Orlando tangeloda 7. gün, Klemantin mandarininde ise 6. günde döllenmenin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Histolojik analiz sonuçları değerlendirildiğinde Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı dönemin döllenmeden önce, antezisten sonraki 3. günde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç ile hücresel farklılaşmanın döllenmeden önce olduğu bilgisine kesin olarak ulaşılmıştır. Histolojik analiz bulgularına dayalı olarak da moleküler analizlerde kullanılan örneklerin hangi dönemlere ait olduğu tespit edilmiştir. RNA-Seq analizlerinde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı Orlando tangelo 3. gün örneği ile bu dönemin öncesi olan balon aşaması ve 1. gün örnekleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ise monoembriyonik çeşit olan Klemantin mandarinine ait balon aşaması ve tozlanmadan sonraki 3. güne ait örnekler kullanılmıştır.

RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq™ 2000 platformu kullanılmıştır. Gerçekleştirilen okumalar sonrasında sekanslardan adaptörler ayıklanmış ve temiz okumalar elde edilmiştir. RNA dizilemesinden sonra örneklerde elde edilen temiz okuma sayıları 42168870 ile 44975770 arasında değişmiştir. Temiz okumaların elde

edilmesinden sonra diziler referans genom olan *C. clementina* ile karşılaştırılmış ve ifade olan genler, örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genler, farklı seviyelerde ifade olan genlerin GO ve KEGG analizleri gerçekleştirilmiştir. Orlando tangeloda nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin farklılaşmaya başladığı 3. gün ile Klemantin mandarini 3. gün örnekleri arasında toplam 19136 ortak genin ifade olduğu, Orlando tangeloda ifade olan ancak Klemantin mandarininde ifade olmayan 961 genin olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasındaki farklı ifade olan gen sayıları incelendiğinde Orlando tangelo 3. gün örneği ile Klemantin mandarini 3. gün örneği arasındaki gen sayısı 2123 olarak tespit edilmiştir. Bu genlerden 1372'sinin up 751'inin ise down regülasyon görev üstlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca Orlando tangelo genotipinde henüz bir farklılaşmanın tespit edilmediği balon aşaması ve hücresel farklılaşmanın tespit edildiği Orlando tangelo 3. gün örneği arasındaki farklı ifade olan gen sayısı 2359 olarak tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında kullanılan örnekler arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genlerin ontoloji sınıflandırmaları değerlendirildiğinde biyolojik proses sınıflandırılmasında en fazla metabolik süreç genlerinin olduğu belirlenmiştir. Hücresel komponent sınıflandırılması incelendiğinde en fazla genin hücre ve hücre bölümleri sınıflandırılmasında yer aldığı tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon sınıflandırılmasında ise en yüksek gen sayısının katalitik aktivite grubunda olduğu anlaşılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda farklı metabolik yolakların varlığı tespit edilmiştir. Özellikle poliembriyonik çeşit olan Orlando tangelo ve monoembriyonik olan Klemantin mandarini arasında farklı ifade olan genlerin katıldığı yolaklar arasında zeatin biyosentezi ve RNA polimeraz dikkat çekmektedir. RNA-Seq analizleri sonucunda farklı seviyelerde ifade olan genlerin fonksiyonları araştırıldığında somatik embriyogenesis ile ilişkili bir takım genlerin varlığı tespit edilmiştir. Turunçgillerde ve diğer bitkilerde daha önce yürütülmüş çalışmalar detaylı olarak incelenmiş ve tez çalışmasında nüseller embriyo gelişim mekanizmasında etkin olan aday genler tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının devamında tespit edilen aday genlerin turunçgil genomunda haritalanması ve özel bir populasyon kullanılarak bu genlerin nüseller embriyo özelliği ile ilişkilendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Ayrıca ileride

yürütülecek çalışmalarda tespit edilen aday genlerin protein seviyelerinin de incelenmesi önerilmektedir.

Gen ifadesinin düzenlenmesinde büyük bir role sahip olan micro RNA'ların tespiti oldukça önemli konular arasında yer almaktadır. Bu tez çalışmasının devamında nüseller embriyo mekanizmasında etkin olan micro RNA'ların belirlenmesi ve bu tez çalışmasında elde edilen mevcut verinin birleştirilmesi ile önemli sonuçların elde edileceği düşünülmektedir.

Önerilen bu çalışmaların daha hızlı bir şekilde yürütülebilmesi için *in vitro* tekniklerin kullanımı da söz konusu olabilmektedir. Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak nüsellus dokularından elde edilecek somatik embriyoların incelenmesi ve zigotik embriyolar ile karşılaştırılması sonucunda süreç daha hızlı ilerleyebilecektir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar tartışılarak, nüseller embriyo mekanizmasının genetik altyapısı hakkında önemli bulgular elde edilmiştir. Çalışma sonuçları, turunçgillerde nüseller embriyo başlangıç hücrelerinin gelişim dönemlerindeki transkriptom değişimlerinin ortaya konulması ve poliembriyoni mekanizması için önemli olan genlerin tanımlanması ve fonksiyonlarının belirlenmesi için önemli bir referans olmuştur.

KAYNAKLAR

AKA KACAR, Y., ASLAN, F., ETI, S., BONCUK, M., SIMSEK, O., YILDIRIM, B., YALÇIN MENDI, Y., YEŞILOĞLU, T., DISTEFANO, G., and LA MALFA, S. 2012. Determination of Self-Incompatibility Status of Some Clementine (*Citrus clementina*) Genotypes by Histological Analysis. Acta Horticulture, 1065:523-528.

ALEZA, P., JUA´REZ, J., OLLITRAULT, P., and NAVARRO, L., 2010. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. Annals of Botany, 106:533–545.

ALKIO, M., JONAS, U., DECLERCQ, M., VAN NOCKER, S., and KNOCHE, M., 2014. Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. Horticulture Research, 11:1-15.

ASKER, S. E. and JERLING, L., 1992. Apomixis in Plants. CRC Press, London, 320s.

AZIM, M. K., KHAN, I. A., and ZHANG, Y., 2014. Characterization of mango (*Mangifera indica* L.) transcriptome and chloroplast genome. Plant Molecular Biology, 85(1-2):193-208.

BACKIYARANI, S., UMA, S., SARASWATHI, M. S., SARAVANAKUMAR, A. S., and CHANDRASEKAR, A., 2015. Transcriptome analysis of banana (*Musa balbisiana*) basedon next-generation sequencing technology. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39(5):705-717.

BAGNI, N., TASSONI, A., 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. Amino acids, 20(3):301-317.

BAI, F., CHEN, C., AN, J., XIAO, S., DENG, X., and PAN, Z., 2014a. Transcriptome responses to phosphate deficiency in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Acta Physiologiae Plantarum, 36(12):3207-3215.

BAI, Y., DOUGHERTY, L., and XU, K., 2014b. Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-Seq. Molecular Genetics and Genomics, 289(3):427-438.

BECRAFT P.W., 2002. Receptor kinase signalling in plant development**.** Ann Rev Cell Dev Biol, 18:163-192.

BERNARDI, J., LICCIARDELLO, C., RUSSO, M. P., CHIUSANO, M. L., CARLETTI, G., RECUPERO, G. R., and MAROCCO, A., 2009. Use of a Custom Array to Study Differentially Expressed Genes During Blood Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Ripening. Journal of Plant Physiology, 167:301–310.

BOWMAN, K.D., GMITTER, F. G., and HU, X., 1995. Relationships of seed size and shape with polyembryony and the zygotic or nucellar origin of *Citrus* spp. Seedlings. Hortscience, 30(6):1279-1282.

BRATZEL F., LOPEZ-TORREJON G., KOCH M., DEL POZO J. C., and CALONJE M., 2010 Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. Curr Biol, 20:1853–1859

BRAUTIGAM, A., and GOWIK, U., 2010. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. Plant Biology, 12:831–841.

BUERMANS, H. P., and DUNNEN, J. T., 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta, 1842 (10):1932-1941.

CHANVIVATTANA Y., BISHOPP A., SCHUBERT A., STOCK C., MOON Y. H., SUNG Z. R., and GOODRICH J., 2004. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. Development 131:5263–5276.

CHEN, J., MAO, L., LU, W., YING, T., and LUO, Z., 2016. Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. Planta, 243(1):183-197.

COQUEIRO, D.S.O., DE SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., RODRIGUES, C.M., KISHI, L.T., and MACHADO, M.A., 2015. Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. BMC genomics, 16(1):1.

DE OLIVEIRA SANTOS, M., ROMANO, E., YOTOKO, K. S. C., TINOCO, M. L. P., DIAS, B. B. A., and ARAGAO, F. J. L., 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. Plant Science, 168(3):723-729.

DISTEFANO, G., CARUSO, M., LA MALFA, S., GENTILE, A., and TRIBULATO, E., 2009. Histological and molecular analysis of pollen–pistil interaction in clementine, Plant Cell Reports, 28:1439-1451.

DÖNMEZ, D., ŞİMŞEK, Ö., and KAÇAR, Y.A., 2015. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 8(1):30-37.

ESEN, A., and SOOST, R. K., 1977. Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. Amer. J. Bot, 64(6):607-614.

ETİ, S., 1987. Über das Pollenschlauchwachstun und die Entwicklung der Samenanlagen in Beziehung zum Fruchtansatz und zur Fruchtqualität bei der Mandarinensorte 'Clementine' (*Citrus reticulata* Blanco). Dissertation Univ. Hohenheim, 127s.

ETİ, S., and STÖSSER, R., 1988. Fruchtbarkeit der Mandarinensorte 'Clementine' (*Citrus reticulata* Blanco) I. Pollenqualität und Pollenwachstum. Gartenbauwissenschaft, 53(4):160-166, ISSN 0016-478X.

FAO. 2016. http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E (Erişim Tarihi: 3 Şubat 2016).

GARCIA, R., ASINS, M. J., FORNER, J., and CARBONELL, E. A., 1999. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics, 99:511–518.

GARCIA-SECO, D., ZHANG, Y., GUTIERREZ-MAÑERO, F. J., MARTIN, C., and RAMOS-SOLANO, B., 2015. RNA-Seq analysis and transcriptome assembly for blackberry (*Rubus* sp. Var. Lochness) fruit. BMC genomics, 16(1):5.

GERLACH, D., 1984. Botanische Mikrotechnic. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.311 p.

GERMANA, M. A., 2006. Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue Organ, 86:131–146.

GOLEIN, B., FIFAEI, R., and GHASEMI, M., 2011. Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interspecific crosses by inter simple sequence repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10(82):18965-18970.

GUO, F., YU, H., XU, Q., and DENG, X., 2015. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in an orange-pericarp mutant and wild type in pummelo (*Citrus grandis*). BMC Plant Biology, 15(1):1.

GÜVEN, N., 2010. Adana İlinde Turunçgillerin Pazarlama Yapısı ve Sorunları. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, s8.

HANSEY, C. N., VAILLANCOURT, B., SEKHON, R. S., LEON, N., KAEPPLER, S. M., and BUELL, C. R., 2012. Maize (*Zea mays* L.) Genome Diversity as Revealed by RNA-Sequencing. PLoS ONE, 7(3):1-10.

HECHT, V., VIELLE-CALZADA, J. P., HARTOG, M. V., SCHMIDT, E. D. L., GROSSNIKLAUS U., DE VRIES S. C., 2001. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiology, 127:803-816.

HONG, Q. B., XIANG, S. Q., CHEN, K. L., and CHEN, L. G., 2001. Two complementary dominant genes controlling apomixis in genus Citrus and poncirus. Yi chuan xue bao= Acta genetica Sinica, 28(11):1062-1067.

HU, H., XIONG, L., YANG, Y., 2005. Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defence response against fungal infection. Planta, 222:107-117.

JI, X. H., ZHANG, R., WANG, N., YANG, L., and CHEN, X. S., 2015. Transcriptome profiling reveals auxin suppressed anthocyanin biosynthesis in red-fleshed apple callus (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 123(2):389-404.

JIAO, W. B., HUANG, D., XING, F., HU, Y., DENG, X. X., XU, Q., and CHEN, L. L., 2013. Genome-wide characterization and expression analysis of genetic variants in sweet orange. The Plant Journal, 75(6):954-964.

KAFA, G., and CANIHOŞ, E., 2010. Turunçgil Yetiştiriciliği. YAYÇEP, yayın no: 54.

KAHN, T. L. DEMASON, D. A., 1988. Citrus pollen tube development in cross-compatible gynoecia, self-incompatible gynoecia, and *in vitro*. Canadian Journal of Botany, 66:12: 2527-2532.

KARAHOCAGİL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.

KEPIRO, J. L., 2003. Molecular genetic analysis of nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. PhD dissertation, The University of California, Riverside, California.

KEPIRO, J. L., and ROOSE, M. L., 2007. Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. Nuceller Embryony, pp:141-150.

KEPIRO, J. L., and ROOSE, M. L., 2010. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata.* Tree Genetics & Genomes, 6:1–11.

KISHORE, K., MONIKA N., RINCHEN D., LEPCHA, B., and PANDEY, B., 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. Scientia Horticulturae, 138:101–107.

KLUG, S. W., and CUMMINGS, W.R., 2000. Concept of Genetics, Prentice Hall, New Jersey, pp. 745.

KOLTUNOW, A. M., 1993. Apomixis: Embryosac sand embryos formed with out meiosis or fertilization in ovules. The Plant Cell, 5:1425-1437.

KOLTUNOW, A. M., SOLTYS, K., NITO, N., and MCCLURE, S., 1995. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. Canadian Journal of Botany, 73:1567-1582.

KUMAR, V., MALIK, S. K., PAL, D., SRINIVASAN, R., and BHAT, S. R., 2014. Comparative transcriptome analysis of ovules reveals stress related genes associated with nucellar polyembryony in Citrus. Tree Genetics & Genomes, 10:449–464.

LANG, P., ZHANG, C., EBEL, R. C., DANE, F., and DOZIER, W. A., 2005. Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by Mrna differential display. Gene, 359:111–118.

LEGAY, S., GUERRIERO, G., DELERUELLE, A., LATEUR, M., EVERS, D., ANDRÉ, C. M., and HAUSMAN, J. F., 2015. Apple russeting as seen through the RNA-Seq lens: strong alterations in the exocarp cell wall. Plant Molecular Biology, 88(1-2):21-40.

LI, D., DENG, Z., QIN, B., LIU, X., and MEN, Z., 2012. *De novo* assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). BMC genomics, 13(1):192.

LIANG, M., YANG, X., LI, H., SU, S., YI, H., CHAI, L., and DENG, X., 2015. *De novo* transcriptome assembly of pummelo and molecular marker development. PloS One, 10(3):0120615.

LIN, Q., WANG, C., DONG, W., JIANG, Q., WANG, D., LI, S., CHEN, M., LIU, C., SUN, C., and CHEN, K., 2015. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. Gene, 554(1):64-74.

LIU, W., YE, Q., JİN, X., HAN, F., HUANG, X., CAİ, S., and YANG, L., 2016. A spontaneous bud mutant that causes lycopene and β-carotene accumulation in the juice sacs of the parental Guanxi pummelo fruits (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). Scientia Horticulturae, 198:379-384.

MAHESWARI, P., 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. Mgraw Hill, New York, London.

MARTIN-TANGUY, J., 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation, 34.(1):135-148.

MAXAM, A., and GILBERT, W., 1977. A new method of sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74:560-564.

NAGESWARA RAO, M., SONEJI, J. R., CHEN, C., HUANG, S., and GMITTER, F. G., 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. Tree Genetics & Genomes, 4:113–124.

NAKANO, M., KIGOSHI, K., SHIMIZU, T., ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., and OMURA, M., 2013. Characterization of genes associated with polyembryony and in vitro somatic embryogenesis in Citrus. Tree Genetics and Genomes, 9(3):795-803.

NAKANO, M., SHIMADA, T., ENDO, T., FUJII, H., NESUMI, H., KITA, M., EBINA, B., SHIMIZU, T., and OMURA, M., 2012. Characterization of genomic sequence showing strong association with polyembryony among diverse Citrus species and cultivars, and its synteny with *Vitis* and *Populus*. Plant Science, 183:131-142.

NAKANO, M., SHIMIZU, T., KUNIGA, T., NESUMI, H., and OMURA, M., 2008. Mapping and Haplotyping of the Flanking Region of the Polyembryony Locus in *Citrus unshiu* Marcow. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 77(2):109–114.

NIU, J., HOU, X., FANG, C., AN, J., HA, D., QIU, L., JU, Y., ZHAO, H., DU, W., QI, J., ZHANG, Z., LIU, G., and LIN, S., 2015. Transcriptome analysis of distinct *Lindera glauca* tissues revealed the differences in the unigenes related to terpenoid biosynthesis. Gene, 15;559(1):22-30.

OIYAMA, I., and KOBAYASHI, S., 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a *Citrus* tetraploid. HortScience, 25(10):1276-1277.

OPHIR, R., SHERMAN, A., RUBINSTEIN, M., ESHED, R., SCHWAGER, M. S., HAREL-BEJA, R., YA'AKOV, I. B., and HOLLAND, D., 2014. Single nucleotide polymorphism markers from *de-novo* assembly of the pomegranate transcriptome reveal germplasm genetic diversity. PloS One, 9(2):88998.

PAN, Z., GUAN, R., ZHU, S., and DENG, X., 2009. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Plant Cell Reports, 28(2):281-289.

PARLEVLIET, J. E., and CAMERON, J. W., 1959. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 74:252–260.

PEREZ-TORNERO, O., and PORRAS, I., 2008. Assessment of polyembryony in lemon: rescueand *in vitro* culture of immature embryos. Plant Cell Tissue Organ Culture, 93:173-180.

SALAJ, J., VON RECKLINGHAUSEN, I. R., HECHT, V., DE VRIES, S. C., SCHEL J. H. N., VAN LAMMEREN, A. A. M., 2008. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochemistry, 46(7):709-714.

SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R., 1977. DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74:5463-5467.

SANHUEZA, D., VIZOSO, P., BALIC, I., CAMPOS-VARGAS, R., and MENESES, C., 2015. Transcriptomic analysis of fruit stored under cold conditions using controlled atmosphere in *Prunus persica* cv.“Red Pearl”. Frontiers in Plant Science, 6:788.

SCHELLENBAUM, P., JACQUES, A., MAILLOT, P., BERTSCH, C., MAZET, F., FARINE, S., WALTER, B., 2008. Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Rep, 27:1799-1809.

SCHMIDT E. D. L., GUZZO, F., TOONEN, M. A. J., DE VRIES, S. C., 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic cells competent to form embryos. Dev, 124:2049-2062.

ŞİMŞEK, Ö., 2009. Bazı Turunçgil Anaçlarında Demir (Fe) Klorozuna Dayanıklılıktan Sorumlu Genlerin SSCP Markırlarıyla Allelik Çeşitliliğinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 92s.

SMITH, L. M., SANDERS, J. Z., KAISER, R. J., HUGHES, P., DODD, C., CONNELL, C. R., HEINER, C., KENT, S. B., and HOOD, L. E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature, 321(6071):674-679.

SPILLANE, C., STEIMER, A., and GRISSNIKLAUS, U., 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. Sex. Plant Reprod, 14:179-187.

STÖSSER, R., KAKA, N., ANVARI, S. F., ETİ, S., 1985. Bahçe bitkilerinde döllenme biyolojisi uygulamalı kurs notları, pp: 18-22. Mart Adana (Yayınlanmamış).

TAHIR, M., LAW, D. A., and STASOLLA, C., 2006. Molecular characterization of PgAGO, a novel conifer gene of the ARGONAUTE family expressed in apical cells and required for somatic embryo development in spruce. Tree Physiol, 26:1257-1270.

TAKAHATA, K., 2008. Isolation of carrot Argonaute1 from subtractive somatic embryogenesis cDNA library. Biosci Biotechnol Biochem, 72:900-904.

TAN, F. Q., TU, H., LIANG, W. J., LONG, J. M., WU, X. M., ZHANG, H. Y., and GUO, W. W., 2015. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. BMC Plant Biology, 15(1):1.

TANG, N., DENG, W., HU, N., CHEN, N., and LI, Z., 2016. Metabolite and transcriptomic analysis reveals metabolic and regulatory features associated with Powell orange pulp deterioration during room temperature and cold storage. Postharvest Biology and Technology, 112:75-86.

TEROL, J., TADEO, F., VENTIMILLA, D., and TALON, M., 2015. An RNA-Seq-based reference transcriptome for *Citrus*. Plant Biotechnology Journal, 1:13.

THOMAS, C., MEYER, D., HIMBER, C., and STEINMETZ, A., 2004. Spatial expression of a sunflower ***SERK*** gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Plant Physiol Biochem, 42:35-42.

TOLIA, N. H., and JOSHUA-TOR, L., 2007. Slicer and the argonautes. Nature chemical biology, 3(1):36-43.

TUZCU, Ö., 1998. Turunçgiller Ders Notları. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü (yayınlanmamış).

WAKANA, A. and UEMOTO, S., 1987. Adventive embryogenesis in *Citrus*. I. Occurence of adventive embryos without pollination or fertilization. American Journal of Botany, 74:517-530.

WAKANA, A. and UEMOTO, S., 1988. Adventive embryogenesis in *Citrus* (Rutaceae). II. Postfertilization development. American Journal of Botany, 75:1031-1047.

WANG, J., ZHENG, R., BAI, S., GAO, X., LIU, M., and YAN, W., 2015c. Mongolian almond (*Prunus mongolica* Maxim): the morpho-physiological, biochemical and transcriptomic response to drought stress. PloS One, 10(4):e0124442.

WANG, M., ZHANG, X., and LIU, J. H., 2015a. Deep sequencing-based characterization of transcriptome of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) in response to cold stress. BMC Genomics, 16(1):1.

WANG, N., ZHENG, Y., DUAN, N., ZHANG, Z., JI, X., JIANG, S., SUN, S., YANG, L., BAI, Y., FEI, Z., and CHEN, X., 2015b. Comparative Transcriptomes Analysis of Red-and White-Fleshed Apples in an F_1 Population of *Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana* Crossed with *M. domestica* 'Fuji'. PloS One, 10(7):e0133468.

WANG, S., LU, B., WU, T., ZHANG, X., XU, X., HAN, Z., and WANG, Y., 2014. Transcriptomic analysis demonstrates the early responses of local ethylene and redox signaling to low iron stress in *Malus xiaojinensis*. Tree Genetics & Genomes, 10(3):573-584.

WANG, Z., GERSTEIN, M., and SNYDER, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10(1):57-63.

WEBBER, H. J., 1900. Complications in citrus hybridization caused by polyembryony. Science, 11:308.

WEI, C., TAO, X., LI, M., HE, B., YAN, L., TAN, X., and ZHANG, Y., 2015b. De novo transcriptome assembly of *Ipomoea nil* using Illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification. Molecular Genetics and Genomics, 290 (5):1873-84.

WEI, H., CHEN, X., ZONG, X., SHU, H., GAO, D., and LIU, Q., 2015a. Comparative transcriptome analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis in the red and yellow fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.). PloS One, 10(3):0121164.

WU, H. X., J. I. A., H. M., MA, X. W., WANG, S. B., YAO, Q.S., XU, W. T., ZHOU, Y. G., GAO, Z. S., and ZHAN, R. L., 2014b. Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. Journal of Proteomics, 105:19-30.

WU, J., XU, Z., ZHANG, Y., CHAI, L., YI, H., and DENG, X., 2014a. An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. Journal of Experimental Botany, 65(6):1651-1671.

WU, T., WANG, Y., ZHENG, Y., FEI, Z., DANDEKAR, A.M., XU, K., HAN, Z., and CHENG, L., 2015. Suppressing Sorbitol Synthesis Substantially Alters the Global Expression Profile of Stress Response Genes in Apple (*Malus domestica*) Leaves. Plant and Cell Physiology, pcv092.

WU, X. B., WANG, J., LIU, J. H., AND DENG, X. X., 2009. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. Journal of Plant Physiology, 166(1):52-62.

YAN, X., ZHANG, X., LU, M., HE, Y., and AN, H., 2015. '*De novo* sequencing analysis of the *Rosa roxburghii* fruit transcriptome reveals putative ascorbate biosynthetic genes and EST-SSR markers. Gene, 25; 561 (1):54-62.

YU, K., XU, Q., DA, X., GUO, F., DING, Y., and DENG, X., 2012. Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). BMC Genomics, 13(1):1.

ZHANG, G., GUO, G., HU, X., ZHANG, Y., LI, Q., LI, R., ZHUANG, R., LU, Z., HE, Z., FANG, X., CHEN, L., TIAN, W., TAO, Y., KRISTIANSEN, K., and ZHANG, X., 2010. Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. Genome Research, 20:646-654.

ZHANG, H., WEI, L., MIAO, H., ZHANG, T., and WANG, C., 2012a. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. BMC Genomics, 13(1):1.

ZHANG, J., LIANG, S., DUAN, J., WANG, J., CHEN, S., CHENG, Z., ZHANG, Q., LIANG, X., and LI, Y., 2012b. De novo assembly and Characterisation of the Transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). BMC Genomics, 13(1):90.

ZHANG, L., CHEN, K., and XU, C., 2008. Identification and Characterization of Transcripts Differentially Expressed in Peel and Juice Vesicles of Immature and Ripe Orange (*Citrus sinensis*) Fruit, Plant Molecular Biology Reporter, 73:121–132.

ZHANG, S., DING, F., HE, X., LUO, C., HUANG, G., and HU, Y., 2015. Characterization of the 'Xiangshui' lemon transcriptome by *de novo* assembly to discover genes associated with self-incompatibility. Molecular Genetics and Genomics, 290(1):365-375.

ZHANG, Y. J., WANG, X. J., WU, J. X., CHEN, S. Y., CHEN, H., CHAI, L. J., and YI, H. L., 2014. Comparative Transcriptome Analyses between a Spontaneous Late Ripening Sweet Orange Mutant and Its Wild Type Suggest the Functions of ABA, Sucrose and JA during Citrus Fruit Ripening. PloS One, 9(12):116056.

ZHOU, Y., CHEN, L., FAN, X., and BIAN, Y., 2014. *De Novo* Assembly of *Auricularia polytricha* Transcriptome Using Illumina Sequencing for Gene Discovery and SSR Marker Identification. PLoS One, 9 (3):91740.

ZHU, Y., LI, Y., XIN, D., CHEN, W., SHAO, X., WANG, Y., and GUO, W., 2015. RNA-Seq-based transcriptome analysis of dormant flower buds of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*). Gene, 25; 555 (2):362-76.

ÖZGEÇMİŞ

22/09/1984 tarihinde Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2002 yılında başladığı Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2009 yılında tamamladı. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümünde doktora öğrenimine başladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı ve halen aynı kurumda Biyolog olarak görevine devam etmektedir.

EKLER

EK 1. Tüm örneklere ait ifade olan genlerin listesi ve FPKM değerleri

Gene ID	FPKM Değerleri					
	Algerian 3. gün	Algerian balon	Orlando balon	Orlando 1. gün	Orlando 3. gün	Orlando 5. gün
18049575	9270.44	13075.13	12366.06	7577.47	9309.96	8411.57
18049576	7452.82	13940.66	17778.3	8457.98	8706.87	6833.7
18055487	6370.75	3875.63	2482.83	798.76	1179.24	1798.91
18051925	6280.01	8088.83	12030.67	8299.6	6952.34	6269.8
18033883	4578.31	8267.43	6888.42	4141.94	3789.1	3740.32
18035848	3608.55	2809.46	2227.46	2560.71	2537.67	3055.49
18038477	3034.23	5942	3715.69	3864.05	2604.79	2535.67
18039174	3011.04	940.41	1288.44	925.4	1209.21	1343.97
18034655	2922.12	3900.58	6786.78	2184.32	3463.91	2992.34
18050743	2574.85	4475.03	3079.08	3049.17	2915.41	2746.3
18050900	2534.9	3244.57	2384.72	1576.9	1643.76	1570.73
18048807	2534.17	3099.8	5164.03	5639.76	4402.17	4079.09
18049579	2091.67	3078.18	2623.12	1546.28	1563.29	2028.26
18035225	2005.03	1857.65	856	1135.33	1454.3	1629.68
18033506	1971.91	2602.21	3556	2665.42	2329.88	1919.93
18032744	1940.45	2971.42	2984.33	3163.36	2165.44	1764.3
18054645	1401.57	1214.49	1659.22	1027.44	1180.53	1104.19
18035879	1398.36	2386.46	1318.33	1030	1183.02	1147.67
18033974	1356.54	1216.2	2479.49	800.75	1218.55	1204.22
18039091	1297	1670.06	1204.79	1569.48	1429.08	1306.02
18040857	1287.43	1158.64	1400.31	869.92	1053.38	1003.25
18050005	1245.97	1750.26	891.73	552.2	680.09	1059.16
18040645	1232.2	1287.05	1776.15	1444.04	1300.19	1017.32
18039872	1218.07	2006.89	632.02	668.72	583.52	758.08
18047932	1106.56	545.54	1505.84	1273.55	920.01	847.38
18050004	1062.76	1592.12	621.47	333.99	426.31	646.06
18041230	1060.21	1151.39	1073.25	2223.86	1733.64	1822.32
18054682	1058.92	1121.93	1173.1	777.65	1165.92	1013.28
18038722	1040.54	795.48	947.21	962.28	817.4	767.64
18036209	1025.19	1255.38	978.29	680.48	755.63	646.35
18032618	1004.95	982.59	1575.84	1308.65	1127.24	949.12
18039760	1002.35	634.71	180.38	539.23	627.1	949.42
18052054	949.93	600.42	871.9	452.91	586.7	653.43
18046962	928.26	1389.27	958.97	925.03	865.18	820.23
18041483	909.59	1355.24	1397.7	871.37	903.74	644.52
18055466	904.39	671.23	685.89	483.76	645.47	557.89
18033806	902.36	1367.37	413.4	1026.82	857.34	784.12
18034822	901.25	1289.84	621.89	586.32	674.31	601.69
18042237	885.58	1912.7	1612.75	1001.79	946.55	855.71
18034302	872.28	968.75	450.25	467.14	458.62	450.71
18045508	852.76	817.08	529.65	705.43	728.76	985.23
18049151	805.83	1172.95	1020.99	1039.81	974.01	913.42
18036667	793.5	1132.46	548.99	490.69	743.45	739.45
18041383	790.3	889.21	1210.75	1484.03	1391.49	1386.1
18056092	776.86	732.3	439.19	595.74	714.78	698.56
18055479	771.56	1276.41	343.95	101.59	78.94	88.08
18041660	771.16	1641.36	4785.66	2184.81	2811.79	2363.15

18048745	768.56	857.71	864.97	476.78	531.77	467.52
18050517	766.51	354.41	327.03	412.36	450.64	576.05
18034159	739.64	815.22	852.19	575.85	586.93	641.07
18045154	732.41	539.36	291.7	278.61	418.42	519.73
18033667	726.1	837.23	728.68	835.7	905.63	901.67
18040008	722.66	666.77	863.94	665.87	627.71	637.26
18050323	702.59	738.13	589.8	586.82	500.68	380.6
18037544	699.43	326.84	320	247.51	296.72	330.97
18040006	695.93	669.26	846.01	685.41	841.81	787.66
18052558	694.25	1010.1	433.59	430.22	530.63	511.57
18053095	688.96	1030.5	797.56	733.92	960.25	942.15
18038981	683.78	1017.51	968.32	616.59	671.78	535.47
18044375	682.78	1213.03	1324.76	1292.42	959.73	860.59
18044429	680.59	1167.38	1723.91	1332.34	1060.92	874.52
18036300	678.3	849.69	771.38	806.78	646.44	708.97
18046562	677.07	1078.14	585.39	560.71	583.17	627.97
18043358	669.41	1316.42	1135.12	1177.35	1079.63	914.24
18037885	658.33	695.93	294.95	406.69	477.92	477.42
18043954	646.62	1474.78	1876.75	954.45	827.06	613.83
18041863	640.47	717.76	469.56	666.46	599.7	639.48
18038615	629.02	532.33	199.83	724.71	697.21	966.47
18049577	618.7	762.09	869.4	751.92	716.61	647.8
18034787	609.29	727.74	532.58	553.6	553.93	483.6
18052577	604.85	491.95	326.36	340.76	379.03	449.62
18037689	591.86	991.16	916.57	846.32	680.59	723.06
18034542	585.41	706.43	418.94	446	488.14	563.21
18055824	559.34	549.42	1381.75	809.03	762.46	717.24
18048985	553.31	595.66	216.16	315.57	442.13	447.16
18045372	550.06	428.08	294.77	281.38	410.9	368.76
18035822	546.14	871.49	310.22	271.71	233.93	153
18045515	544.23	659.22	257.94	307.61	316.47	273.01
18047913	540.05	1133.38	673.26	620.99	711.1	493.42
18039298	533.46	552.39	57.96	102.52	90.94	130.17
18038959	529.13	1092.7	747.71	618.56	603.08	515.34
18052032	527.43	737.4	344.58	805.37	758.13	774.05
18046254	524.99	953.15	424.86	371.61	524.25	893.49
18038946	524.83	547.02	332.79	278.04	298.31	361.03
18042438	519.62	538.97	841.22	681.16	615.43	535.75
18040888	510.72	559.54	560.4	792.31	676.25	672.77
18048720	499.18	470.23	785.85	653.13	537.99	455.99
18038151	496.02	501.28	214.26	345.58	280.52	355.72
18038444	493.13	621.99	350.47	336.91	504.76	401.96
18051020	493.12	458.2	318.24	216.45	278.62	308.2
18035509	491.66	324.86	246.37	280.13	294.13	311.12
18044876	491.53	764.17	688.98	660.54	661.15	640.83
18047193	491	653.51	598.66	1209.67	880.92	863.47
18049115	489.56	617.95	697.69	484.06	452.88	412.25
18032368	489.51	567.55	305.37	696.82	495.84	411.34
18049028	487.15	384.25	248.5	337.94	333.97	410.65
18035874	485.6	297.25	193.54	178.31	225.16	268.24
18055590	475.5	539.37	344.73	194.39	232.51	250.02
18043493	469.65	1258.85	884.41	1044.38	708.59	493.56
18037444	466.57	623.04	695.47	756.36	761.3	708.86

18038727	460.55	538.66	375.61	501.54	490.22	511.89
18049275	448.53	542	599.38	424.77	420.96	404.87
18049785	447.64	431.5	376.55	493.43	564.78	439.26
18035551	447.23	256.08	207.1	399.17	421.96	482.99
18036949	447.09	807.53	560.64	673.26	482.89	551.23
18050758	442.08	628.79	856.35	998.74	1035.66	1007.67
18049944	441.06	662.25	175.92	103.79	150.77	229.14
18052860	440.35	1087.38	339.42	264.14	181.38	136.16
18037082	430.67	848.13	729.24	622.91	552.63	529.26
18055551	429.82	228.89	153.5	193.36	275.33	353.26
18038217	426.92	399.49	448.64	373.84	369.56	334.21
18035130	424.75	435.3	536.8	578.12	582.9	587.55
18038454	423.11	781.1	266.14	650.21	469.02	539.66
18052449	422.96	405.94	248.22	342.09	363.1	353.71
18034451	419.71	761.64	425.18	536.98	412.19	404.36
18032580	418.56	1035.48	993.35	849.97	822.32	645.64
18038181	418.23	481.72	396.53	339.33	332.24	332.74
18054693	416.42	367.57	350.56	369.38	313.87	438.12
18040739	415.6	638.48	618.98	601.33	438.81	321.59
18039598	415.24	217.07	252.51	336.44	452.25	445.7
18055968	415.2	560.79	508.15	591.26	552.16	562.91
18045039	414.7	398.43	179.51	100.87	137.75	167.59
18033356	414.03	429.44	503.35	368.77	416.8	356.2
18055221	404.28	436.01	604.33	600.8	539.29	484.52
18041994	403.91	1068.81	531.57	829.11	1253.94	795.79
18055860	403.06	327.57	62.51	44.47	96.98	84.88
18035532	399.9	294.7	326.84	234.58	292.07	331.03
18034517	398.39	430.34	673.43	247.82	387.66	391.96
18047657	390.59	667.17	489.43	490.7	470.08	434.68
18044530	389.35	452.74	273.14	362.67	365.78	363.89
18053463	386.95	346.04	298.71	289.41	289.61	291.72
18039975	386.69	500.03	444.14	401.83	394.54	418.2
18050199	386.1	272.76	432.3	444.19	356.66	350.7
18049945	384.2	459.92	459.46	363.98	328.95	343.9
18051359	380.53	369.93	21.99	130.62	176.68	154.62
18036932	377.79	333.07	526.83	452.23	468.17	483.36
18039386	374.31	428.59	168.89	160.37	226	197.24
18035293	373.79	452.91	344.32	530.26	382.64	396.13
18044399	373.67	365.21	157.18	294.97	319.27	385.01
18039331	371.71	225.46	153.5	208.07	295.62	348.16
18054789	368.66	269.09	336.44	238.07	273.99	293.47
18054028	368.5	375.7	306.87	304.08	454.02	405.05
18039106	366.04	420.42	206.86	252.76	340.06	313.03
18032751	364.57	585.41	403.27	474.18	439.18	418.52
18043542	362.35	558.02	435.96	102.21	191.66	184.83
18056131	361.5	464.6	298.65	217.58	283.33	272.04
18050996	361.19	416.18	1424.42	915.49	701.56	552.54
18056093	360.46	547.51	277.51	169.34	316.91	358.85
18050440	357.73	284.82	314.29	365.94	357.18	378.08
18042005	349.12	242.14	444.14	287.32	295.52	262.46
18037761	348.75	343.13	313.74	261.44	275.27	255.45
18044350	346.75	409.69	413.29	341.43	421.38	422.44
18047468	345.4	285.89	344.37	262.94	282.19	204.32

18031719	344.19	258.05	357.58	327.69	337.14	369.31
18046298	343.9	485.28	365.73	339.95	332.56	353.69
18044628	343.23	279.4	192.84	325.1	348.25	419.58
18047547	342.76	204.35	312.56	200.85	210.37	213.45
18044376	342.56	657.02	697.32	571.05	480.87	398.37
18033002	341.7	347.17	394.38	433.72	428.36	369.48
18041681	340	280.98	296.45	269.54	304.09	307.53
18035218	338.94	466.5	442.23	497.26	529.33	482
18045712	337.67	862.93	655.23	571.55	524.01	438.06
18031573	335.88	301.43	334.16	285.51	288.58	279.42
18032149	334.69	367.56	40	360.57	133.28	95.29
18053261	332.78	460.84	747.83	1421.02	1529.74	815.25
18052498	331.92	710	719.44	347.29	334.33	284.86
18032434	330.58	255.79	319.95	407.04	376.17	424.98
18046073	329.6	398.81	383.01	496.04	449.57	415.54
18054092	328.9	347.22	451.08	416.3	383.69	403.81
18033850	328.08	436.3	199.03	252.88	238.5	245.06
18054119	325.24	244.32	149.46	261.44	245.87	265.3
18040776	323.27	283.57	170.67	175.23	200.17	216.17
18044762	322.22	764.96	575.93	379.63	375.84	301.68
18032402	321.29	382.65	448.36	315.57	350.66	382.47
18034332	318.95	223.74	336.7	227.6	269.6	249.12
18033367	318.72	436.85	334.36	217.18	296.3	283.77
18045228	318.68	276.63	326.89	265.91	306.64	221.99
18053445	318.63	473.7	175.37	330.33	300.68	400.63
18034135	318.25	164.08	257.33	303.04	394.25	473.05
18053050	318.12	353.21	404.76	150.09	127.94	126.19
18045888	317.26	267.12	381.93	280.6	271.76	260.4
18037526	317.16	230.2	261.96	399.21	376.81	414.97
18041399	315.37	689.43	106.94	346.8	1256.96	1058.64
18038848	314.81	497.62	553.88	369.97	352.92	297.78
18032785	314.44	469.55	421.11	409.06	392.8	366.71
18031254	313.25	367.91	411.55	271.15	252.3	228.61
18039364	312.9	167.7	136.64	331.99	238.64	355.77
18044960	312.36	502.8	515.77	481.66	451.27	399.44
18041291	311.69	495.22	603.41	345.25	347.33	378.58
18034483	311.6	813.39	577.13	550.28	489.31	409.21
18050902	311.35	181.15	180.14	199.33	237.86	263.74
18040594	309.83	444.66	379.02	341.15	358.83	241.29
18035009	309.82	358.32	281.19	336.67	298.61	331.36
18052272	309.6	354.86	320.01	323.98	330.11	378.99
18054917	309.57	367.77	224.32	249.05	441.72	468.62
18031223	306.13	297.86	348.32	485.64	395.2	363.76
18055370	304.67	256.95	451.69	240.6	303.72	339.94
18043572	302.91	576.41	662.68	554.17	516.27	456.14
18037947	302.51	390.4	398.47	437.32	448.01	408.91
18053262	302.48	482.12	137.1	276.13	294.96	177.02
18036337	299.45	337.55	331.75	278.24	288.77	261.51
18035955	297.82	202.13	182.89	215.9	235.01	318.77
18037566	296.69	426.2	478.97	355.69	339.18	308.51
18033381	296.61	339.7	255.42	219.89	229.42	184.37
18043711	295.01	248.4	341.17	241.07	277.17	283.88
18054046	293.91	356.4	201.52	116.51	149.63	177.55

18042520	292.17	397.08	79.19	83.59	129.38	127.3
18048155	291.77	245.77	138.35	253.82	301.21	309.34
18045570	291.21	565.96	397	415.79	375.36	344.78
18042975	290.47	448.13	382.87	417.66	349.55	268.64
18044470	289.57	650.6	603.93	545.17	411.95	375.62
18044969	287.67	662.49	552.27	557.87	470.98	384.56
18055432	286.89	297.48	241.45	294.43	294.87	356.98
18034948	284.64	571.4	658.86	3029.72	2733.86	1968.39
18037474	284.22	569.06	461.61	381.39	340.69	279.34
18047764	284.05	291.59	382.41	331.98	337.88	349.47
18042280	283.87	323.27	261.8	230.05	212.55	251.3
18054940	282.45	466.04	498.19	453.71	426.43	365.56
18036827	281.6	192.32	222.48	224.69	226.78	238.02
18032892	281.4	297.77	290.8	204.95	243.69	251.11
18033218	280.69	406.71	324.6	310.76	437.2	414.55
18036276	277.44	214.46	86.81	151.55	172.17	206.09
18052733	277.36	120.15	122.82	152.55	174.46	200.05
18047777	276.47	163.88	173.5	161.27	175.67	183.09
18040785	275.44	375.32	298.99	311.66	304.9	292.07
18042078	273.89	347.46	423.51	418.64	384.62	353.09
18043475	272.91	159.81	183.69	202.93	223.82	257.66
18055490	272.69	368.44	333.64	356.76	322.98	326.7
18037995	272.11	233.51	264.2	154.23	221.66	207.88
18056156	271.67	169.88	161.09	121.06	144.16	194.74
18055205	270.63	345.59	255.41	298.52	257.23	271.26
18045536	270.58	309.36	593.12	358.4	356.74	296.79
18048547	267.79	394.57	318.27	291.13	277.04	274.4
18033519	267.47	261.84	225.45	198.42	241.48	255.94
18039362	267.34	382.7	300.1	197.29	198.27	185.52
18033263	262.26	324.11	298.24	186.83	182.98	145.33
18044424	261.97	325.04	260.14	195.28	187.88	196.71
18040537	261.35	532.9	479.75	461.12	424.99	334.86
18051089	261.2	263.06	228.49	234.42	232.32	244.14
18051609	261.13	212.09	168.48	134.74	160.46	170.68
18054054	260.59	303.21	187	94.07	125.44	150.08
18040878	260.58	436.24	272.28	825.28	1008.27	867.31
18033065	260.37	292.5	168.07	106.67	63.28	47.82
18050339	260.21	358.7	516.33	597.89	511.33	541.34
18031532	260.13	341.17	293.37	256.3	246.38	270.5
18033464	259.36	498.03	370.9	397.73	382.99	378.41
18034097	257.71	138.65	117.89	134.57	169.88	181.32
18046561	256.63	331.36	217.75	277.44	259.9	357.08
18043481	255.53	318.93	294.98	72.04	64.02	41.07
18032255	255.23	393.28	300.75	228.14	235.12	210.17
18053472	254.63	360.2	291.85	400.85	369.34	366.76
18039593	253.32	455.01	417.69	362.67	313.67	278.64
18040203	252.57	183.01	81.7	257.43	336.3	239.79
18033465	251.62	184.02	139.07	168.67	180.92	183.96
18032750	249.88	246.18	314.21	263.15	252.68	228.83
18039717	249.33	277.4	291.18	316.8	299.78	264.59
18037701	249.14	485.32	275.74	446.59	353.54	370.01
18055138	248.79	172.97	47.02	123.11	163.34	202.63
18056136	248.42	379.34	324.47	330.43	305.68	284.02

18045038	248.18	306.07	128.66	87.93	134.28	135.44
18045081	247.61	1850.29	3274.31	2608.16	2066.35	1037.44
18049802	247.45	206.7	156.18	137.98	153.48	161.79
18045139	247.03	167.34	111.5	137.01	312.06	339.35
18039769	246.97	297.57	232.96	201.65	188.8	190.63
18036082	246.65	212.66	155.17	118.94	149.48	138.82
18054941	246.62	412.99	525.7	284.5	252.57	205.62
18035289	246.07	260.26	425.24	277.11	213.04	180.34
18038747	245.19	353.64	379.89	472.22	335.53	215.84
18048401	244.39	386.18	418.41	414.4	354.89	355.93
18044911	243.34	179.41	202.41	185.3	202.6	210.74
18039360	243.17	374.27	361.03	408.66	359.25	331.26
18046053	243.02	229.11	135.18	209.29	199.74	232.68
18041624	242.75	641.27	501.06	381	362.73	265.62
18050024	242.74	234.66	286.97	192.89	202.47	165.07
18048648	242.58	220.71	170.48	273.13	280.41	372.99
18053992	241.77	410.71	418.29	472.75	398.77	347.23
18050712	240.46	193.73	96.16	119.15	175.55	207.64
18034598	240.42	189.29	201.19	230.54	216.47	224.11
18051012	240.03	327.89	269.53	340.45	321.93	316.23
18043894	238.19	393.4	334.78	746.6	497.41	557.45
18039445	237.25	255.42	296.43	219.95	218.51	238.07
18031987	237.13	300.94	344.21	261.54	226	229.94
18033848	235.19	302.03	65.5	159.79	127.54	161.4
18038675	234.82	372.67	347.34	423.17	363.65	326.95
18051251	234.77	228.92	234.69	187.67	201.07	204.61
18055822	234.57	178.58	224.01	255.14	311.37	301.37
18034663	234.07	204.61	286.49	145.7	171.78	162.08
18038916	234.03	204.3	200.18	228.71	252.4	272.89
18036870	233.93	313.56	177.92	122.94	172.03	198.96
18032530	233.54	422.31	389.15	484.72	420.2	361.02
18034482	232.48	275.1	182.5	129.29	164.33	130.29
18037782	231.9	101.93	150.55	105.55	127.45	142.76
18043348	230.76	359.26	295.49	263.99	201.29	140.8
18047760	230.34	314.7	294.59	284.83	284.52	277.18
18045517	230.08	471.53	498.86	485.25	417.69	353.43
18056171	228.46	467.81	373.53	293.64	266.52	228.78
18038879	227.45	237.54	136.41	281.34	306.48	314.84
18044649	227.12	410.85	310.88	349.72	296.56	294.3
18034679	226.87	348.15	348.92	368.35	317.04	306.25
18040827	226.23	604.54	649.76	734.76	468.8	488.56
18049113	225.63	294.52	423.43	310.15	293.18	219.71
18039545	224.77	170.06	119.14	151.85	221.4	265.49
18044018	223.91	275.47	150.01	144.32	134.77	141.02
18044961	223.36	378.09	211.24	176.77	140.26	124.32
18038086	222.78	290.86	194.74	174.7	163.72	133.13
18038141	222.39	343.11	308.13	376.66	385.78	365.78
18038495	221.81	267.24	245.14	636.01	413.2	448.41
18050878	221.53	390.93	277.66	374.57	337.19	279.85
18031626	221.39	293.77	117.71	116.69	148.35	173.11
18047654	220.39	306.01	165.83	315.09	215.47	228.35
18045882	220.24	313.08	342.4	266.26	277.17	210.4
18049299	219.41	202.83	196.95	262.76	259.51	247.17

18039792	219.3	451.17	370.22	382	342.03	299.14
18035222	219.18	232.76	284.75	227.78	221.91	220.32
18032167	217.95	237.01	343.05	274.54	291.47	270.07
18035540	217.87	308.49	148.61	238.12	204.15	199.17
18047494	217.69	384.84	154.98	263.24	206.52	221.24
18055839	217.47	41.19	115.23	72.65	92.63	105.62
18049269	217.35	249.34	125.47	219.12	225.51	250.87
18038875	217.31	219.49	135.29	148.84	189.25	211.1
18034036	215.91	186.87	156.33	151.07	177.75	212.93
18032157	215.46	210.76	203.89	141.17	143.27	153.32
18040595	214.86	289.37	305.64	208.91	255.52	185.81
18033993	214.42	197.52	141.36	121.29	157.42	202.96
18048026	213.68	461.59	421.44	283.81	255.58	222.36
18036087	213.3	141.41	225.1	159.21	186.3	235.98
18054254	212.4	290.54	151.77	216.56	183.96	166.39
18053370	212.16	238.93	143.76	259.92	200.03	191.5
18039033	212.09	257.78	224.8	239.37	212.9	210.94
18035451	212.02	336.64	410.66	245.63	236.36	214.13
18040385	211.87	160.52	147.9	136.9	168.86	141.35
18035330	211.83	198.37	202.67	143.68	151.66	139.81
18038960	211.65	487.33	444.56	416.53	336.69	306.77
18036789	211.11	205.94	224.33	142.72	132.18	108.83
18038427	210.89	305.41	493.9	305.09	270.36	239.23
18035148	210.46	365.83	348.31	303.52	237.94	251.14
18048968	210.14	261.47	230.03	303.14	285.11	290.1
18034204	209.35	151.06	153.08	137.01	144.16	154.4
18047405	209.34	379.66	331.25	299.7	254.26	214.69
18039215	208.28	266	256.32	209.64	198.97	211.28
18040813	207.79	101.88	82.09	102.16	118.28	139.48
18035482	207.64	189.47	256.88	148.47	154.67	140.03
18047191	207.41	99.34	267.59	211.4	153.36	156.74
18055495	207.4	132.88	112.71	215.55	247.98	285.14
18050151	206.77	127.15	149.73	240.43	221.26	204.51
18053772	206.17	411.39	410.69	395.14	340.1	291.12
18054210	205.27	174.5	83.88	117.42	149.6	161.52
18033103	204.91	454.93	430.11	400.06	335.67	282.32
18055269	204.87	291.94	278.52	308.88	289.71	292.53
18045323	203.86	196.86	245.25	172.76	168.1	167.21
18041847	203.83	287.05	436.91	328.49	282.49	242.45
18055481	203.44	104.35	162.24	150.89	140.98	158.54
18054819	202.67	166.26	165.66	456.29	402.66	531.22
18035120	202.58	285.69	309.38	224.14	221.5	198.23
18055765	201.49	155.26	185.06	169.46	160.46	179.37
18036420	201.22	210.32	104.04	213.51	233.46	285.46
18034411	200.78	218.51	55.17	53.84	61.93	89.43
18036846	200.44	253.73	206.19	277.26	248.04	255.43
18041825	200.22	536.85	410.55	439.88	369.94	342.31
18033097	199.7	314.46	305.53	334.15	302.17	304.32
18036164	199.45	339.72	423.22	230.21	208.21	208.54
18054687	199.22	222.66	133.16	242.93	245.91	247.53
18048710	198.84	265.38	222.41	242.32	249.83	220.12
18035158	197.72	180.84	75.4	155.12	200.07	200.34
18051010	197.71	240.54	137.07	181.36	170.37	172.32

18049918	197.61	225.09	161.9	160.21	190.27	194.48
18047686	196.24	152.6	153.87	162.15	182.97	191.18
18054356	196.23	148.18	204.35	197.2	225.77	241.1
18033481	196.1	223.9	182.12	184.22	166.92	156.72
18040917	196.03	469.67	343.71	327.74	261.1	217.42
18046443	195.84	384.15	358.85	312.97	283.17	223.19
18050404	195.52	80.73	99.49	135.15	153.37	171.86
18042511	195.35	74.35	147.39	93.73	97.3	104.1
18039933	195.22	551.29	398.3	365.36	319.73	301.23
18050425	195.03	350.26	313.08	352.07	313.8	269.66
18034059	195.01	211.77	206.54	236.95	199.96	182.32
18047218	195.01	130.38	190.01	142.99	160.97	149.45
18042569	194.2	201.67	83.54	240.01	182.96	205.86
18052236	193.65	194.78	228.83	199	183.92	198.78
18051349	193.31	466.75	371.33	331.59	282.58	226.85
18045112	193.14	272.57	226.97	228.89	199.5	159.67
18033735	193.01	285.62	265.29	317.22	297.44	267.59
18051367	191.83	305.95	502.91	472.42	470.07	418.38
18048154	191.63	185.51	74.34	91.13	85.15	93.67
18038162	191.46	245.95	252.14	143.44	162.41	140.85
18043271	191.21	282.1	248.06	343.21	287.08	278.2
18038877	191.18	107.05	34.87	87.29	155.62	167.02
18038292	191.11	251.23	202.52	309.96	260.79	260.03
18047520	191.05	359.65	161.55	205.83	208.78	188.93
18035436	190.65	287.06	301.1	292.37	260.26	247.66
18055913	190.46	88.45	108.12	164.22	189.4	224.56
18032758	190.41	366.29	256.23	185.69	180.36	178.06
18044863	189.86	193.26	103.97	146.9	228.68	209.6
18033863	189.35	147.32	93.62	148.79	167.3	148.47
18038476	189.14	313.1	216.51	224.42	239.74	165.53
18050704	189.11	331.95	370.74	297.31	261.86	216.45
18036044	188.95	142.21	202.37	155.47	169.64	150.35
18033411	188.31	191.26	174.68	114.65	121.94	114.89
18035261	187.69	360.07	328.24	344.84	298.38	257.23
18052579	187.68	560.67	636.27	424.32	425.23	359.79
18035530	186.02	203.77	144.02	148.21	173.43	163.93
18035112	185.86	133.22	62.2	81.4	99.08	108.75
18046168	185.66	293.28	178.86	223.59	210.95	261.48
18054779	185.63	114.1	207.07	128.89	154.38	170.17
18047203	185	161.89	296.84	152.01	146.4	133.01
18048092	184.32	254.28	241.6	221.48	237.41	232.38
18051897	184.27	139.37	126.8	155.65	170.1	200.57
18047721	184.11	219.55	147.15	162.73	165.43	191.45
18039840	184	61.59	103.58	99.43	140.5	178.23
18049583	183.94	129.39	119.32	124.84	140.91	148.21
18046088	183.37	147.69	43.44	123.18	129.56	158.72
18055665	183.11	397.3	368.86	367.11	318.4	256.64
18055838	183.09	36.87	90.33	60.6	73.34	105.57
18054830	182.9	210.38	196.3	210.47	195.5	194.84
18055804	182.38	138.71	146.48	132.87	166.08	174.18
18054279	182.37	114.19	164.27	220.56	198.05	213.03
18052869	182.17	255.08	243.66	325.48	326.05	206.17
18037630	181.56	215.6	117.61	110.68	158.01	145.07

18044197	181.56	398.8	289.82	283.89	275.16	264.7
18034837	181.21	344.25	323.65	228.58	223.81	198.02
18045905	181.06	455.25	425.44	458.45	369.34	344.5
18033558	181.02	254.65	185.05	192.74	175.81	182.91
18041845	180.84	299.48	145.93	305.68	256.64	275.14
18037067	180.49	478.34	258.82	272.35	199.62	222.05
18034413	180.41	226.46	173.75	255.85	211.39	214.4
18038556	180.35	201.75	204.82	158.41	168.39	144.5
18054587	180.25	216.47	170.85	303.6	232.53	256.57
18031953	180.23	320.21	293.82	327.85	253.39	263.85
18053006	179.95	202.26	138.9	151.92	151.16	141.23
18047488	179.76	280.35	246.49	130.15	135.64	142.33
18042192	179.75	145.49	91.76	111.61	169.44	246.59
18044773	179.58	159.15	155.4	193.8	175.06	174.08
18051795	179.43	273.89	233.84	205.46	208.78	171.26
18045468	179.19	79.09	134.67	105.33	122.08	123.43
18055428	178.99	163.13	128.79	318.85	347.09	299.78
18054393	177.78	75.95	114.82	117.19	113.24	146.59
18034303	177.77	133.91	94.41	90.66	154.22	188.71
18043025	177.55	264.07	258.29	159.82	178.97	113.97
18035377	177.47	304.82	479.33	441.23	354.41	373.29
18031486	177.41	247.92	100.03	97.22	126.37	128.13
18032765	177.18	203.06	228.93	189.14	176.25	188.13
18045297	177.16	269.66	256.61	299.98	257.53	277.22
18036841	176.64	425.96	340.67	266.5	117.27	55.94
18050245	176.17	288.17	338.01	385.16	265.11	241.93
18040745	175.91	233.68	203.01	250.89	254.6	246.64
18050950	175.91	190.86	199.52	140.47	143.17	141.44
18043864	175.59	238.87	161.36	162.51	152.97	141.58
18053964	175.48	106.24	43.06	60.38	75.25	105.6
18048971	174.93	252.25	254.28	285.26	258.35	246.32
18054316	174.6	159.42	201.39	262.12	232.25	224.67
18033979	174.47	374.95	285.12	261.59	250.93	198.87
18052904	174.4	94.2	128.19	108.15	128.83	147.04
18035887	174.36	188.41	122.63	177.73	200.9	249.31
18048698	172.88	238.64	212.24	171.98	148.05	159.33
18048103	172.66	52.02	96.34	103.07	103.73	126.81
18031746	172.59	83.46	61.82	89.27	88.24	71.49
18036008	172.59	335.29	89.6	25.58	32.27	19.88
18037132	172.58	472.32	385.5	271.59	235.79	202.71
18037052	172.56	152.08	131.33	106.75	109.92	113.49
18033661	172.15	106.92	98.82	85.58	97.59	106.12
18054594	172.12	288.39	340.46	262.32	248	188.05
18041968	171.42	308.4	280.21	488.98	457.11	392.44
18042122	171.39	349.89	270.76	341.7	261.53	239.25
18034808	170.88	182.12	225.23	224.09	213.57	161.13
18047217	170.78	177.97	246.13	184.99	173.17	160.15
18033023	170.64	411.15	524.08	301.3	235.79	182.11
18049734	170.54	180.59	221.9	189.87	215.86	182.68
18052288	170.46	117.73	157.09	229.64	209.98	234.84
18040068	170.43	144	29.61	31.13	22.48	29.84
18034960	170.34	459.68	373	406.89	311.67	253.38
18031517	170.26	38.76	83.09	85.8	92.41	132.31

18038227	169.89	173.24	160.17	242.35	208.67	214.75
18038131	169.71	68.18	62.98	63.2	101.06	108.32
18040647	169.23	131.18	159.66	170.4	174.46	181.85
18049725	168.74	234.8	187.18	175.56	181	160
18038771	168.42	196.78	99.21	220.2	199.05	222.2
18040067	168.15	365.57	237.42	614.31	991.65	733.32
18049753	168.12	52.82	107.91	80.64	88.38	100.13
18055316	168.06	175.45	95.51	191.93	174.85	186.98
18039268	167.83	277.56	205.49	206.88	187.71	162.46
18038299	167.79	718.75	737.92	213.93	251.27	158.26
18053894	167.49	303.52	318.39	261.02	247.6	204.6
18036748	167.47	166.78	26.29	607.91	417.48	310.4
18053612	167.31	205.33	197.8	200.13	199.38	208.3
18044336	167.3	179.8	138.15	144.64	172.95	175.24
18055707	167.08	106.95	136.66	149.6	204.2	174.47
18033921	166.59	85.98	130.32	114.72	131.2	135.59
18049278	166.51	152.76	192.52	203.64	217.35	223.26
18050174	166.09	202.39	90.13	109.49	103.81	102.1
18033807	166.04	338.34	371.92	328.44	272.79	237.68
18055701	165.51	204.41	161.49	240.86	271.58	306.49
18043480	165.42	290.9	253.02	251.02	218.53	198.42
18051860	165.02	166.98	162.69	156.93	175.06	155.24
18048843	164.47	60.83	93.87	87.26	99.78	96.93
18037996	164.32	231.05	190.12	87.58	76.19	42.87
18047793	163.94	110.51	156.88	160.57	178.52	204.49
18036163	163.66	191.03	179.88	196.32	178.15	187.71
18039994	163.47	176.12	170.18	225.88	212.23	235.37
18055589	163.39	183.06	123.56	74.76	83.37	89.9
18040197	162.68	190.32	86.56	197.29	202.23	254.82
18032037	162.3	163.9	143.89	160.43	225.02	226.73
18050897	162.24	148.67	98.35	93.71	141.24	113.82
18051773	161.93	184.96	82.92	121.22	140.47	158.11
18055171	161.74	259.01	265.21	287.1	241.66	214.36
18045478	161.46	230.9	196.62	333.24	295.61	278.03
18048135	161.37	291.58	256.39	225.6	192.21	169.04
18046255	161.29	228.84	100.59	112.32	235.14	453.01
18053247	161.26	97.11	115.43	109.27	118.08	122.61
18040145	160.82	161.92	232.65	185.47	183.68	173.77
18041327	160.78	20.7	57.24	38.45	49.18	62.35
18031340	160.61	255.71	251.47	261.92	255.02	212.45
18039172	160.55	387.71	323.41	363.1	302.45	248.79
18036100	160.5	193.46	316.27	169.86	204.07	233.14
18037061	160.28	45.2	91.1	66.29	75.06	88.21
18037804	160.16	131.05	114.34	124.93	121.72	117.59
18044560	159.95	88.42	59.91	82.63	93.1	131.4
18036948	159.74	217.21	318.39	203.95	214.05	218.84
18038258	159.68	296.47	260.36	279.5	217.01	200.63
18047994	159.57	159.32	92.41	184.14	151.04	177.29
18039903	159.56	137.66	140.52	108.29	108.58	109.87
18056110	159.54	305.55	240.69	188.2	168.69	139.45
18055638	159.2	91.46	99.99	123.19	124.93	123.35
18055274	158.66	232.95	239.11	242.12	249.55	239.9
18050899	158.57	171.87	121.01	109.79	112.94	116.76

18037749	158.48	138.73	85.35	214.19	179.52	237.62
18039000	158.37	352.51	323.7	272.3	227.88	183.67
18039953	158.33	247.05	253.48	239.01	180.73	174.4
18056067	158.32	209.6	251.91	168.42	172.2	169.07
18033020	158.24	374.05	527.02	383.94	327.91	308.7
18033912	158.14	141.05	164.55	121.1	130.5	118.2
18047568	157.98	255.35	259.79	66.28	68.57	62.02
18045296	157.62	71.08	161.22	130.63	178.01	165.73
18048269	157.37	108.63	48.56	99.58	123.37	214.86
18054314	157.26	86.75	136.69	106.14	112.43	111.41
18049292	157.19	86.56	152.59	143.37	115.91	129.38
18049170	157.06	108	84.64	99.4	114.25	140.87
18047429	157.02	410.76	381.76	168.89	224.98	174.42
18034418	156.67	89.21	139.44	82.96	88.53	99.97
18033620	156.64	152.73	75.28	129.8	133.78	162.22
18037100	156.57	130.15	162.81	79.58	112.76	105.83
18044839	156.41	96.59	115.43	99.62	107.62	129.87
18047117	156.41	200.41	189.13	162.88	154.33	150.01
18043877	156.39	290.53	243.98	262.88	257.66	223.88
18039977	156.35	215.33	243.72	292.9	277.86	270.67
18051070	156.18	195.99	256.35	318.12	231.81	183.37
18034369	156.17	105.36	120.42	77.42	104.27	115.11
18040318	156.11	156.12	162.25	132.74	139.58	153.61
18047254	156.05	152.48	183.64	142.51	144.75	145.83
18037475	155.9	170.75	112.44	227.14	181.16	170.58
18055586	155.81	105.5	150.07	72.57	107.91	102.79
18055914	155.73	67.77	85.27	95.8	126.66	153.89
18034105	155.4	205.06	177.71	164.83	193.91	225.89
18037391	155.34	348.27	235.47	288.72	216.2	209.67
18033844	155.02	157.15	176.36	168.34	158.61	165.3
18033755	154.95	196.7	229.77	188.39	169.49	148.59
18044194	154.83	144.04	98.39	56.6	79.92	78.21
18035317	154.8	166.8	93.5	110.09	113.61	132.74
18044801	154.69	202.57	198.03	137.36	135.79	125.36
18055131	154.53	104.8	59.73	90.99	96.43	114.28
18043787	154.44	81.87	92.7	63.89	112.74	128.52
18039250	154.31	206.41	174.8	164.71	170.97	176.78
18039850	154.22	238.62	236.43	198.76	169.44	128.19
18053349	153.9	129.36	244.06	141.78	141.32	169.1
18053290	153.82	173.72	264.91	219.87	212.19	194.26
18039137	153.72	145.4	38.01	76.77	94.42	111.23
18051838	153.6	112.15	108.26	68.23	91.47	99.88
18049957	153.4	286.05	254.04	315.3	290.66	288.64
18049931	153.37	116.78	124.23	133.66	139.06	134.38
18039037	153.33	224.74	213.52	266.34	225.55	222.45
18037813	152.97	233.8	301.56	188.58	196.11	181.22
18054382	152.8	118.15	119.93	242.73	154.06	210.3
18039871	152.43	254.14	208.49	239.54	206.09	199.34
18038263	152.23	506.68	269.58	274.86	179.43	129.55
18051892	152.14	165.95	125.32	152.68	135.22	152.51
18032745	152.01	170.88	146.45	116.75	139.46	130.27
18055054	151.72	149.56	102.15	92.89	104.51	99.44
18032390	151.57	214.48	160.78	164.86	151.58	137.19

18042265	151.07	77.04	78.75	97.95	162.68	173.94
18047685	150.9	113.67	95.61	135.15	137.55	159.46
18041044	150.71	155.02	32.19	53.79	86.67	88.22
18049517	150.59	145.05	193.6	212.89	245.28	237.55
18038203	150.49	198.79	164.66	181.7	164.36	156.56
18046574	150.36	66	79.99	84.44	106.49	133.3
18048961	150.27	435.32	405.06	442.26	358.84	284.62
18042487	150.09	118.66	105.48	81.23	97.4	106.25
18048781	149.73	401.82	345.96	308	228.94	174.17
18051549	149.64	103.93	56.65	100.31	106.44	134.03
18050490	149.6	91.18	92.75	134.96	132.7	157.21
18037277	149.55	200.94	311.34	261.81	188.12	173.21
18032131	149.39	120.05	122.98	35	33.46	39.6
18038415	149.27	185.73	140.43	225.72	167.78	213.08
18033741	149.18	299.89	241.37	211.95	192.54	184.22
18048482	148.86	79.53	74.43	94.81	110.28	135.06
18045451	148.77	138.42	410.99	328.73	269.14	250.81
18035181	148.68	160.38	135.2	106.51	103.67	97.08
18044636	148.66	184.58	172.25	95.13	112.56	102.72
18038470	148.64	220.32	200.28	195.41	195.45	182.37
18046083	148.55	148.17	164.4	174.93	169.02	161.86
18045463	148.27	102.65	52.95	120.69	121.05	159.3
18039067	148.15	315.85	267.8	216.12	190.07	183.44
18033078	147.94	183.46	168.73	152.02	146.39	142.06
18043445	147.72	261.03	258.37	233.81	208.73	176.61
18039910	147.57	262.4	221.97	196.01	162.07	159.53
18038758	147.53	257.58	226.94	212.84	169.4	187.9
18041273	147.12	80.93	64.21	164.26	197.87	225.85
18037394	146.89	302.82	332.93	249.39	222.82	166.26
18043626	146.87	250.32	86.58	120.93	123.46	91.66
18038393	146.8	148.41	196.97	154.06	152.82	134.23
18037570	146.64	133.89	147.51	248.62	216.35	246.93
18035741	146.5	134.35	140.89	138.97	127.76	107.76
18036610	146.37	197.15	130.11	105.43	101.16	86.45
18041441	146.3	70.31	71.24	70.91	93.71	108.38
18051954	146.29	134.7	103.33	138.75	159.58	160.56
18052130	145.95	152.21	108.04	132.68	146.76	160.77
18043731	145.84	70.9	117.9	119.51	105.1	115.24
18038947	145.57	209.48	179.55	220.3	207.77	217.58
18054229	145.29	64.03	2.88	10.21	41.35	51.55
18041166	145.05	164.53	115.18	95.26	113.35	118.7
18042494	144.97	116.53	128.06	129.21	137.46	137.5
18046567	144.93	223.73	209.25	189.88	181.67	171.12
18044324	144.68	82.16	91.67	109.86	117.37	122.65
18052057	144.65	141.53	158.43	117.83	113.71	112.77
18045249	144.63	227.43	196.47	139.63	146.66	119.61
18048822	144.55	153.53	157.1	245.58	200	172.44
18035146	144.48	84.44	61.66	65.11	79.08	100.32
18032723	143.88	138.2	266.08	274.14	274.49	186.28
18035850	143.61	63.13	95.84	83.68	98.3	125.6
18038257	143.17	122.65	84.51	90.88	106.26	123.03
18044947	142.9	92.9	103.92	156.77	143.21	162.07
18032917	142.67	226.85	178.62	261.71	199.96	202.19

18055754	141.67	121.51	149.23	109.31	115.3	126.28
18054066	141.14	249.26	259.74	274.11	212.16	203.25
18052106	141.07	118.13	115.88	110.34	113.92	123.43
18050597	140.68	134.75	153.27	181.11	171.13	177.57
18047109	140.49	138.47	126.7	86.88	98.24	93.61
18050099	140.37	203.2	136.43	197.69	183.5	198.21
18037536	140	117.15	138.18	102.87	105.18	91.51
18040831	139.73	80.99	89.11	120.64	122.69	140.98
18033551	138.98	139.4	148.59	139.06	144.72	128.49
18033964	138.82	157.44	229.52	202.94	197.07	177.8
18048572	138.71	120.1	190.98	160.86	159.69	172.62
18053263	138.04	179.29	270.54	513.9	549.85	263.24
18033927	137.93	35.27	83.63	62.51	75.93	86.02
18041313	137.73	130.68	109.69	130.71	108.16	90.15
18053565	137.69	204.12	303.55	205.32	193.61	176.91
18039816	137.68	223.22	200.71	180.08	175.45	139.39
18048347	137.38	309.96	260.64	261.71	231.05	193.58
18046184	137.3	86.7	109.54	98.55	108.38	106.68
18045661	137.24	179.21	101.28	74.46	61.08	62.86
18032817	137.1	151.55	197.68	122.14	104.33	89.26
18034865	137.02	190.61	210.54	229.29	188.35	182.28
18048560	136.43	107.98	123.72	132.76	134.81	143.93
18042468	136.39	151.49	40.78	76.3	96.83	108.36
18037760	136.17	189.9	170.74	155.73	134.66	137.01
18043779	136.13	252.58	233.85	237.06	186.63	160.28
18052725	135.96	145.8	64.25	105.84	83.48	92.28
18052745	135.86	217.24	166.3	156.22	135.39	107.52
18031420	135.77	127.13	69.39	44.66	86.98	101.48
18033779	135.53	268.17	273.16	324.14	225.89	217.33
18044172	135.52	155.04	147.8	168.68	153.02	136.56
18054960	135.47	63.26	81.81	72.71	82.86	101.21
18054810	135.46	158.47	39.06	85.21	91.87	128.08
18033836	135.27	177.76	324.6	241.49	153.73	119.55
18052160	135.26	114.79	88.13	139.57	186.24	198.62
18038765	134.96	109.43	113.79	123.77	130.61	140.74
18048390	134.95	128.01	145.6	161.01	160.04	163.25
18043450	134.93	166.71	218.57	289.59	216.39	217.01
18051635	134.92	108.75	107.16	88.33	88.76	90.24
18046435	134.71	133.72	155.64	173.9	185.44	172.35
18049852	134.44	398.54	228.13	140.68	190.99	147.09
18034944	134.24	105.24	67.62	82.18	93.87	107.1
18041268	134.2	125.86	94.75	124.36	133.03	137.2
18045311	133.87	120.42	56.69	66.56	98.47	112.5
18042958	133.7	245.96	284.93	224.98	193.41	142.17
18035365	133.5	90.5	74.3	83.31	98.42	93.4
18041475	133.31	170.72	64.2	131.56	136.17	121.46
18051998	133.23	206	162.23	209.43	190.29	194.69
18035052	132.98	91.13	52.49	124.73	113.22	133.11
18053903	132.56	171.45	175.33	156.5	143.71	128.21
18037058	132.44	141.86	143.38	157.82	154.24	122.47
18032306	132.18	194.7	104.53	98.11	117.47	97.45
18046631	132.17	166.85	125.8	148.18	160.97	156.24
18042879	132.1	219.87	175.53	162.37	144.92	136.6

18052598	132.06	199.36	109.64	154.23	161.95	168.92
18055156	132.04	20	53.44	32.39	37.99	49.2
18044290	131.94	33.64	57.91	45.64	56.57	67.67
18053228	131.93	179.39	147.63	182.88	166.72	158.76
18045632	131.91	199.04	155.04	181.41	139.79	152.93
18043590	131.86	116.09	48.39	88.54	107.15	136.71
18045202	131.62	133.44	71.14	114.57	133.16	165.18
18035669	131.6	120.36	75.21	168.87	152.86	202.68
18048984	131.44	120.41	146.42	122.38	127.35	123.37
18039190	131.11	285.62	231.63	260.26	219.4	186.65
18036956	131.1	148.07	108.91	113.15	138.4	170.15
18054679	131.06	202.55	199.08	220.43	186.46	165.84
18038562	130.92	153.05	161.52	154.06	151.14	141.85
18044967	130.74	135.59	52.35	109.57	102.17	111.01
18048047	130.44	133.68	169.27	199.57	190.17	226.19
18054673	130.25	92.38	122.07	102.14	114.32	114.28
18047107	130.01	86.06	68.8	94.43	152.25	164.57
18043060	129.06	156.5	107.07	175.25	176.9	170.89
18051559	128.73	257.92	205.99	226.05	183.01	165.83
18049773	128.68	211.01	193.51	186.07	165.51	149.59
18039035	128.65	165.36	167.99	163.21	158.05	152.71
18047697	128.56	103.21	120.52	116.7	111.21	139.38
18032740	128.39	272.19	147.29	125.95	100.19	86.55
18039431	128.39	175.35	191.15	164.14	144.53	129.71
18055435	128.29	223.96	189.54	223.76	212.7	173.49
18046297	128.21	176.7	154.05	126.01	145.27	120.66
18050261	128.13	172.82	278.76	168.24	162.13	155.38
18034047	127.94	100.09	91.52	181.98	167.62	204.16
18054995	127.93	206.32	216.54	236.66	194.93	181.15
18035018	127.81	319.15	347.36	700.56	574.53	373.9
18042840	127.78	96.82	112.48	99.01	102.98	93.44
18034666	127.63	140.65	124.05	146.43	145.01	128.05
18047485	127.58	186.35	211.77	101.46	114.4	119.22
18056146	127.55	131.4	163.71	153.52	139.91	131.31
18044014	127.41	204.95	178.1	230.65	221.87	209.05
18034322	127.1	190.01	95.51	83.3	83.76	95.52
18047950	127.07	138.04	235.02	141	135.51	110.3
18053830	126.97	85.64	70.08	86.71	100.29	107.93
18055378	126.84	207.47	138.55	165.18	173.78	149.03
18037730	126.59	299.41	275.85	215.01	195.47	150.49
18051707	126.58	44.9	66.35	61.79	76.11	86.35
18044487	126.52	232.96	282.18	206.19	169.33	157.67
18033113	126.08	46.99	63.38	50.33	68.2	91.88
18037230	126.08	167.07	150.17	120.66	134.77	145.91
18053348	125.99	102.07	213.36	147.59	147.71	165.38
18040559	125.89	83.27	120.52	80.9	95.62	99.77
18043344	125.82	91.48	89.83	103.24	102.67	104.99
18040699	125.81	209.26	129.74	181.1	195.6	198.94
18049070	125.62	212.28	206.16	231.42	194.97	180.25
18041382	125.51	214.32	226.1	258.18	189.35	171.38
18037101	125.35	90.74	89.71	111.57	114.89	134.57
18043451	125.31	119.5	128.29	134.14	131.58	127.68
18042620	125.27	137.47	125.14	178.66	173.33	169.9

18032321	125.21	94.75	54.24	84.71	110.72	129.48
18040513	124.97	204.16	67.21	121.57	96.47	102.34
18036308	124.83	155.73	289.08	137.64	100.46	76.79
18038225	123.93	154.94	152.71	114.35	132.11	118.96
18033801	123.66	292.58	240.1	225.96	177.91	161.63
18039056	123.25	450.66	312.05	277.16	188.51	135.89
18049826	123.13	74.47	104.18	118.05	105.22	83.27
18051570	123.05	89.84	81.23	162.1	142.18	166.5
18049026	122.86	233.96	524.91	462.21	270.32	224.48
18034349	122.67	193.54	157.95	135.84	134.26	115.57
18055572	122.54	90.48	109.23	83.92	88.83	107.21
18040450	122.3	186.33	181.3	222.37	174.56	177.23
18056014	122.13	182.36	153.93	133.35	124.65	109.54
18050768	122.1	127.89	82.02	24.14	37.89	34.7
18034494	122.03	190.03	47.89	99.65	378.07	251.97
18037392	121.89	265.24	155.45	166.97	112.61	88.33
18036494	121.83	255.84	257.9	250.41	189.15	161.64
18032891	121.8	44.1	108.65	76.77	83.81	91.18
18037260	121.59	179.73	119.29	143.77	144.48	143.52
18050318	121.55	184.32	87.19	116.84	117.31	118.73
18036629	121.49	55.16	55.97	65.82	88.49	86.92
18037144	121.09	53.33	49.88	73.71	82.84	103.35
18049841	120.97	112.09	47.02	69.79	67.33	88.68
18047910	120.78	84.74	70.77	73.68	88.34	97.43
18055601	120.77	243.29	209.6	197.32	169.59	167.71
18038314	120.75	53.79	83.82	77.27	81.98	78.52
18053926	120.69	167.45	63.4	120.52	119.33	139.31
18047776	120.69	116	57.2	78.23	92.38	117.62
18049939	120.63	123.53	139.31	103.9	102.27	125.34
18039968	120.4	171.86	128.15	103.69	136.76	100.95
18034021	120.38	102.73	113.26	102.45	102.28	99.93
18036120	120.21	195.03	161.67	192.58	177.36	166.76
18045777	119.94	118.34	86.35	136.56	153.93	125.79
18044079	119.8	161.39	178.47	166.86	173.2	148.87
18039078	119.64	138.36	106.65	51.77	80.76	78.03
18054490	119.62	132.11	128.65	149.8	147.38	141.01
18051387	119.43	272.32	231.21	196.37	187.79	135.79
18032416	119.37	83.95	105.31	78.89	86.59	83.46
18049928	119.21	292.7	227.76	186.04	175.77	143.49
18053655	119.17	102.36	113.84	94.84	100.21	99.51
18043770	119.04	325.69	335.28	276.48	209.95	199.38
18049159	118.9	89.14	98.9	95.97	108.89	106.68
18039893	118.71	60.44	87.97	56.38	67.21	63.02
18043053	118.54	177.91	187.98	171.16	147.49	141.23
18032701	118.52	291.97	233.53	255.19	205.83	173.65
18052479	118.37	134.23	111.74	89.09	101.4	85.33
18055420	118.29	202.44	215.22	29.7	49.74	30.92
18044368	118.18	128.68	187.71	154.64	169.57	160.86
18035343	118.08	193.69	94.33	117.43	127.11	118.97
18039907	117.91	135.41	106.61	88.07	105.49	105.74
18053436	117.77	110.16	56.78	77.75	87.94	98.74
18039848	117.76	70.21	109.55	86.31	90.56	92.88
18032383	117.74	18.45	51.54	34.22	43.22	57.19

18055136	117.57	73.79	103.28	107.19	113.44	120.15
18056163	117.55	184.08	103.96	148.68	150.07	172.47
18032152	117.54	243.42	197.36	241.63	188.85	186.86
18039073	117.49	403.34	502.55	417.5	230.62	171.98
18038461	117.29	81.6	105.46	87.58	93.66	102.45
18053686	117.22	107.99	120.68	97.88	95.29	91.24
18033924	117.07	173.11	203.09	188.49	163.99	149
18048503	116.9	73.54	119.79	84.1	94.01	104.92
18033399	116.76	168.22	132.48	167.51	163.57	176.43
18051413	116.58	267.87	215.53	214.26	183.12	172.32
18048988	116.55	223.49	341.58	186.43	197.69	148.68
18051365	116.47	129.35	174.97	164.9	152.47	153.06
18055141	116.35	94.9	114.6	113.81	133.3	138.86
18032116	116.35	223.16	189.82	189.57	161.28	160.92
18054335	116.3	107.56	92.39	102.21	95.88	95.1
18049678	116.27	135.96	80.25	101.3	106.21	127.98
18038409	116.17	96.34	84.34	138.85	163.52	176.44
18039305	116.1	217.67	201.91	204.32	194.09	157.56
18056081	116.09	89.69	99.81	59.48	69.05	72.53
18052304	116.06	60.23	77.05	104.42	98.01	100.85
18038326	116.01	59.73	62.67	73.41	75.99	77.55
18035713	115.89	159.18	65.94	49.03	48.89	54.19
18036053	115.81	248.66	205.3	202.51	177.31	147.2
18034357	115.76	133.11	77.85	94.02	92.43	94.61
18047247	115.71	43.35	36.07	50.18	100.14	101.13
18053365	115.67	177.04	129.92	187.34	139.71	136.28
18033935	115.65	210.72	152.55	178.94	146.18	153.59
18037272	115.58	267.68	203.53	277.46	213.97	189.57
18042031	115.35	164.36	182.12	204.92	166.88	165.95
18044096	115.09	236.9	221.03	209.78	178.35	173.4
18041187	115.08	317.1	295.65	263	205.58	171.19
18040310	115	69.35	24.44	59.72	77.03	101.18
18034409	114.88	219.15	199.01	238.34	167.38	211.76
18044332	114.8	106.77	91.97	122.71	118.93	109
18050414	114.73	110.15	63.01	91.35	76.33	85.95
18039274	114.53	130.3	194.44	141.37	124.92	121.34
18038543	114.43	133.25	101.6	58.91	72.41	65.67
18038986	114.4	107.37	85.66	190.39	181.42	178.19
18031419	114.3	94.83	51.07	109.79	122.61	154
18053659	114.19	142.95	138.53	219.48	174.76	198.23
18040260	114.04	93.25	93.87	108.07	117.58	140.34
18051445	114.04	82.57	88.09	76.31	95.01	111.36
18041685	114	183.19	166.28	171.11	118.6	113.89
18052549	113.82	59.24	61.79	96.21	88.55	101.79
18039232	113.2	198.4	155.77	255.26	233.48	223.11
18043846	113.15	37.82	56.99	63.77	66.11	83.54
18032558	113.04	164.58	44.15	56.3	79.49	56.93
18040485	112.87	210.69	174.19	215.19	187.89	154.54
18053805	112.57	114.46	114.43	128.95	119.58	112.1
18034024	112.51	101.26	58.88	106.88	121.12	145.87
18040789	112.03	149.99	153.4	105.67	110.11	89.83
18033936	111.89	80.14	109.31	104.1	106.18	106.29
18041740	111.81	204.37	202.86	206.12	172.53	166.28

18045003	111.73	121.32	146.59	104.95	94.2	87.81
18050333	111.71	56.21	23.51	24.58	38.26	47.77
18037901	111.69	205.52	141.86	170.36	144.95	142.54
18053891	111.56	67.81	81.58	100.09	96.2	101.15
18050998	111.55	277.37	386.77	279.77	218.3	159.83
18055335	111.4	62.77	85.95	58.32	62.83	69.84
18048123	111.38	59.36	90.73	97.47	89.63	101.91
18050518	111.29	100.35	100.78	155.5	139.66	153.02
18044717	111.19	255.81	190.45	194.49	171.07	138.33
18034725	111.07	83.64	87.07	117.54	133.23	152.28
18037928	111.03	96.22	100.4	150.58	128.39	148.29
18044208	110.9	97.75	76.48	85.4	89.56	108.24
18042464	110.65	275.42	226.81	156.84	152.48	113.67
18047056	110.62	262.7	165.66	164.89	145.4	135.17
18054278	110.39	125.99	48.65	114.7	105.64	131.77
18049339	110.31	78.77	83.11	89.32	105.4	107.9
18053140	110.31	118.76	24.19	48.38	61.27	67.92
18036864	110.05	125.79	132.62	109.98	115.29	114.36
18034913	110.05	229.48	202.47	227.14	172.56	157.44
18042773	110.03	83.65	140.73	136.51	134.77	122.08
18047636	110.01	213	201.84	140.2	134.83	116.75
18045562	109.92	91.18	62.73	63.11	71.55	73.25
18039375	109.9	221.55	196.93	181.34	167.57	135.28
18051614	109.84	76.03	62.43	130.87	127.85	160.97
18035753	109.74	112.38	99.94	146.5	151.39	151.84
18033006	109.67	56.35	46.97	16.41	31.59	30.15
18045793	109.42	175.98	121.78	112.8	103.84	93.28
18054531	109.39	126.24	46.48	149.72	87.3	98.51
18045653	109.27	183.51	152.52	154.67	135.83	121.85
18055821	109.14	42.37	81.13	34.44	49.71	57.15
18039553	108.94	86.18	71.81	101.62	102.32	121.63
18033668	108.86	231.93	225.16	215.95	161.64	162.54
18034154	108.74	151.38	122.67	114.36	103.58	110.64
18048190	108.72	128.85	121.09	114.65	109.74	104.42
18032579	108.59	75.06	98.57	105.76	110.1	114.63
18043834	108.58	153.47	135.79	98.73	108.78	91.05
18043943	108.49	175.57	80.32	121.34	107.77	99.04
18042599	108.47	88.92	61.36	79.62	81.87	88.92
18032114	108.28	110.51	103.52	95.08	109.48	116.49
18053802	108.25	394.16	358.71	284.15	196.17	164.18
18037438	108.12	101.76	96.69	159.15	152.07	161.56
18054001	107.99	94.41	81.31	78.91	99.92	104.7
18044249	107.9	66.45	67.57	65.64	75.83	80.04
18052895	107.87	175	119.57	121.67	101.88	95.47
18031926	107.78	156.96	137.51	114.16	122.93	109.64
18047517	107.75	118.39	139.86	117.67	114.93	103.69
18035711	107.72	70.73	94.44	106.18	112.96	132.5
18031249	107.6	96.96	91.93	161.43	132.61	151.81
18048618	107.59	132.12	126.82	133.13	129.44	128.86
18033235	107.46	240.28	232.3	245.98	178.04	167.38
18054786	107.22	68.81	127.97	88.87	103.78	102.56
18052780	107.17	67.36	65.29	70.52	72.38	77.42
18032925	107.01	118.92	117.29	72.47	67.18	75.57

18038198	106.82	84.04	106.8	112.45	118.95	134.67
18050738	106.79	73.27	76.69	80.02	89.87	89.73
18043550	106.75	152.66	63.52	279.55	164.78	206.78
18035136	106.69	158.24	150.8	163.87	146.05	132.38
18042453	106.67	117.09	81.66	129.34	131.34	134.1
18056007	106.57	108.47	106	102.43	108.62	112.42
18038341	106.54	31.37	53.64	53.19	47.56	60.63
18039962	106.31	118.69	94.85	153.84	139.82	151.56
18035991	106.21	103.62	86.03	100.58	110	106.42
18032789	106.2	210.14	180.35	150.85	137.09	109.34
18035183	106.19	172.61	140.87	160.31	150	142.04
18038307	105.98	86.6	106.07	122.66	113.74	107.42
18054427	105.55	92.73	82.7	102.66	115.27	110.56
18033680	105.42	45.7	102.1	100.28	109.44	87.36
18035169	105.4	118.13	66.57	69.01	68	62.12
18035082	105.32	78.88	104.92	78.35	88.7	90.06
18042854	105.22	88.82	123.89	80.64	85.42	81.32
18052819	105.22	189.15	124.46	121.09	121.14	122.11
18048596	105.12	91.91	80.27	128.68	119.37	120.68
18034694	105.01	68.21	33.68	33.81	59.93	71.58
18045920	104.92	207.64	126.13	107.7	116.76	94.97
18038402	104.83	76.31	48.07	34.72	70.11	64.6
18031724	104.78	49	43.14	60.48	68.45	78.78
18037982	104.65	64.28	38.63	70.26	104.21	103.02
18049772	104.56	152.46	115.99	142.77	129.78	118.36
18054686	104.56	130.75	0.41	0.26	0.32	1.38
18036874	104.5	50.07	84.26	68.42	76.07	84.4
18050386	104.28	91.97	69.94	85.4	88.3	104.38
18042373	104.12	169.06	170.55	156	133.51	132.15
18046801	103.96	158.93	182.45	96.69	102.69	105.84
18047471	103.95	117.6	139.51	74.53	84.09	75.98
18052331	103.94	263.97	201	221.04	176.25	151.56
18032147	103.82	166.77	146.65	199.27	163.73	171.63
18051774	103.6	101.15	136.79	134.27	133.56	123.3
18036454	103.33	198.74	200.33	160.77	145.85	120.77
18043839	103.25	74.57	66.42	74.62	86.62	114.19
18054622	103.15	149.27	63.79	62.81	91.75	104.11
18044352	102.96	42.22	22.55	30.91	43.59	51.03
18036532	102.91	46.69	79.93	65.69	64.41	66.55
18054294	102.71	163.51	176.74	130.47	119.05	97.22
18040108	102.68	170.59	62.54	57.78	67.87	86.39
18039524	102.56	211.13	153.72	142.64	127.57	116.57
18047693	102.48	79	96.87	64.59	78.45	67.39
18053429	102.3	93.93	96.56	83.4	91.7	89.58
18052521	102.27	130.59	112.82	144.29	136.02	132.56
18040526	102.02	69.13	74.53	67.92	86.54	85.8
18051127	101.94	181.67	201.4	197.5	163.1	147.01
18047344	101.89	112.45	161.82	110.52	107.32	94.97
18047435	101.88	166.6	145.83	161.84	124.33	126.26
18053008	101.78	29.11	45.58	44.98	58.15	74.9
18034498	101.76	98.78	135.52	76.74	83.14	105.29
18045448	101.61	106.94	73.34	139.68	107.97	113.61
18050096	101.49	175.41	107.22	163.2	116.55	124.34

18040477	101.34	93.29	107.35	112.51	118.95	107.59
18038283	101.24	231.96	211.39	254.41	195	153.31
18046056	101.24	99.61	110.86	86.56	89.8	86.67
18049539	101.19	147.79	157.07	190.66	170.7	165.47
18050995	101.04	106.23	195.71	165.73	160.41	152.84
18043628	100.87	49.2	67.02	38.26	39.96	41.02
18052474	100.79	91.02	63.37	62.57	77.1	81.9
18051626	100.59	86.99	60.92	94.9	96.29	107.67
18049023	100.52	165.08	67.6	63.12	61.79	57.41
18040117	100.24	197.39	135.46	92.53	105.49	110.7
18037682	100.03	175.37	156.41	167.83	148.41	130.61
18044411	99.92	44.69	61.25	20.76	30.57	33.45
18031775	99.86	99.04	120.33	121.11	113.18	113.59
18039066	99.82	287.19	287.6	251.64	217.65	161.57
18049183	99.76	115.61	98.71	77.79	106.93	104.23
18034000	99.62	37.38	55.95	36.62	44.84	53.71
18033440	99.55	127.28	177.07	97.8	81.39	71.98
18044146	99.46	195.78	194.61	202.94	176.63	156.33
18043959	99.39	53.3	76.62	49.25	58.52	56.17
18035107	99.35	106.33	59.4	125.58	119.67	130.04
18038264	99.3	34.72	43.15	38.59	42.64	60.62
18049351	99.25	57.79	85.65	61.93	71.25	72.54
18041653	99.18	74.56	93.77	65.5	63.25	68.53
18036346	99.02	67.11	34.45	28.43	47.01	61.57
18039774	98.94	107.32	149.86	117.37	113.08	108.74
18031941	98.86	83.65	128.08	75.97	94.56	83.15
18039827	98.83	194.98	182.74	169.46	148.97	122.65
18031335	98.71	171.21	113.39	189.32	165.47	152.45
18038116	98.67	101.53	79.43	102.21	105.55	102.49
18050293	98.66	70.01	110.08	108.74	114.16	122.21
18032504	98.63	60.56	56.83	58.68	60.6	61.38
18053375	98.5	103.91	105.64	227.21	169.72	114.95
18052224	98.46	101.89	98.53	102.37	112.03	101.25
18039141	98.05	63.28	84.44	102.71	97.11	103.76
18031578	98.05	84.42	97.72	167.25	151.86	176.35
18051153	97.96	108.56	101.4	111.8	109.81	109.98
18046471	97.87	55.88	72.45	102.74	108.9	117.21
18038085	97.67	65.89	14.08	37.32	47.86	51.06
18043042	97.56	90.58	66.81	55.67	77.32	83.57
18038374	97.5	118.44	78.4	101.9	99.08	88.32
18042004	97.34	137.37	155.86	105.01	100.46	76.76
18034274	97.31	76.97	50.93	73.6	54.93	65.04
18037404	97.22	80.93	60.44	61.12	66.89	71.92
18035439	97.15	79.92	87.12	83.91	80.26	97.22
18051126	97.01	202.02	139.51	181.69	151.04	149.82
18039116	96.96	98.68	9.15	8.33	8.25	8.32
18051835	96.72	152.71	38.58	52.04	130.28	132.11
18039766	96.7	84.59	91.75	108.62	95.74	104.26
18055132	96.64	88.3	114.87	108.48	124.27	119.15
18052529	96.63	264.01	214.06	150.94	120.26	90.05
18035389	96.62	94.4	160.83	146.76	115	98.55
18042003	96.53	113.76	87.3	163.99	128	199.66
18038064	96.4	107.94	114.18	100.69	85.26	77.42

18041178	96.36	175.88	213.18	74.14	112.17	104.7
18050771	96.32	93.68	15.01	7.74	16.98	16.47
18055625	96.27	62.13	55.11	54.34	80.25	88.49
18046308	96.19	31.63	34.2	42.73	61.66	85.64
18045163	96.15	193.53	147.2	165.31	132.05	119.8
18040283	96.1	176.33	186.37	145.18	124.43	106.85
18043471	96.09	62.07	67.65	76.2	90.78	97.45
18035338	96.05	164.04	137.88	145.16	165.62	148.95
18035059	96.04	184.87	143.6	138.71	120.09	106.71
18038291	95.98	164.11	151.76	175.11	152.74	148.27
18043349	95.94	53.94	42.26	47.53	64.29	69.79
18046695	95.92	115.49	83.93	102.91	95.19	116.65
18052153	95.88	65.23	71.43	81.28	85.19	97.02
18043632	95.65	87.03	99.72	75.15	81	79.4
18033429	95.61	178.41	132.27	153.92	134.33	129.32
18038851	95.5	74.07	69.79	42.12	52.76	63.05
18036545	95.49	119.06	111.85	72.41	101	87.5
18034308	95.49	125.05	9.48	64.89	89.44	167.98
18049037	95.47	112.19	110.72	118.58	111.7	111.49
18035583	95.45	118.78	67.75	91.79	82.2	96.35
18041274	95.42	78.71	72.89	82.19	83.57	83.9
18052690	95.32	137.56	101.4	126.94	121.07	135.01
18052669	95.25	90	73.85	58.2	65.64	65.62
18034652	95.21	86.06	56.25	65.91	78.18	90.62
18035704	95.1	59.14	86.26	76.29	72.37	77.74
18039706	94.94	79.03	79.99	98.81	92.52	97.13
18046934	94.89	91.14	95.17	140.2	119.16	143.13
18043775	94.88	61.38	88.55	102.81	102.89	110.29
18039643	94.79	68.86	99.26	87.88	93.64	89.64
18040206	94.77	132.42	141.28	128.35	126.33	118.03
18054246	94.77	239.89	191.9	134.41	112.64	104.5
18047132	94.6	132	105.93	196.64	152.58	176.87
18036946	94.55	49.02	48.82	42.13	64.97	82.3
18040363	94.45	105.4	165.9	53.93	59.68	47.93
18055639	94.43	231.96	272.28	225.71	193.62	154.8
18036639	94.31	196.92	190.2	200.08	159.36	150.9
18046321	94.11	111.51	13.9	228.4	162.32	174.66
18041285	94.1	111.28	87.09	86.18	82.51	90.08
18053979	94.02	48.13	47.3	72.69	64.6	97.41
18032532	93.93	112.84	73.08	114.23	88.34	101.26
18044666	93.62	91.03	58.58	72.63	75.7	74.65
18055004	93.43	259.93	64.34	126.32	199.44	91.55
18038417	93.42	134.99	110.96	102.89	89.12	80.32
18036808	93.42	109	107.42	125.17	117.3	129.39
18052670	93.26	118.58	130.55	135.06	126.87	116.18
18053611	93.24	152.04	101.86	100.71	83.79	70.49
18050892	93.12	40.51	5.22	7.57	15.16	19.76
18039138	93.04	50.63	81.86	75.42	83.14	95.96
18040694	92.96	67.68	34.11	84.47	92.74	110.5
18048110	92.91	193.71	214.1	213.03	192.16	170
18047216	92.91	279.93	278.45	164.35	148.24	125.61
18047316	92.9	86.2	89.15	117.34	118.14	144.98
18051000	92.64	89.6	131.93	74.09	82.65	98.66

18035868	92.62	80.69	59.8	77.93	92.21	91.32
18043326	92.59	95.79	88.45	59.72	65.14	55.32
18039790	92.38	154.33	153	182.11	149.59	142.93
18054574	92.3	115.2	70.62	113.51	96.89	108.17
18039382	92.29	45.27	26.25	27.9	55.08	65.68
18041058	92.25	116.99	177.41	154.75	126.41	116.89
18050608	91.89	114.5	64.01	45.94	63.02	56.59
18039142	91.88	30.56	47.12	44.28	51.32	54.99
18046804	91.87	72.35	70.26	88.27	83.75	98.87
18033913	91.87	54.6	104.43	89.69	87.14	91.53
18044651	91.8	41.99	42.84	72.8	72.37	85.72
18040625	91.79	138.02	47.95	96.4	93.75	79.42
18054836	91.74	129.08	141.69	146.98	134.45	124.99
18046846	91.61	267.31	267.91	157.42	99.39	72.71
18035102	91.52	147.37	162.62	159.02	153.61	116.99
18043898	91.49	87.63	64.18	58.37	53.36	57.04
18052287	91.38	89.32	60.96	73.55	88.53	83.18
18048612	91.32	40.89	58.41	58.55	63.59	71.02
18044386	91.31	59.68	83.71	80.9	91.18	91
18042287	91.26	107.75	107.19	110.94	107.32	106.04
18047732	91.25	89.64	83.01	86.89	78.48	76.56
18034481	91.17	51.56	96.82	59.2	71.23	72.85
18036334	91.11	58.14	67.5	88.93	98.77	103.14
18052999	90.94	268.27	259.99	246.97	192.07	153.39
18042243	90.85	76.27	62.5	117.47	97.33	131.67
18055402	90.81	69.1	75.53	96.36	103.61	132.47
18045111	90.8	113.42	93.44	139	152.47	136.47
18047332	90.74	97.36	89.08	94.85	85.31	84.53
18053539	90.67	110.86	129.5	122.86	115.16	107.58
18053393	90.64	149.12	60.65	21.17	30.42	25.61
18043272	90.62	53.85	79.27	48.86	52.84	50.48
18047338	90.41	109.74	107.26	129.38	141.97	132.48
18050029	90.33	149.39	140.9	134.93	129.61	123.8
18047526	90.31	159.14	222.26	244.18	213.83	170.52
18035179	90.3	152.67	110.5	132.36	110.5	101.61
18049263	90.29	31.28	55.92	32.91	42.88	46.6
18054109	90.27	63.75	84.48	79.66	80.03	85.14
18055611	90.22	197.24	240.79	174.22	135.87	98.67
18046211	90.05	134.21	92.02	86.4	80.12	77.63
18052941	90.04	146.3	177.28	137.5	96.13	51.87
18052751	89.97	78.2	68.18	97.8	88.67	89.73
18037322	89.94	55.19	57.72	56.02	58.76	78.9
18038750	89.92	41.44	67.2	73.37	72.59	82.73
18047048	89.92	111.76	95.53	92.63	80.99	85.16
18055315	89.91	90.62	61.3	89.98	83.51	91.29
18044617	89.85	115.48	126.1	140.09	115.47	107.77
18053986	89.84	41.97	52.91	61.78	62.25	89.56
18038315	89.74	31.76	64.19	29.86	35.96	40.61
18031627	89.71	53.49	63.39	55.98	62.56	70.33
18036657	89.48	17.11	34.23	26.91	35.73	44.3
18036204	89.36	61.17	27.35	29.79	46.36	67.01
18044128	89.34	97.35	93.35	97.62	80.88	95.58
18039036	89.21	338.87	266.58	212.78	144.38	126.65

18033117	89.18	173.64	152.19	146.05	122.14	111.63
18049206	89.05	84.72	91.87	92.37	88.57	100.57
18046667	89.04	90.69	119.87	130.46	119.51	127.15
18033832	89.02	175.81	154.28	154.52	104.68	90.43
18043592	89.01	113.81	99.38	99.66	88.85	75.69
18044595	88.96	57.54	113.43	62.41	71.69	72.89
18043962	88.77	162.13	146.69	191.15	150.48	149.88
18036428	88.74	93.67	144.92	98.36	91.78	88.67
18039461	88.67	140.2	115.41	120.37	106.19	104.97
18050625	88.65	115.82	135.11	68.67	91.05	88.65
18050952	88.59	84.4	75.81	80.84	59	54.52
18042662	88.55	94.29	110.69	170.67	146.03	146.9
18054244	88.54	189.32	138.71	113.35	95.81	100.24
18040077	88.49	75.25	61.96	77.57	94.53	93.61
18043909	88.48	67.28	53.56	49.6	62.01	70.21
18054088	88.47	114.59	90.2	84.33	76.61	67.21
18051400	88.46	134.87	124.18	85.82	95.57	71.82
18037190	88.23	102.85	106.66	125.93	113.42	98.7
18050193	88.21	23.53	37.19	37.88	43.58	50.5
18050455	88.21	95.32	144.22	156.15	145.91	149.85
18047087	88.1	132.91	103.44	112.42	107.84	110.81
18036307	87.95	117.28	108.92	113.02	108.32	98.27
18035884	87.91	55.86	78.68	73.18	69.22	78.25
18041955	87.86	47.51	70.88	49.76	113.38	94.01
18032090	87.81	111.38	82.29	100.53	106.64	107.25
18049904	87.77	57.75	66.22	62.49	63.36	75.71
18045634	87.76	112.01	130.62	85.68	90.88	87.65
18052531	87.74	27.17	43.45	42.22	50.55	65.66
18044252	87.73	246.17	142.73	133.66	90.67	87.87
18033245	87.6	35.89	24.97	49	63.42	71.91
18031483	87.6	42.18	51.83	51.14	58.98	68.49
18039238	87.59	89.85	94.94	85.78	88.1	96.51
18053863	87.56	85.36	55.4	66.15	80.27	84.48
18037571	87.52	154.59	77.11	88.56	100.41	72.54
18033238	87.5	130.5	114.78	109.06	107.8	94.89
18044660	87.28	28.02	17.68	29.49	81.22	80.89
18036693	87.27	67.28	45.81	83.89	93.81	106.71
18056026	87.25	85.95	142.98	114.15	100.1	97.22
18037937	87.23	29.22	37.43	72.05	97.62	100.17
18043186	87.09	74.76	56.64	67.39	72.48	78.34
18032980	87.01	43.22	63.31	43.48	47.74	56.39
18042300	87	49.53	58.08	58.11	70.53	81.26
18035399	86.88	153.16	236.45	174.25	137.73	107.45
18043724	86.84	50.55	28.35	23.57	60.91	64.82
18044471	86.82	176.27	163.78	186.1	137.12	124.52
18048576	86.82	90.93	102.26	116.62	116.66	105.66
18034880	86.79	87.73	71.51	78.27	91.94	63.46
18039344	86.74	48.76	53.33	96.44	79.35	101.58
18038587	86.68	291.13	272.55	269.29	202.26	170.03
18050708	86.5	153.16	152.11	187.51	165.2	131.49
18043739	86.49	36.44	48.82	48.59	48.4	57.51
18050746	86.45	71.87	39.02	48.84	63.54	61.13
18045970	86.38	111.45	101.87	116.89	96.28	102

18051679	86.33	111.06	110.38	83.7	93.24	76.91
18037631	86.33	123.66	97.91	69.11	69.05	65.97
18034723	86.27	185.37	177.3	150.06	127.1	100.44
18055647	86.06	70.86	78.66	92.79	89.9	91.73
18043141	86.04	98.27	165.5	93.44	93.57	90.42
18048649	85.88	66.43	78.97	106.58	102.9	105.72
18040830	85.83	176.87	157.63	173.66	156.66	87.52
18037620	85.74	11.47	29.54	20.29	27.59	33.67
18036800	85.73	91.27	76.76	86.58	72.54	78.34
18045211	85.64	154.16	126.87	147.59	129.58	116.15
18048235	85.63	89.5	58.63	89.41	88	81.3
18038885	85.6	93.5	113.57	154.37	146.51	151.61
18040065	85.55	78.84	44.55	43.35	43.4	46.39
18053948	85.45	70.77	119.94	88.91	88.15	76.02
18051575	85.41	24.17	37.28	80.13	71.06	90.92
18042915	85.36	56.43	70.56	42.27	51.93	48.48
18035633	85.35	139.78	87.99	88.03	83.57	75.72
18051936	85.28	118.06	101.36	129.04	105.77	103.86
18050464	85.27	60.29	82.13	120.48	104.23	107.57
18041580	85.24	61.36	76.39	64.61	67.03	64.8
18034516	85.21	123.37	108.33	105.05	98.96	90.42
18034906	85.08	115.64	203.5	139.42	99.62	77.25
18041221	85.06	69.24	69.67	80.57	77.26	72.71
18036568	85.05	110.18	45.37	8.96	20.78	16.55
18052787	85.01	161.14	208.93	156.24	154.13	117.47
18047134	85	130.63	87.35	90.78	95.96	86.88
18046299	84.99	125.91	99.48	76.92	80.45	81.9
18036576	84.94	217.1	213.6	230.13	159.4	143.69
18055660	84.92	164.42	157.7	176.56	132.3	124.23
18044851	84.65	143.65	133.75	102.51	96.47	72.8
18040536	84.65	52.57	82.86	119.44	91.76	87.36
18045968	84.61	92.1	105.12	77.9	73.97	68.46
18049273	84.46	90.36	34.21	47.78	55.96	61.46
18045405	84.39	89.38	72.8	78.04	95.97	95.92
18046067	84.37	79.98	56.06	77	90.07	86.33
18034597	84.36	129.23	117.02	93.96	86.82	81.09
18037183	84.31	31.53	79.27	41.61	48.16	49.04
18032435	84.22	102.12	108.22	117.15	97.44	97.45
18037254	84.1	35.62	14.32	24.33	30.03	45.07
18051515	83.93	53.12	59.13	35.65	49.69	51.46
18045141	83.87	128.83	144.83	134.47	108.95	107.76
18037458	83.84	130.43	131.93	121.05	107.55	92.11
18052053	83.74	184.9	244.16	125.81	105.52	74.19
18049719	83.73	29.55	60.58	48.56	50.97	55.08
18037913	83.65	165.79	170.46	163.85	142.1	120.48
18055724	83.57	56.71	71.06	60.62	80.59	83.99
18043343	83.57	119.95	91.61	123.18	108.56	102.06
18044803	83.52	65.87	64.21	49.47	54.06	53.1
18031929	83.49	105.62	95.28	131.08	122.37	109.79
18055962	83.47	107.83	120.2	117.76	115.43	105.07
18050305	83.44	125.58	90.42	129.57	122.77	120.98
18031763	83.4	142.75	106.41	177.15	160.89	146.6
18043878	83.3	47.86	91.03	79.57	77.6	82.13

18038845	83.27	116.5	109.45	82.6	89.71	84.14
18047763	83.25	112.71	109.18	139.27	122.08	128.9
18046773	83.25	88.53	82.85	60.44	68.17	66.95
18031548	83.23	128.61	151.23	168.35	140.04	135.89
18038230	83.03	11.12	27.24	16.55	21.57	28.08
18048017	82.96	90.89	99.22	78.47	87.93	74.89
18045453	82.94	104.38	150.45	169.97	173.07	132.3
18033877	82.88	42.36	57.65	49.91	54.98	50.74
18042671	82.86	121.33	150.61	150.83	116.92	110.61
18039885	82.86	23.47	44.87	34.01	41.88	52.18
18042733	82.83	73.51	84.06	65.7	63.98	66.56
18035193	82.78	120.14	39.71	38.47	43.5	51.99
18033387	82.7	547.41	0	0	0	0
18049340	82.68	172.69	192.12	188.66	152.21	125.79
18053226	82.51	39.52	31.18	17.84	37.45	46.58
18044024	82.49	104.2	71.65	90.26	82.14	74.18
18044749	82.44	48.72	36.53	39.5	43.23	47.71
18039895	82.36	173.83	142.65	189.54	189.78	155.34
18038643	82.34	90.25	81.75	56.91	67.97	58.37
18051269	82.24	53.48	18.38	56.03	58.49	64.19
18036743	82.23	133.3	134.38	136.66	121.74	103.5
18032351	82.2	192.99	168.62	148.54	131.21	105.54
18040911	82.11	93.22	112.35	66.06	93.18	92.89
18053524	82.09	38.24	38.2	38.87	42.88	49.16
18044405	82.08	76.64	74.54	100.55	98.73	100.75
18037551	82.08	108.58	55.51	83.92	88.62	89.07
18038849	82.07	119.81	146.98	210.82	149.56	142.85
18040373	82.05	148.35	131.14	133.95	116.19	112.37
18031487	82.02	125.86	109.43	137.55	120.43	129.71
18047252	81.97	96.96	73.14	136.24	118.42	127.97
18046387	81.82	53.39	76.59	57.59	52.72	52.18
18043432	81.8	68.47	89.07	63.88	69.11	66.93
18040288	81.76	68.59	63.93	91.21	95.67	94.06
18045031	81.71	78.98	58.02	58.2	61.92	54.5
18031833	81.62	127.88	125.14	135.42	112.25	103.35
18044543	81.61	120.19	94.45	150	160.14	129.13
18052729	81.61	22.88	36.16	23	34.09	40.86
18050901	81.59	153.31	100.37	118.29	116.59	112.64
18037181	81.59	107.41	169.91	183.65	141.71	151.38
18031187	81.59	181.19	99.93	192.22	462.99	259.09
18054904	81.57	94.47	91.41	86.23	75.98	78.9
18048248	81.47	32.58	54.62	34.53	40.39	46.09
18054457	81.42	139.34	118.22	98.85	103.52	95.89
18050698	81.39	47.42	72.93	85.01	93.95	105.55
18031978	81.36	61.51	41.44	121.85	106.35	134.58
18033326	81.32	29.17	54.7	32.76	34.69	46.82
18044410	81.15	58.64	45.56	64.75	82.85	97.44
18039328	81.15	90.38	49.17	87.58	86.66	71.67
18034947	81.11	44	16.35	29.19	40.53	60.05
18050727	81.1	77.56	82.23	78.05	76.65	70.4
18040440	81.1	41.22	57.07	54.34	55.22	63.46
18055994	81.05	88.14	70.71	77.16	82.49	75.1
18042352	80.96	90.28	125.3	69.36	70.35	70.41

18050310	80.93	52.63	74.24	77.21	65.75	66.92
18049823	80.87	49.58	38.82	75.03	83.29	96.24
18048640	80.85	67.3	63.24	68.78	70.23	75.9
18039783	80.84	63.31	63.11	53.48	81.8	81.85
18043785	80.83	62.41	60.27	117.27	101.91	119.84
18034756	80.76	42.53	9.25	67.03	52.85	110.74
18036563	80.76	50.85	55.12	64.52	81.7	79.98
18046349	80.72	96.37	85.69	97.18	90.16	94.05
18053459	80.71	48.93	45.76	49.63	61.09	64.33
18054271	80.6	84.48	54.48	112.23	96.03	90.85
18041368	80.56	28	2.75	3.46	5.71	7.68
18038324	80.36	37.67	48.11	45.35	48.64	58.31
18036179	80.32	139.07	140.93	140.61	126.82	108.92
18031585	80.24	96.35	92.33	99.93	90.57	87.55
18040143	80.21	64.39	69.51	78.42	68.67	66.03
18038148	80.17	175.95	209.15	188.93	153.54	143.51
18056121	80.16	179.32	232.97	153.3	140.95	110.45
18041831	80.03	56.46	66.23	69.92	77.09	77.83
18037622	80.02	65.5	58.64	81.69	84.08	91.63
18054942	80	106.68	72.98	106.82	115.35	105.81
18037489	79.98	186.76	343.15	379.51	308.12	266.76
18036461	79.9	126.59	106.89	135.3	111.3	116.38
18037151	79.86	80.35	62.79	79.61	98.15	103.04
18048201	79.85	94.83	87.2	90.58	84.28	79.57
18034794	79.8	100.36	56.07	81.9	82.44	100.35
18034554	79.79	46.26	45.34	44.28	50.87	55
18052228	79.78	108.1	96.41	81.99	87.19	84.07
18031856	79.76	114.29	152.04	82.71	89.8	84.88
18038255	79.74	80.14	77.43	84.11	91.23	94.02
18033033	79.74	100.14	115.92	141.14	126.17	117.32
18044474	79.74	50.6	66.19	61.35	70.45	59.21
18047616	79.68	50.28	50.17	52.67	58.44	61.42
18048342	79.66	87.09	96.8	84.81	82.74	80.38
18037785	79.59	85.87	61.99	44.71	34.13	32.79
18034672	79.58	60.62	74.56	82.04	83.46	74.31
18045229	79.54	94.18	134.68	83.83	86.85	77.99
18053289	79.52	134.37	158.75	143.69	124.41	106.63
18041281	79.46	120.93	109.99	127.75	125.11	107.87
18054986	79.46	93.22	75.82	70.14	76.05	81.21
18032209	79.35	99.72	114.84	153.52	119.57	147.59
18051257	79.29	62.83	84.2	70.03	69.16	76.96
18054257	79.22	56.62	78.39	87.43	69.2	90.27
18038265	79.22	67.49	41.92	115.44	107.52	100.67
18054873	79.18	41.61	49.65	44.35	50.23	53.52
18050135	79.13	65.41	61.11	64.89	67.33	69.78
18044846	79.1	58.57	61.29	81.13	102.69	97.6
18053236	78.98	58.59	66.95	88.29	98.18	111.91
18038455	78.91	98.36	70.43	117.65	128.16	118.48
18041036	78.86	80.46	130.84	41.08	56.81	31.35
18031580	78.81	74.46	59.31	76.31	80.6	80.02
18047683	78.75	94.6	78.95	74.5	78.89	72.88
18050276	78.68	42.48	58.39	70.34	75.87	82.64
18047518	78.64	89.24	98.74	58.79	59.12	55.68

18037339	78.6	75.71	85.11	103.53	85.51	86.89
18040155	78.59	103.84	66.56	67.14	64.27	77.27
18048582	78.43	36.45	10.67	20.32	16.5	26.98
18050081	78.3	101.11	103.7	121.22	123.72	117.05
18044513	78.26	49.8	46.17	37.84	79.38	67.57
18032155	78.21	84.07	194.6	101.28	89.43	78.69
18036543	78.09	138.52	106.4	87.54	74.94	62.67
18046186	78.09	65.34	58.69	65.11	69.46	91.83
18037606	78.06	96.3	41.38	79.76	73.83	66.25
18052687	77.94	78.33	102.67	113.56	125.64	119.72
18037472	77.93	82.29	47.95	114.04	99.66	120.57
18038165	77.7	166.74	145.23	159.9	123.11	106.08
18055558	77.52	65.75	22.57	30.02	34.42	53.84
18031450	77.48	132.02	129.57	122.73	104.47	92.32
18049060	77.46	34.02	55.15	34.91	41.65	48.09
18054125	77.41	56.79	64.18	67.39	70.98	68.27
18040775	77.26	83.52	87.14	82.58	82.02	76.51
18055328	77.21	77.45	73.39	62.68	72.32	66.02
18048306	77.14	89.17	98.85	105.86	102.52	91.89
18049001	77.06	85.53	65.04	82.01	68.53	79.82
18039855	77.03	117.36	134.33	111.97	94.58	83.49
18033108	76.99	131.03	121.86	66.02	64.05	66.4
18051721	76.95	92.68	56.78	171.3	108.64	174.43
18034540	76.95	41.49	59.01	61.06	67.3	74.66
18037849	76.92	62.82	99.17	47.18	63.4	69.92
18051419	76.9	46.19	16.48	35.04	54.67	65.05
18034173	76.86	68.88	70.97	87.1	98.52	101.15
18053396	76.67	207.99	169.47	175.77	144.12	128.45
18033692	76.67	32.59	8.71	6.27	16.9	31
18034268	76.64	135.2	134.71	100.64	97.77	81.23
18048858	76.61	42.35	55.3	55.68	55.77	68.4
18045992	76.54	62.37	54.42	68.27	68.8	65.56
18045960	76.48	166.86	170.59	140.34	127.64	105.6
18031358	76.46	97.61	81.07	70.71	81.82	73.69
18049309	76.38	102.77	34.34	40.67	39.8	40.57
18036562	76.3	112.51	76.05	72.67	69.73	62.63
18045715	76.2	55.76	50.8	177.71	196.36	184.97
18033646	76.18	81.64	62.97	98.32	67.9	76.78
18031664	76.15	46.92	71.94	60.53	68.15	67.67
18049936	76.14	117.97	181.13	148.7	122.83	120.64
18042341	76.13	78.02	62.72	66.63	77.85	75.03
18040527	76.12	69.09	84.03	93.07	82.14	88.19
18052755	76.12	102.25	88.57	125.74	118.46	111.57
18045483	76.1	94.75	106.49	93.94	97.86	90.8
18047705	76.09	103.05	104.66	122.15	96.98	103.3
18044826	76.08	103.06	105.11	124.28	132.18	116.34
18037616	76.05	48.75	78.56	85.6	88.52	92.42
18048261	76.02	92.7	81.59	92.03	91.5	95.17
18032004	76	79.18	84.71	82.35	66.79	77.04
18034566	76	139.14	111.95	114.38	99.7	89.43
18038834	75.95	21.88	40.82	28.33	35.86	39.03
18052125	75.85	115.18	48.89	49.73	52.21	36.5
18049182	75.79	54.02	47.75	51.87	53.36	62.39

18042866	75.76	159.27	203.47	157.11	131.85	110.47
18042455	75.74	73.3	57.79	66.14	70	75.12
18042355	75.73	83.3	96.11	80.04	73.66	75.73
18035458	75.62	30.23	52.84	39.46	40.33	51.21
18051208	75.57	116.31	59.72	73.64	71.07	81.09
18040618	75.56	101.86	95.91	99.96	89.01	83.1
18041707	75.53	48.01	65.21	80.28	82.78	93.9
18042168	75.52	48.96	50.23	73.1	75.47	80.45
18049241	75.52	50.33	73.74	62.51	66.6	60.81
18048451	75.51	52.95	77.23	51.64	57.94	57.08
18050226	75.46	193.12	146.67	156.27	148.32	121.56
18043748	75.35	31.62	78.43	63.66	82.87	85.16
18044695	75.35	70.37	72.07	89	81.62	81.23
18052109	75.32	123.89	193.7	148.67	143.39	128.44
18038599	75.3	70.92	81.73	55	61.24	57.32
18045952	75.24	78.57	89.38	76.16	82.2	77.52
18054997	75.15	100.18	65.13	73.43	57.88	65.07
18053292	75.14	40.03	69.87	57.3	59.44	64.22
18038363	75.12	98.93	150.36	169.95	131.85	122.25
18043707	75.07	64.31	33.12	24.32	28.21	29.05
18031846	75.03	187.52	179.95	162.29	118.91	109.65
18048194	75	75.27	68.52	61.71	56.02	61.14
18055291	74.97	36.8	56.19	57.35	58.22	67.95
18036001	74.97	133.66	80.07	94.57	90.51	81.99
18055965	74.93	72.12	58.43	92.98	79.57	91.21
18034336	74.85	84.44	118.04	63.32	80.57	80.34
18054571	74.82	64.18	56.3	81.52	84.97	94.36
18038188	74.81	99.18	116.51	224.31	173.56	186.12
18050397	74.8	49.28	31.75	37.61	44.74	51.24
18035185	74.78	116.85	102.85	113.58	114	109.26
18054338	74.76	151.2	75.48	38.25	38.85	37.64
18036098	74.76	34.91	35.43	22.4	32.31	35.12
18039849	74.67	102.02	113.47	144.54	122.5	121.27
18054243	74.57	193.35	121.16	104.61	92.59	74.9
18049267	74.57	51.62	81.82	55.48	61.79	69.67
18047796	74.52	26.04	63.55	40.66	43.37	52.93
18045924	74.49	84.36	53.23	72.59	73.56	72.83
18044404	74.47	253.41	174.94	87.6	84.02	63.52
18047371	74.3	107.17	135.84	89.21	107.4	108.04
18056159	74.25	103.01	89.97	90.44	92.54	83.03
18043490	74.16	57.26	58.44	65.32	65.63	70.72
18051904	74.15	88.09	27.58	38.96	76.31	74.48
18043360	74.14	64.05	9.32	55.28	46.25	44.65
18046689	74.12	113.56	81.71	79.78	87.88	73.72
18046835	74.11	150.08	108.89	119.29	104.09	111.29
18038639	74.11	46.11	49.64	39.86	54.65	57.97
18039477	74.1	76.06	84.18	43.68	41.54	39.58
18045175	74.06	118.32	110.86	75.72	85.56	83.62
18034385	74	73.77	96.9	87.19	81.62	79.56
18054245	73.95	95.14	32.17	125.93	117.59	138.96
18055557	73.93	134.14	111.45	131.7	108.85	133.15
18043345	73.9	193.66	151.24	140.68	101.83	84.68
18038089	73.89	58.88	76.04	67.2	52.72	50.18

18033470	73.83	93.73	31.4	35.51	31.36	25.71
18048563	73.82	81.94	80.56	78.11	72.6	77.14
18036528	73.67	34.84	30.98	35.08	32.3	39.1
18037099	73.66	53.48	24.53	27.8	38.2	41.57
18050990	73.64	126.95	95.55	109.28	95.8	96.23
18032223	73.63	63.36	110.64	136.09	150.7	142.05
18048656	73.61	108.43	105.3	119.25	110.75	96.59
18052292	73.51	81.59	58.24	154.53	133.5	181.05
18052911	73.41	55.71	64.11	62.52	61.56	64.15
18036546	73.37	82.09	40.87	35.39	53.64	61.23
18041445	73.31	120.06	87.56	55.56	63.07	61.71
18042969	73.18	60.69	43.3	64.68	57.49	63.32
18043794	73.15	39.18	44.32	65.88	77.91	93.09
18052108	73.09	111.18	98.69	83.61	75.03	70.14
18040175	73.06	32.45	31.71	48.64	80.45	75.52
18051958	73.02	56.11	53.28	79.89	89.35	96.48
18053981	73.01	85.61	155.16	29.62	52.81	30.83
18036701	72.92	49.85	62.92	81.02	84.76	89.8
18035528	72.91	57.35	42.2	62.37	68.19	72.31
18051536	72.86	96.04	110.13	97.49	90.28	94.9
18047148	72.85	88.73	88.65	119.3	97.7	91.81
18045412	72.85	87.61	97.71	105.24	92.57	101.34
18043805	72.69	96.8	133.49	106.7	84.58	70.48
18047144	72.68	61.79	72.98	62.74	70.77	66.92
18043430	72.65	75.18	89.93	66.09	63.35	64.35
18035705	72.62	121.33	117.57	126.78	116.73	112.34
18049752	72.55	22.24	37.15	28.46	40.29	45.34
18053746	72.54	50.93	63.75	68.31	68.48	65.7
18036260	72.52	89.32	89.87	72.35	66.51	65.08
18032820	72.44	71.89	118.26	82.85	88.93	86.65
18041631	72.43	118.42	54.62	96.88	95.25	95.05
18039021	72.32	122.33	34.07	77.25	60.51	69.91
18050388	72.24	108.96	78.18	87.33	108.5	101.93
18040088	72.23	101.44	69.41	83.47	72.3	63.71
18045308	72.22	69.39	76.82	85.49	82.1	90.53
18038818	72.16	66.13	51.55	57.07	70.52	70.56
18050693	72.16	29.24	15.93	19.66	31.83	50.11
18042926	72.14	51.55	63.76	45.63	52.28	57.05
18039791	72.11	75.01	70.03	92.09	85.28	98.27
18041571	72.09	59.29	69.83	66.16	91.15	85.86
18036549	72.08	55.75	54.33	89.19	82.37	92.71
18034812	72.01	35.13	44.91	51.76	58.33	57.76
18049789	71.97	156.58	119.82	106.65	74.79	74.94
18036619	71.93	76.68	60.29	83.86	78.83	78.4
18048199	71.86	76.55	71.77	77.64	71.3	74.89
18055379	71.83	17.48	25.56	22.41	25.51	34.17
18041947	71.8	72.52	80.7	71.88	75.99	65.01
18035022	71.8	93.06	101.96	77.11	74.68	77.3
18046929	71.75	86.39	74.01	96.33	97.85	97.64
18036438	71.74	51.37	92.54	99.91	81.69	78.72
18039214	71.69	113.46	80.5	93.69	92.26	89.05
18052216	71.6	23.41	38.54	37.28	44.83	51.05
18050182	71.58	89.28	122.4	84.78	87.89	68.34

18053793	71.57	55.65	44.7	51.23	76.77	79.78
18055805	71.55	44.49	15.62	10.82	17.78	16.08
18045636	71.52	23.11	47.5	26.68	30.52	39.95
18054653	71.5	83.47	53.74	58.22	59.72	74.81
18054822	71.5	99.76	75	85.96	86.16	92.5
18047469	71.46	49.39	62.77	51.03	59.27	57.3
18049993	71.35	60.83	24.71	71.73	70.44	60.6
18044366	71.24	40.87	69.03	34.86	45.67	49.75
18051680	71.21	75.97	85.95	60.69	70.64	54.1
18041779	71.19	43.75	21.07	33.76	37.98	51.04
18051352	71.18	93.31	110.29	140.8	119.41	102.65
18050679	71.11	70.41	80.35	93.91	83.77	91.92
18049266	71.1	65.11	68.66	66.28	68.29	70.87
18036069	71.1	28.33	30.29	28.71	39.8	41.39
18032461	71.09	75.29	99.17	58	60.98	64.37
18040389	71.07	57.17	39.76	43.17	61.42	66.82
18054838	71.05	103.43	88.81	95.59	99.68	74.21
18035014	71.03	113.1	119.82	72.22	73.5	68.42
18046849	71.01	43.21	63.11	56.94	55.82	59.78
18050484	70.96	78.78	72.52	54.96	60.72	66.54
18039275	70.95	52.02	58.66	69.07	68.85	76.06
18055702	70.94	145.38	230.38	175.56	161.74	135.81
18046229	70.9	98.33	82.96	85.35	81.44	77.54
18053513	70.86	85.66	74.77	77.07	78.86	74.23
18049038	70.8	99.21	84.09	101.39	95.23	99.49
18053423	70.78	137.03	119.13	107.72	101.91	94.41
18036482	70.74	93.08	96.3	61.72	76.53	79.18
18048575	70.73	140.54	93.5	129.73	108.66	100.48
18055225	70.64	45.94	111.99	99.63	85.13	87.78
18045048	70.58	133.8	81.58	67.18	65.75	64.5
18048611	70.56	27.61	45.85	38.04	44.24	49.79
18033660	70.55	61.79	32.74	71	65.76	84.35
18035791	70.47	67.35	61.98	72.13	94.82	106.93
18054659	70.46	60.07	57.5	54.63	53.19	52.25
18047021	70.43	21.86	50.45	32.18	37.44	45.47
18043995	70.35	60.39	58.88	68.42	69.39	72.29
18042952	70.32	32.98	33.48	25.63	48.68	46.98
18031686	70.19	65.85	43.64	48.65	54.85	64.98
18048958	70.16	125.11	119.34	111.54	107.09	98.1
18042224	70.14	57.59	51.48	86.18	76.67	94.7
18034793	70.1	25.48	36.7	17.93	25.2	26.79
18044353	70.02	37.15	56.16	33.42	37.1	45.06
18044924	70	44.62	23.9	58.62	45.05	55.61
18054994	69.93	49	44.08	51.39	50.68	54.94
18047430	69.93	79.49	81.42	78.61	124.74	84
18038689	69.88	75.16	72.04	117.32	91.74	100.15
18045934	69.86	85	61.39	4.06	12.57	4.72
18049386	69.78	70.2	74.26	98.9	100.3	104.98
18037693	69.52	61.13	46.1	57.4	58.68	58.33
18038077	69.45	76.52	75.22	73.82	76.54	71.64
18042298	69.36	75.82	70.97	76.48	69.91	79.13
18038489	69.35	46.78	56.71	54.33	59.59	60.42
18033650	69.35	12.83	17.39	21.7	28.71	37.66

18048149	69.31	55.1	73.45	63.93	73.2	86.5
18036551	69.23	20.75	36.95	32	36.02	41.9
18043189	69.13	86.95	84.22	96.61	80.74	89.26
18047824	69.12	12.19	25.06	28.12	34.38	42.7
18048455	69.07	43.32	53.22	42.74	52.12	50.51
18038973	69.06	60.56	74	64.94	58.11	62.98
18047342	69.03	94.23	106.68	126.52	98.9	94.44
18041390	69.01	183.68	180.24	117.57	102.96	80.1
18047978	68.85	86.08	60.02	69.43	86.55	79.98
18037411	68.84	140.99	105.22	123.77	132.67	112.57
18051048	68.76	35.77	45.02	38.1	41.6	50.07
18051747	68.7	75.69	44.32	30.76	38.34	34.74
18043795	68.69	60.17	66.43	47.11	55.92	57.42
18048185	68.68	88.8	32.81	52.1	62.48	52.11
18051759	68.62	60.86	83.91	70.26	67.02	70.53
18053251	68.6	43.47	45.37	43.57	46.17	45.06
18040696	68.57	92.38	81.18	77.16	73.39	74.44
18033557	68.42	170.19	126.15	132.08	99.97	91.83
18049104	68.4	62.42	44.72	75.68	61.8	64.59
18042933	68.4	29.57	30.62	32.12	41.97	48.8
18054595	68.32	33.65	48.88	55.24	61.86	79.31
18035503	68.19	122.42	123.96	120.85	108.58	84.97
18040347	68.12	62.16	75.21	110.31	107.99	137.41
18046090	68.1	104.78	74.53	109.06	84.68	77.98
18049164	68.04	96.28	85.64	109.81	87.14	92.6
18032259	68.03	83.26	88.43	65.87	69.31	63.15
18041426	67.98	52.74	69.37	42.15	49.81	51.95
18047706	67.98	57.24	48.89	51.11	58.72	52.24
18033564	67.96	86.12	94.09	93.81	84.21	77.58
18036074	67.96	126.81	156.82	121.84	109.54	86
18043081	67.93	82.09	109.76	69.06	67.04	65.05
18052398	67.93	45.77	35.25	97.23	95.44	113.22
18039097	67.93	48.47	55.07	61.5	66.69	60.04
18051074	67.89	47.06	39.78	60.33	66.06	97.41
18043149	67.85	127.92	107.16	146.24	161.64	126.09
18050723	67.83	132.61	75.63	73.5	74.33	65.04
18046274	67.78	52.43	36.71	43.06	42.32	37.21
18035003	67.73	82.05	69.27	72.1	53.96	57.61
18039110	67.73	40.8	48.2	47.25	54.46	66.21
18036430	67.71	57.37	43.43	40.12	43.84	47.48
18035656	67.7	66.22	73.88	65.83	69.42	65.68
18034746	67.68	70.96	102.64	104.46	106.29	85.1
18032381	67.65	91.45	100.55	78.65	72.14	72.27
18048206	67.56	89.37	74.73	82.39	84.5	84.68
18038512	67.48	18.99	32.5	27.08	33.93	44.09
18044233	67.44	44.31	65.85	60.04	67.95	77.18
18040740	67.44	114.11	63.38	132.87	121.79	111.93
18040807	67.43	89.83	114.42	109.74	91.71	91.91
18038114	67.31	53.45	53.94	66.05	69.99	71.63
18052541	67.21	129.82	346.2	172.97	172.38	119.06
18036688	67.19	90.72	113.33	84.48	87.66	66.66
18037283	67.18	170.64	72.3	64.98	54.76	51.82
18045875	67.15	111.01	122.01	148.66	142.99	106.35

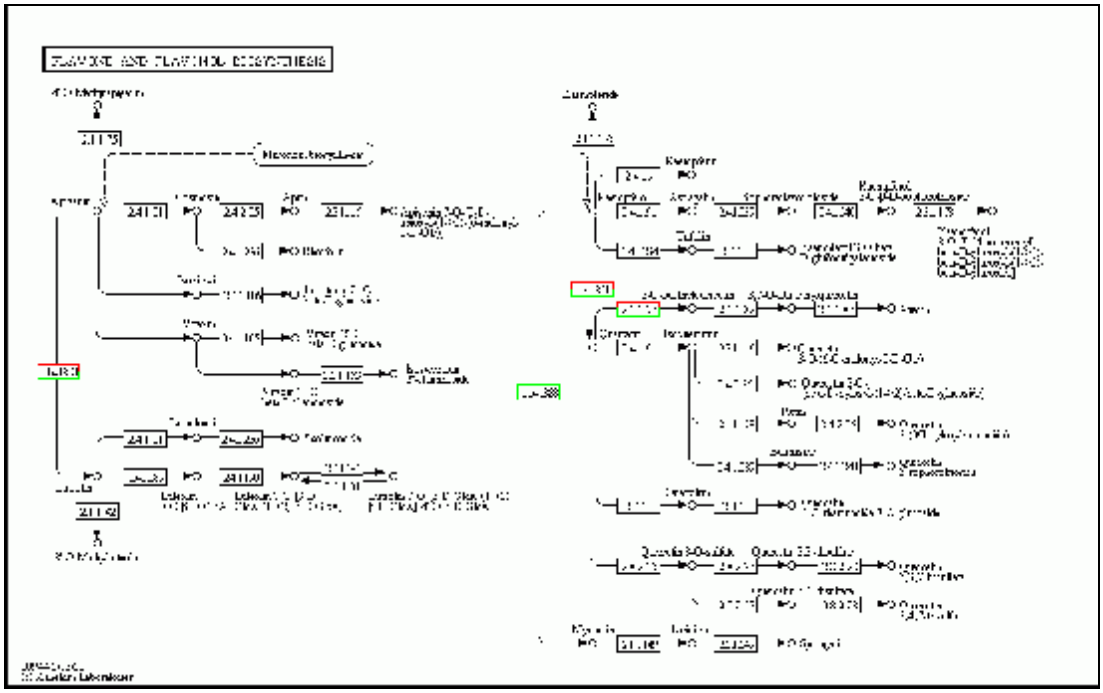
18049743	67.13	41.81	47.22	52.43	55.23	57.77
18046265	67.11	165.34	156.16	188.53	145.58	111.77
18034848	67.11	94.44	90.08	87.86	87.93	72.85
18036760	67.09	88.11	130.05	92.96	77.12	90.98
18044387	67.07	79.35	67.92	97.63	86.18	72.69
18037516	67.03	65.38	58.91	80.88	84.22	86.43
18034396	67.01	101.06	106.28	110.71	96.71	74.57
18034836	66.96	35.8	36.33	42.5	46.46	52.37
18048605	66.9	39.12	48.46	45.65	47.8	53.22
18040829	66.9	91.25	82.59	109.71	108.31	81.11
18041664	66.85	53.02	57.27	52.09	55.9	54.77
18045794	66.85	90	87.26	114.12	96.02	103.03
18042922	66.8	58.63	57.28	50.56	61.74	58.57
18039788	66.79	74.56	60.89	75.28	72.1	77.61
18032085	66.75	81.89	55.4	61.69	54.95	64.22
18047244	66.75	88.19	53.53	56.76	41.2	38.61
18055956	66.73	56.32	54.09	65.16	77.16	64.71
18045492	66.72	27.74	41.4	36.36	41.44	45.81
18050160	66.72	54.98	72.3	62.1	68.04	78.2
18054187	66.67	75.54	49	66.23	53.13	66.64
18038535	66.64	40.11	22.98	50.26	49.89	77.18
18054346	66.6	50.52	18.09	41.52	43.46	53.63
18032774	66.59	84.44	76.7	65.47	66.5	58.38
18048116	66.59	117.05	95.94	115.94	114.19	119.17
18041636	66.56	52.44	73.53	58.69	58.77	58.01
18042893	66.49	73.37	19.17	40.17	45.44	55.94
18042166	66.48	61.52	66.98	68.84	64.08	74.76
18050994	66.47	69.49	72.66	59.89	63.25	58.9
18034456	66.4	45.27	38.21	62.07	58.71	75.59
18034862	66.39	97.79	63	84.19	75.47	86.03
18036941	66.33	14.63	30.19	29.94	33.39	43.11
18045655	66.31	94.08	73.47	108.19	82.34	72.94
18051687	66.3	121.11	86.19	99.62	87.82	70.61
18037030	66.29	56.32	60.09	58.48	59.64	56.06
18046060	66.28	113.82	114.99	95.11	80.05	72.52
18055602	66.18	78.43	81.35	89.22	88.35	80.6
18054634	66.15	39.97	19.84	66.96	65.54	72.57
18046556	66.12	44.03	32.35	57.67	65.23	103.99
18047981	66.1	47.14	56.67	60.21	70.95	79.97
18050479	66.09	76.69	81.26	108.19	92.33	102.75
18044455	66.09	45.26	58.33	64.32	71.14	84.17
18038306	66.05	90.42	71.39	92.63	95.34	102.86
18043672	66.04	33.21	29.3	34.76	49.13	47.62
18046779	65.94	94.92	79.59	101.33	92.51	82.2
18035356	65.93	67.3	105.41	128.77	114.81	107.51
18036426	65.93	35.6	19.8	11.36	45.96	27.4
18048396	65.88	108.38	97.47	110.98	104.21	107.16
18035301	65.83	35.08	53.42	63.82	64.5	78.35
18038790	65.78	44.68	41.34	54.65	54.34	68.99
18051471	65.77	50.67	51.99	61.69	49.82	70.88
18050981	65.75	79.17	70.28	119.05	127.75	136.09
18045937	65.73	51.36	51.34	43.12	44.15	47.22
18042137	65.72	48.43	57.03	97.07	82.09	91.44

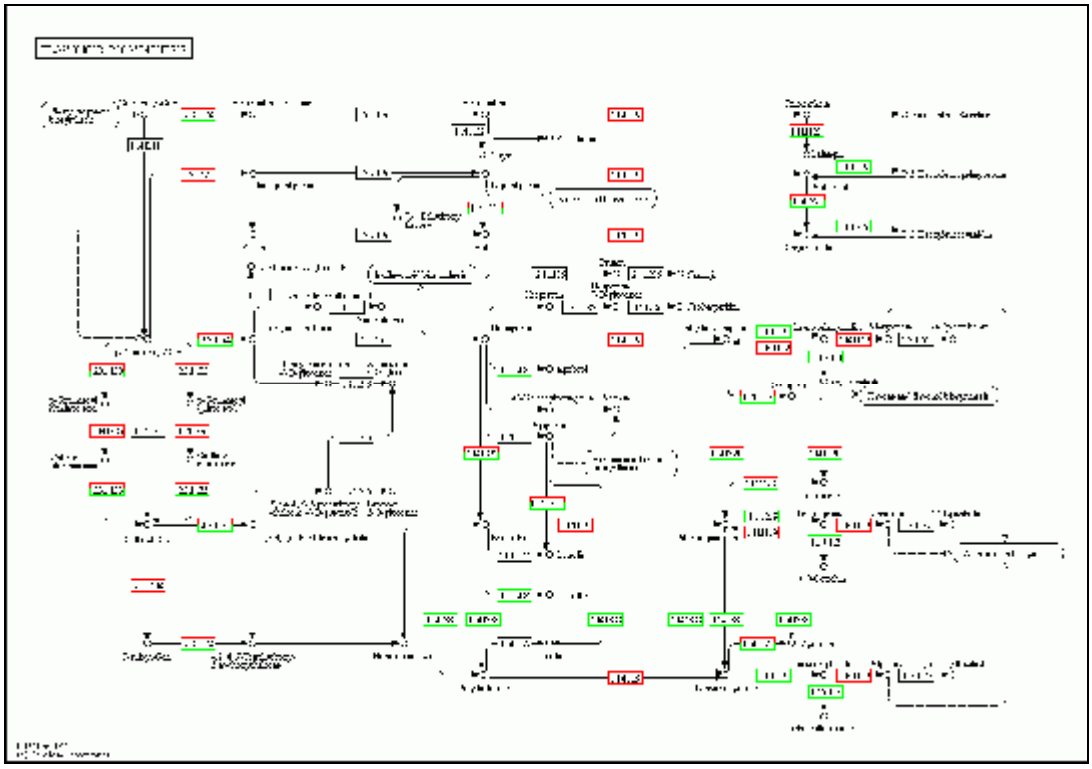
18045320	65.71	95.89	73.74	120.29	100.26	107.6
18035678	65.68	31.89	23.01	38.39	44.02	53.38
18043407	65.57	23.75	35.74	33.39	35.97	49.33
18038355	65.55	33.49	33.02	41.85	43.93	52.66
18040153	65.44	73.1	70.33	68.99	71.07	67.67
18039869	65.41	117.21	194.02	179.29	126.34	103.49
18055081	65.36	40.72	44.12	62.58	65.56	72.35
18053311	65.34	122.22	89.87	69.57	79.25	58.91
18040626	65.34	139.17	100.31	108.2	89.97	86.76
18041148	65.34	76.61	53.18	46.2	62.49	57.85
18036596	65.32	25.66	40.3	35.38	36.02	40.61
18054745	65.26	44.15	54.89	22.13	36.39	32.09
18044893	65.25	175.15	219.25	111.5	98.12	80.24
18055442	65.24	85.64	50.54	48.54	53.43	57.04
18053075	65.23	102.69	92.76	105.39	91.28	84.35
18053810	65.17	55.92	63.98	52.02	48.88	50.56
18042407	65.15	45.71	31.1	43.67	41.53	49.45
18042142	65.03	44.19	37.87	62.51	64.14	75.82
18046218	65.03	49.22	271.76	33.91	63.01	49.35
18034051	65.01	43.58	68.49	33.94	38.02	39.34
18034171	64.99	34.77	36.17	48.88	51.44	50.78
18049707	64.97	74.44	68.68	76.36	91.41	83.07
18038676	64.95	61.48	58.79	43.13	46.75	46.82
18042211	64.88	75.72	70	73.1	73.49	66.29
18046477	64.87	118.62	14.74	77.28	120.94	94.52
18049819	64.87	87.16	73.28	65.33	60.54	66.86
18053128	64.85	110.81	71.19	95.05	85.01	85.31
18050711	64.84	62.57	62	86.37	88.04	100.86
18047679	64.83	152.79	141.46	187.55	146.34	135.5
18033231	64.78	60.89	16.59	24.2	38.15	37.51
18050493	64.78	36.85	65.92	50.9	62.03	62.17
18035911	64.78	82.44	77.78	101.37	94.11	101.11
18053749	64.71	73.9	71.84	64.03	73.77	81.26
18033512	64.71	65.62	82.26	80.05	74.65	74.55
18043951	64.69	87.73	82.56	80.06	69.54	62.9
18053853	64.67	79.47	90.44	75.87	76.7	73.67
18033644	64.58	46.21	68.83	65.21	65.15	58.67
18042822	64.51	95.32	107.96	114.12	98.08	88.55
18047559	64.49	17.55	41.09	24.4	28	34.24
18039488	64.48	65.63	28.42	27.05	35.98	35.56
18035025	64.46	68.33	55.84	57.09	61.96	58.6
18041972	64.38	78.59	106.59	88.36	79.35	78.47
18042810	64.37	100.5	73.54	85.56	84.84	75.81
18042686	64.25	43.82	51.16	50.89	47.28	53.38
18040597	64.23	26	40.61	39.77	42.7	48.09
18031527	64.22	49.92	67.32	36.83	45.55	55.25
18041071	64.22	91.08	58.86	145.82	140.14	136.3
18036604	64.22	72.35	69.39	76.88	76.43	69.06
18053085	64.21	113.31	184.11	186.84	129.42	104.31
18041806	64.17	70.68	35.38	75.1	65.86	60.47
18037845	64.15	77.97	55.42	81.28	74.97	78.3
18044292	64.15	39.72	59.09	44.12	51.95	49.71
18051911	64.14	14.98	29.5	31.2	33.8	40.37

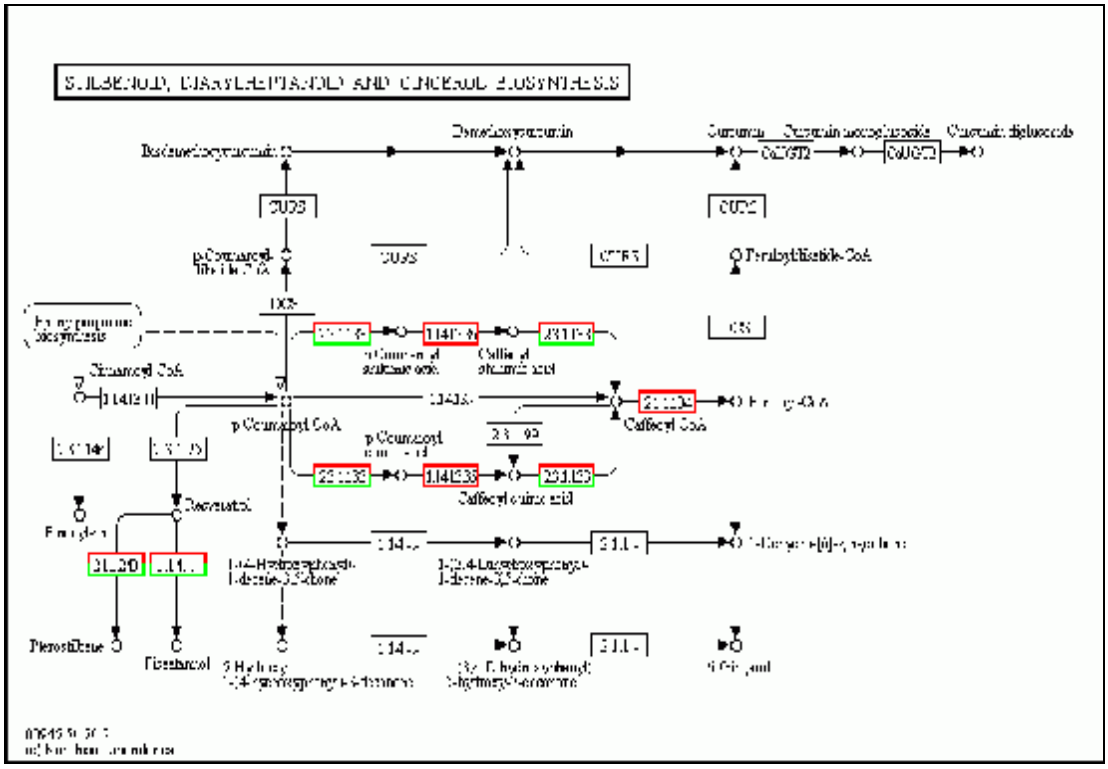
18040935	64.13	65.2	41.7	56.53	58.75	51.82
18039394	64.09	24.09	27.06	24.17	30.54	39.87
18039186	64.08	107.21	127.81	111.81	102.57	94.29
18033891	64.08	102.8	89.94	65.95	59.24	57.79
18032727	64.07	67.25	86.6	74.66	83.82	77.23
18050101	63.99	70.44	67.06	94	80.09	73.36
18043385	63.99	69.59	28.23	95.87	84.26	98.2
18036836	63.98	16.06	22.73	30.52	30.79	41.68
18036047	63.95	111.84	112.19	88.75	89.03	91.7
18034083	63.92	86.84	47.51	29.79	40.25	37.22
18052693	63.92	65.1	62.06	60.93	62.09	63.9
18049584	63.88	74.52	70.28	83.64	74.75	71.38
18046593	63.79	49.41	54.41	51.14	51.42	58.39
18053335	63.77	70.54	57.39	70.93	66.77	67.78
18046347	63.75	122.05	112.9	125.69	118.57	90.48

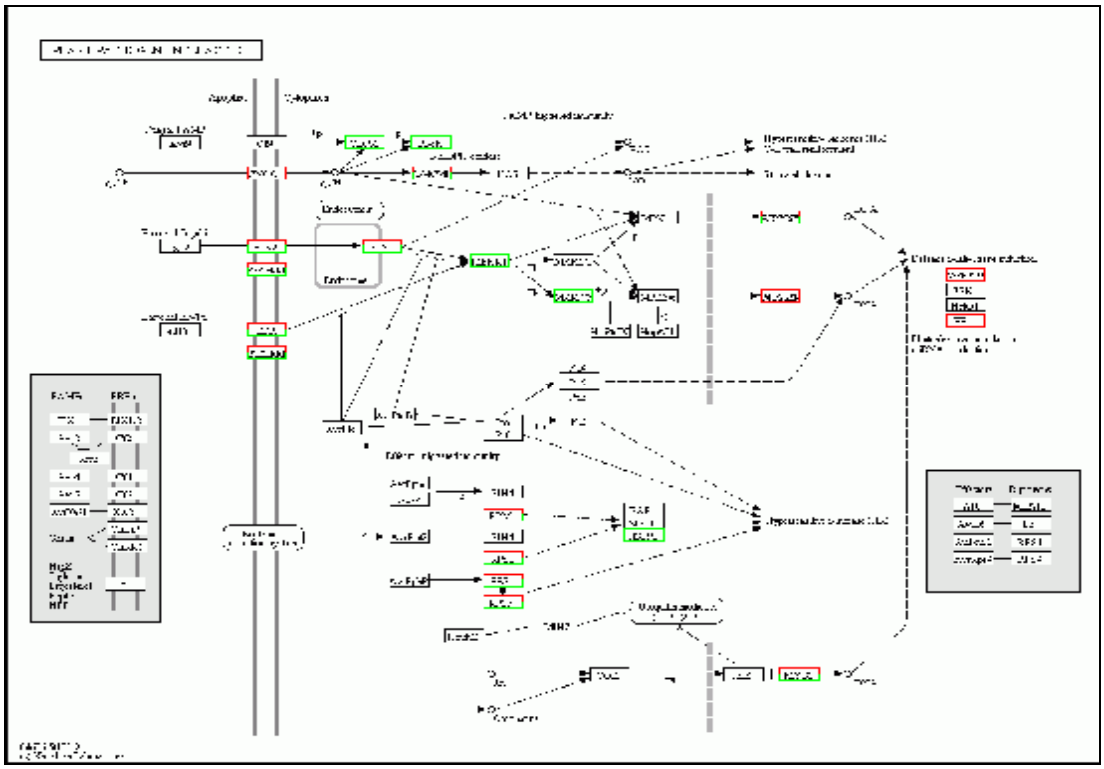
EK 2. Algerian 3. gün ve Orlando 3. gün arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin katıldığı yolaklar

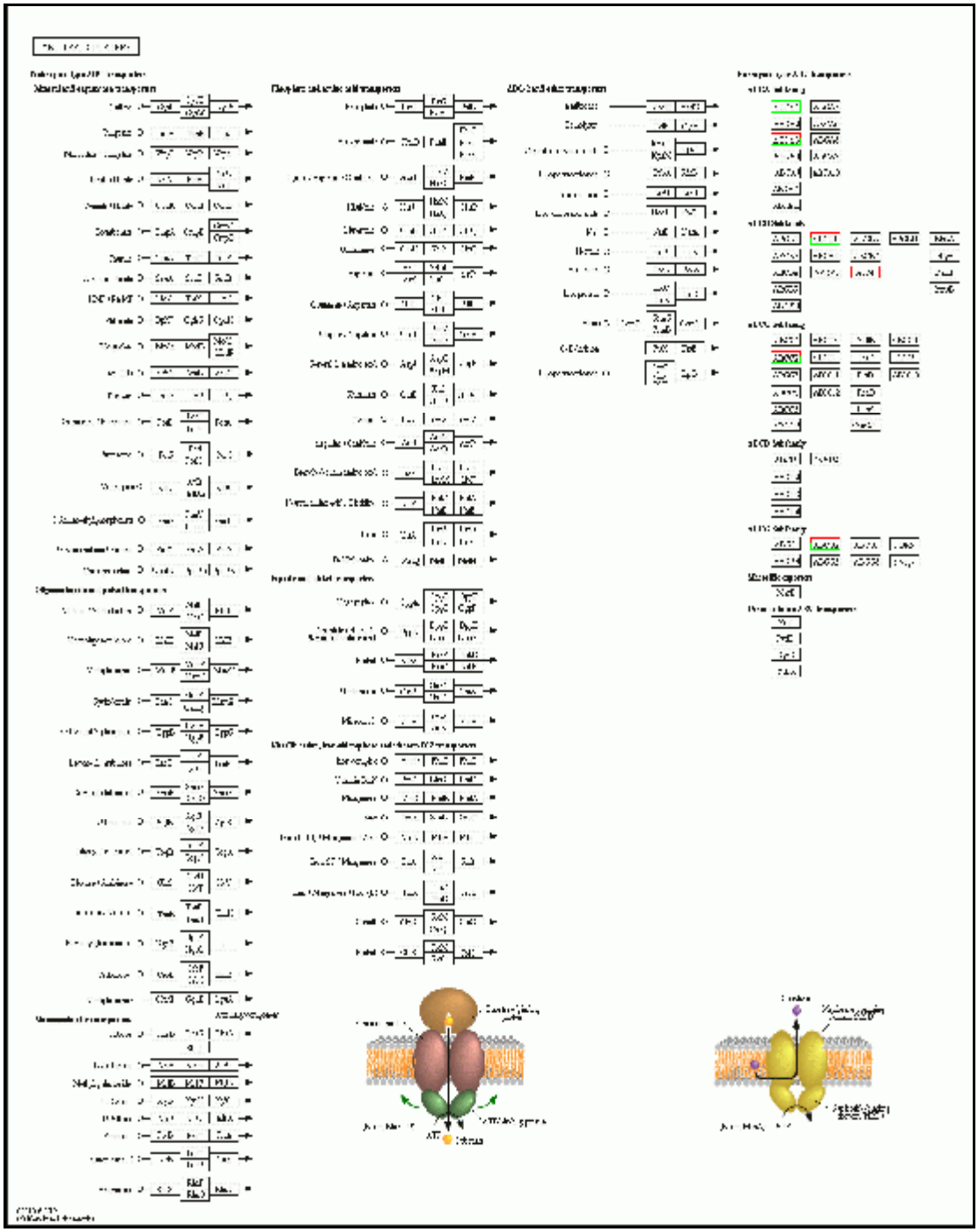
Kırmızı renkli çerçeveler upregüle, yeşil renkli çerçeveler downregüle ifade olan genleri ifade etmektedir.

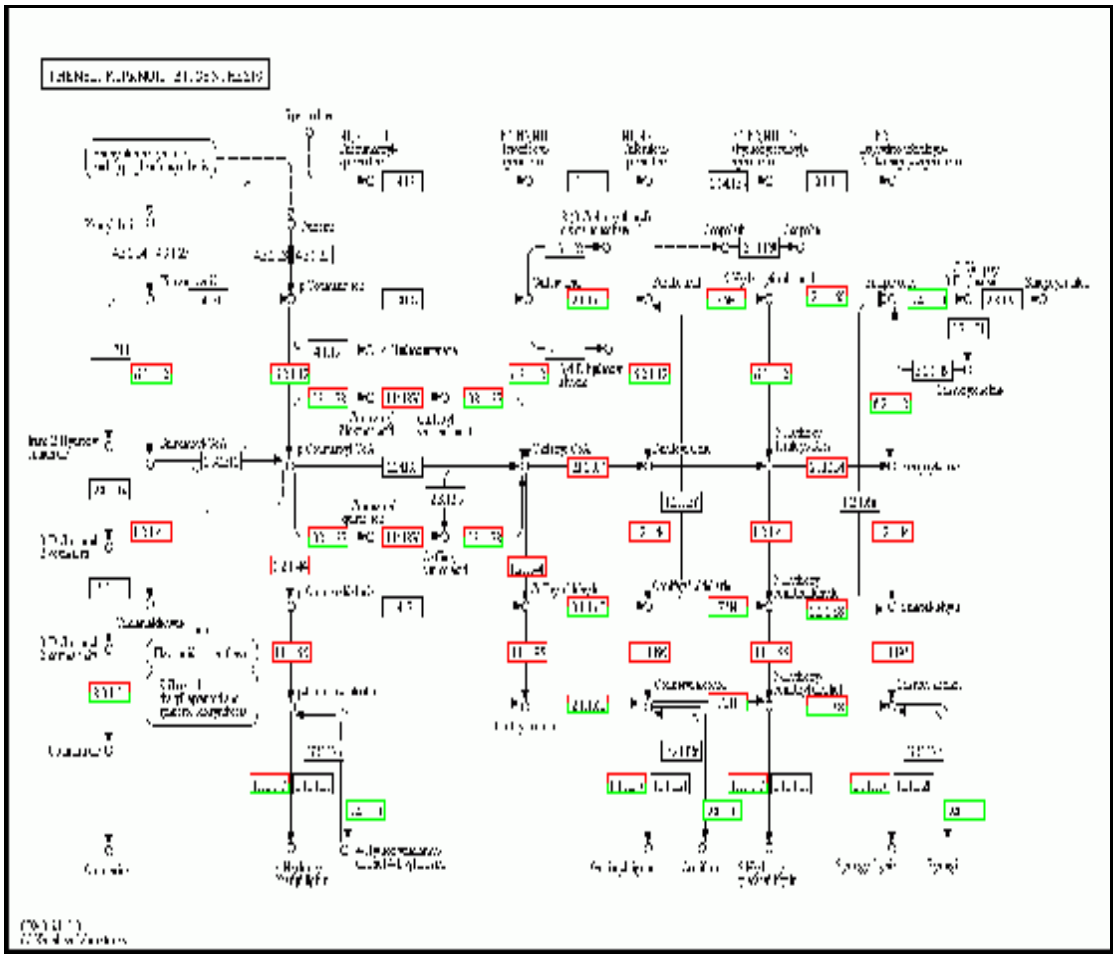


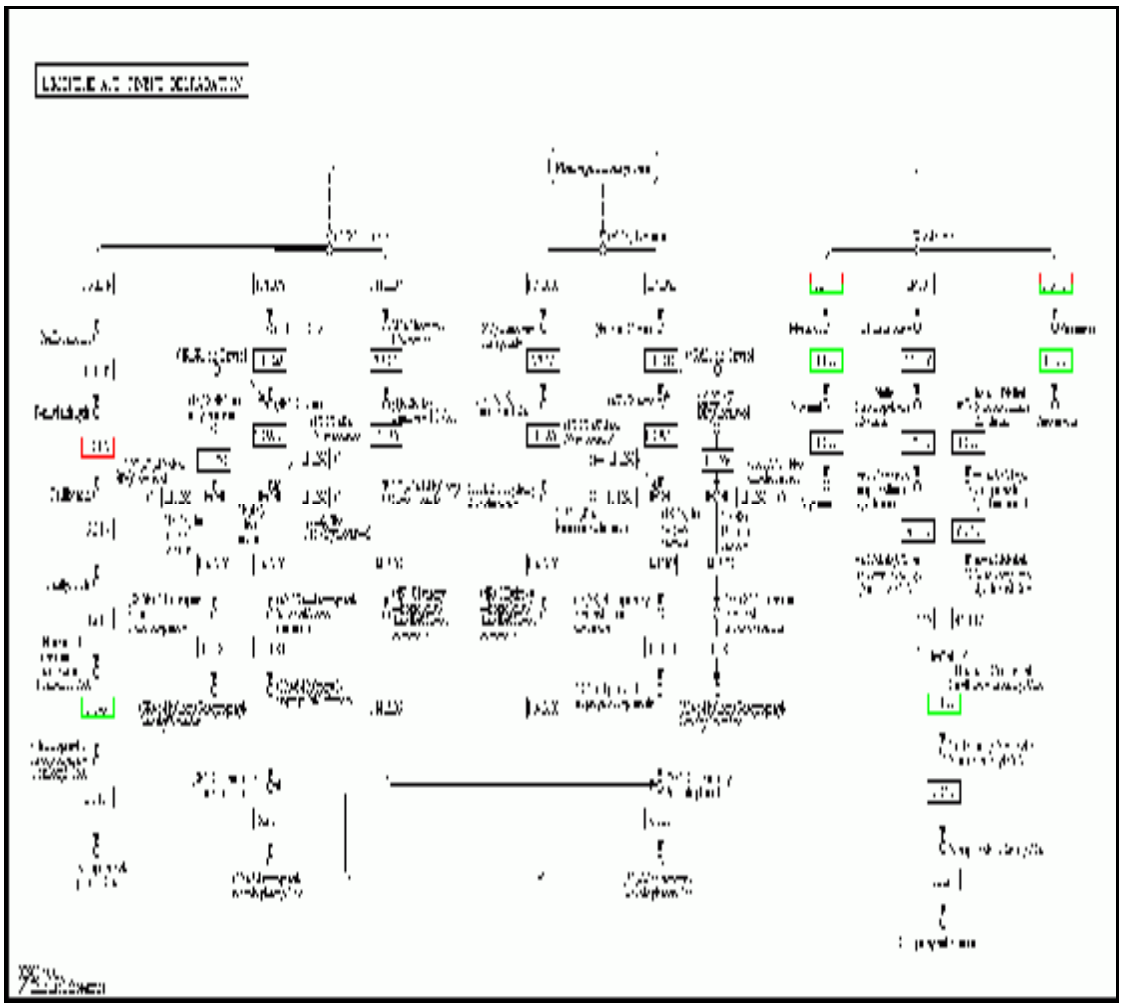


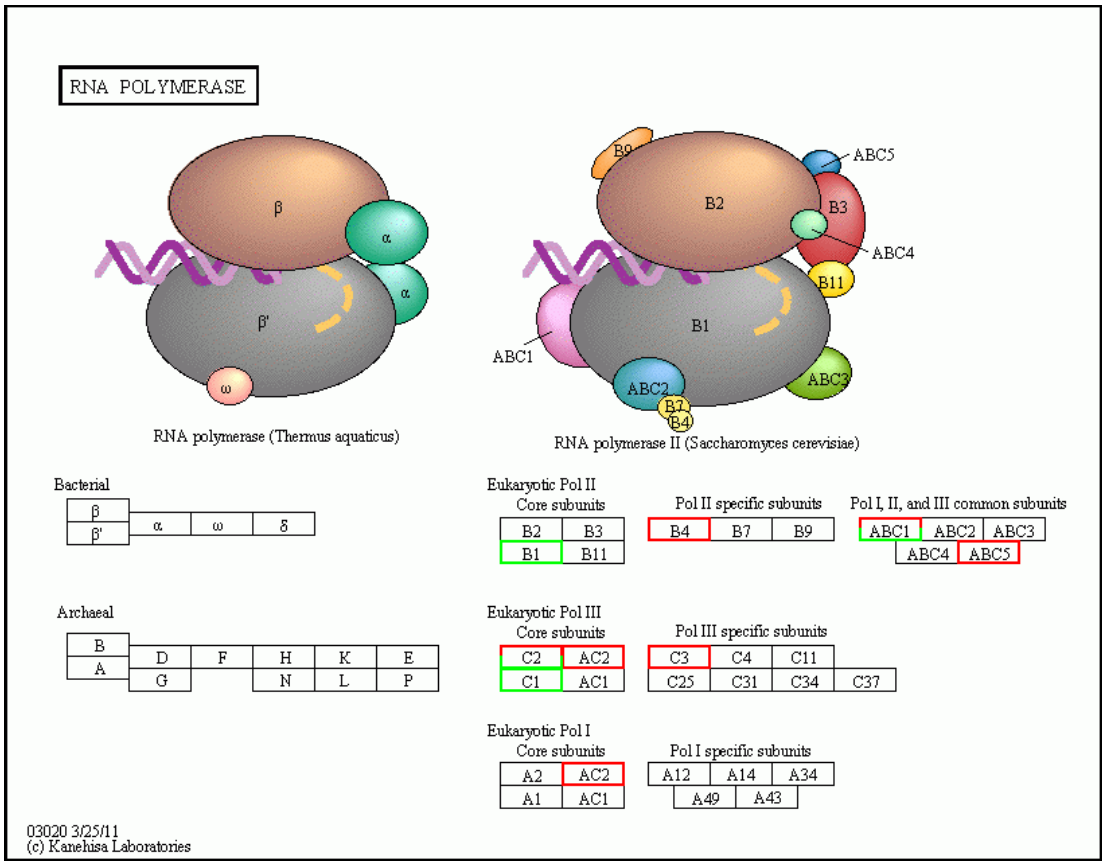

SUBERIN, LIGNIN, FLAVONOID AND CUTICULAR BIOSYNTHESIS
Dehydrodiconiferyl alcohol glucoside
Coumaroyl-CoA
Feruloyl-CoA
Caffeoyl-CoA
Caffeoyl shikimic acid
Caffeoyl quinic acid
Pterostilbene
Trans-resveratrol

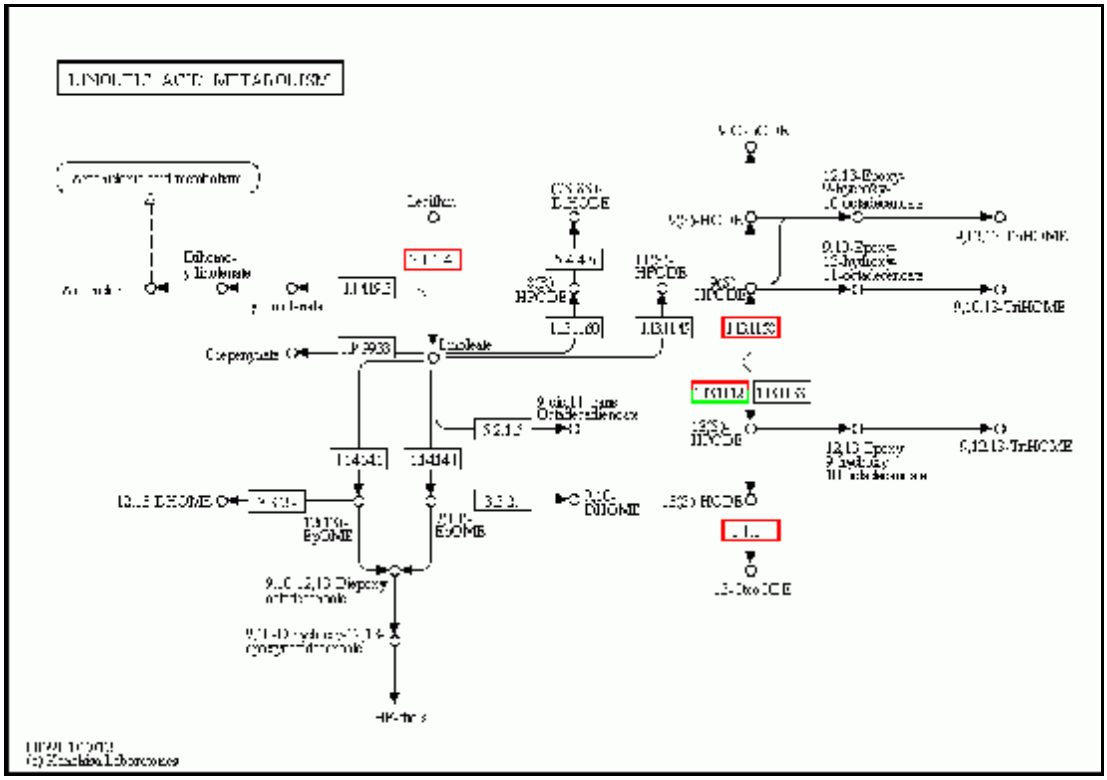


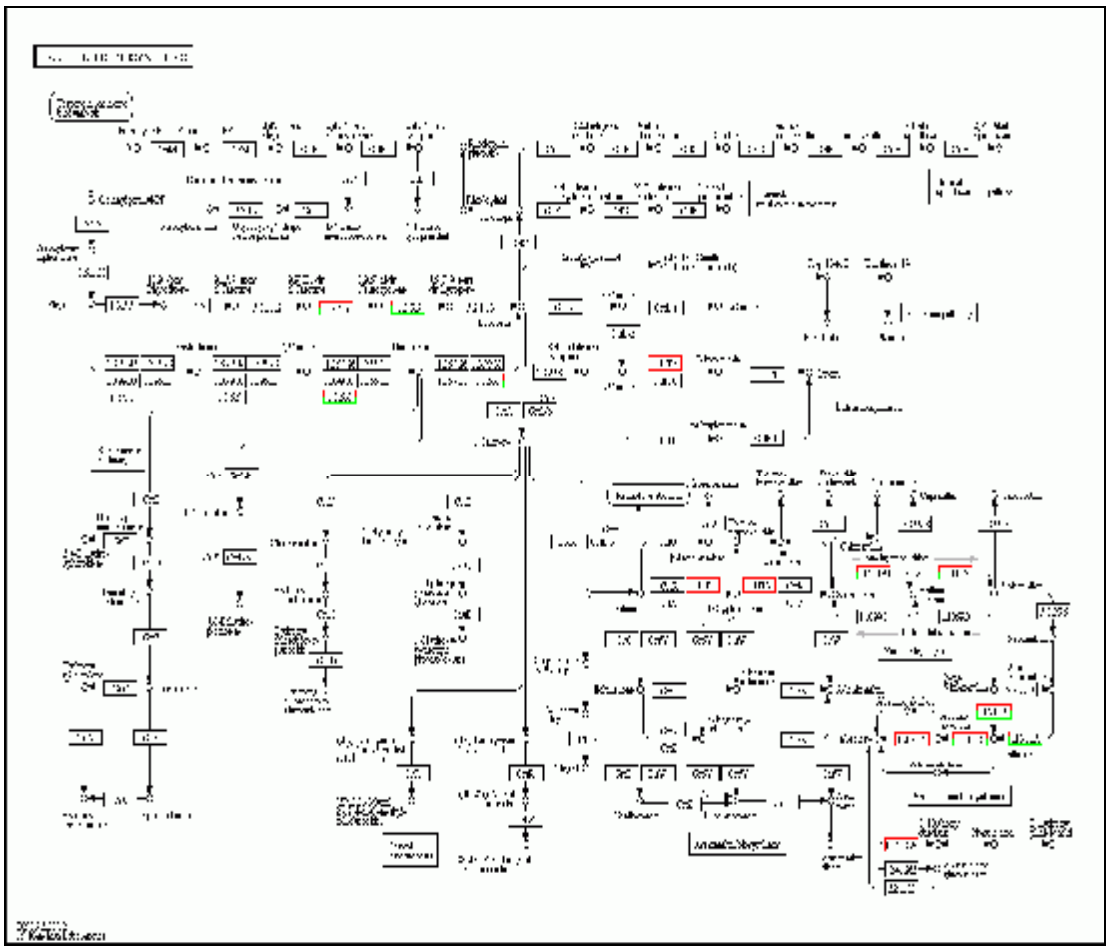


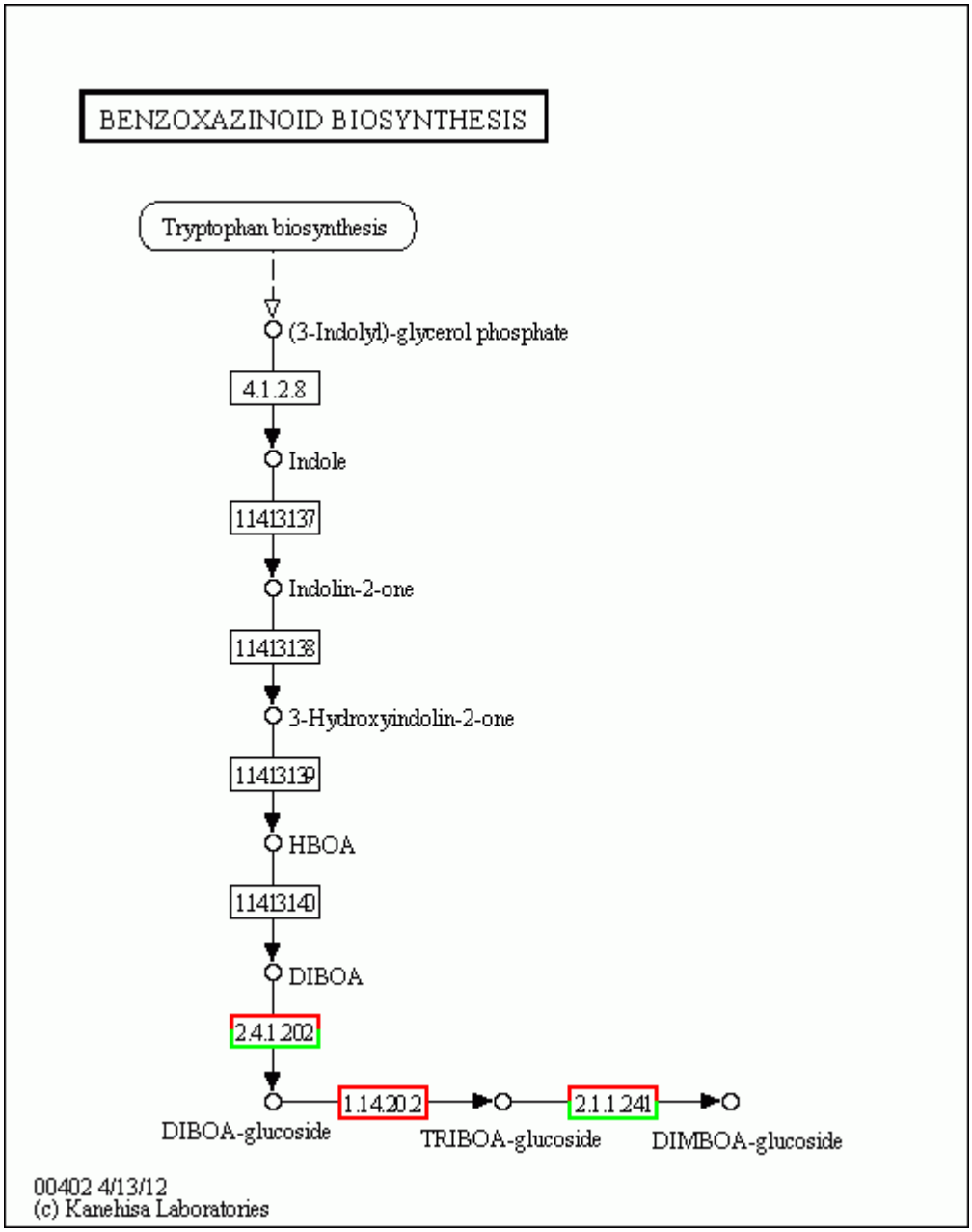





RNA POLYMERASE
β
α
α
β'
ω
RNA polymerase (Thermus aquaticus)
B9
ABC5
B2
B3
ABC4
B11
B1
ABC1
ABC2
ABC3
B7
B4
RNA polymerase II (Saccharomyces cerevisiae)
Bacterial
β
β'
α
ω
δ
Archaeal
B
A
D
F
H
K
E
G
N
L
P
Eukaryotic Pol II
Core subunits
B2
B3
B1
B11
Pol II specific subunits
B4
B7
B9
Pol I, II, and III common subunits
ABC1
ABC2
ABC3
ABC4
ABC5
Eukaryotic Pol III
Core subunits
C2
AC2
C1
AC1
Pol III specific subunits
C3
C4
C11
C25
C31
C34
C37
Eukaryotic Pol I
Core subunits
A2
AC2
A1
AC1
Pol I specific subunits
A12
A14
A34
A49
A43
03020 3/25/11
(c) Kanehisa Laboratories






BENZOXAZINOID BIOSYNTHESIS
Tryptophan biosynthesis
(3-Indolyl)-glycerol phosphate
4.1.2.8
Indole
1141313?
Indolin-2-one
1141313?
3-Hydroxyindolin-2-one
1141313?
HBOA
1141314?
DIBOA
2.4.1.202
1.14.20.2
2.1.1.241
DIBOA-glucoside
TRIBOA-glucoside
DIMBOA-glucoside
00402 4/13/12
(c) Kanehisa Laboratories

EK 3. Algerian 3. gün ve Orlando 3. gün arasında önemli çıkan yolaklarda farklı seviyelerde ifade olan genlerin listesi

No	Yolak	Farklı Seviyelerde İfade Olan Genler
1	Flavon and flavonol biyosentezi	18037490, 18034961, 18051854, 18034842, 18039464, 18034067, 18041531, 18035875, 18051856, 18037561, 18034283, 18037667, 18035677, 18050970, 18043231, 18050154, 18053376, 18035209, 18046501, 18035159, 18034982, 18052870, 18036417, 18037288, 18037750, 18049178, 18037957, 18033563, 18045386, 18050969, 18031421, 18041946, 18041945, 18035355, 18044009, 18047924, 18041695, 18049179, 18035278, 18052075, 18033522, 18046662, 18042779, 18032717, 18036008, 18039463, 18043035, 18045039, 18053393, 18035409, 18048154, 18035904, 18051852
2	Flavonoid biyosentezi	18037490, 18039381, 18034961, 18032067, 18039464, 18047155, 18034067, 18041531, 18035875, 18037561, 18044555, 18037523, 18036879, 18032287, 18043231, 18047896, 18038426, 18037588, 18053376, 18055922, 18032690, 18046030, 18036038, 18052870, 18036417, 18044554, 18049178, 18044523, 18053812, 18053176, 18033563, 18053694, 18045386, 18033386, 18038126, 18044783, 18031421, 18041946, 18041945, 18035355, 18053178, 18047480, 18044009, 18047924, 18049179, 18055676, 18035278, 18043320, 18046662, 18042779, 18041607, 18047966, 18036008, 18039463, 18043035, 18042808, 18054378, 18034881, 18035409, 18037906, 18043319, 18040146, 18048154, 18035904, 18033773
3	Sekonder metabolitlerin biyosentezi	18037490, 18050847, 18039381, 18031231, 18035477, 18032624, 18031770, 18034961, 18034050, 18052268, 18032067, 18034842, 18037323, 18039464, 18047155, 18034067, 18039876, 18041531, 18035875, 18042459, 18043258, 18033749, 18043410, 18041240, 18032333, 18037561, 18053646, 18044555, 18037523, 18037667, 18034884, 18038903, 18035870, 18046850, 18044268, 18036879, 18039746, 18050416, 18032287, 18043231, 18040648, 18037959, 18050154, 18047896, 18037752, 18031499, 18038426, 18037588, 18047387, 18047141, 18040757, 18051782, 18034358, 18053376, 18037601, 18033565, 18055922, 18042369, 18034523, 18032690, 18046501, 18036724, 18046030, 18045727, 18036038, 18050548, 18040966, 18054620, 18034599, 18033822, 18052870, 18036417, 18044554, 18046474, 18038757, 18037750, 18049178, 18036876, 18037214, 18046788, 18046306, 18053427, 18044523, 18053812, 18034004, 18045042, 18054022, 18050564, 18035333, 18040619, 18054218, 18053176, 18033723, 18044643, 18046136, 18048424, 18041601, 18050546, 18035066, 18047842, 18041678, 18033563, 18050450, 18044914, 18053694, 18046790, 18045386, 18047481, 18038754, 18033386, 18052487, 18046831, 18039980, 18038126, 18044783, 18054023, 18044644, 18034103, 18031421, 18052541, 18043998, 18052500, 18051403, 18051670, 18045694, 18041946, 18041945, 18053408, 18043147, 18032013, 18047143, 18043666, 18050645, 18051920, 18043465, 18050954, 18037213, 18031217, 18050348, 18034921, 18041277, 18035355, 18042816, 18053178, 18041608, 18042867, 18045002, 18053778, 18049026, 18038634, 18037111, 18043301, 18047480, 18044009, 18041027, 18049524, 18052964, 18045355, 18050562, 18047924, 18037191, 18036834, 18044064, 18049179, 18044798, 18043354, 18043257, 18037155, 18055676, 18044077, 18035278, 18053588, 18039754, 18038224, 18033522, 18046507, 18043320, 18046662, 18048888, 18039745, 18043347, 18036175, 18042779, 18052469, 18053409, 18032717,

		18036678, 18041607, 18031687, 18033729, 18037192, 18042980, 18047966, 18051781, 18045934, 18034359, 18036008, 18039463, 18048582, 18047846, 18043035, 18039951, 18033718, 18042394, 18052497, 18035314, 18042808, 18039168, 18054378, 18053589, 18037740, 18031530, 18045039, 18034881, 18035409, 18037906, 18033471, 18043707, 18037270, 18043319, 18040146, 18056049, 18055420, 18033470, 18042520, 18055558, 18048154, 18044657, 18045262, 18055821, 18039663, 18035904, 18049650, 18043663, 18054054, 18048027, 18033773, 18031502, 18043706, 18039079, 18044580
4	Stilbenoid, diarylheptanoid ve gingerol biyosentezi	18039381, 18034961, 18051854, 18034842, 18039464, 18034067, 18041531, 18051856, 18037561, 18044555, 18043231, 18038426, 18047387, 18055922, 18046030, 18036038, 18054620, 18044554, 18049178, 18046306, 18044523, 18053812, 18033563, 18045386, 18033386, 18038126, 18044783, 18031421, 18045694, 18041946, 18041945, 18035355, 18044009, 18047924, 18049179, 18055676, 18035278, 18033522, 18043320, 18046662, 18042779, 18032717, 18031687, 18045934, 18039463, 18043035, 18033718, 18053393, 18035409, 18037906, 18043319, 18040146, 18033470, 18033773, 18051852, 18044580
5	Bitki-patojen interaksiyonu	18036535, 18047281, 18048543, 18039594, 18036310, 18037170, 18047288, 18037771, 18037639, 18033771, 18036755, 18034502, 18044906, 18031465, 18035984, 18033982, 18037654, 18054703, 18052873, 18036475, 18044041, 18048337, 18037177, 18036486, 18043814, 18054174, 18037240, 18036251, 18041819, 18055261, 18040989, 18054768, 18035985, 18040301, 18032103, 18043604, 18052519, 18041223, 18049059, 18053194, 18034093, 18051568, 18049519, 18055749, 18038669, 18038290, 18052066, 18034494, 18036451, 18048022, 18036868, 18034075, 18041395, 18035929, 18053740, 18036557, 18037188, 18054202, 18038707, 18040212, 18046749, 18053973, 18047753, 18038011, 18049853, 18034915, 18053080, 18048204, 18053888, 18036830, 18048459, 18055004, 18040845, 18040004, 18036888, 18035049, 18044594, 18040658, 18042322, 18040690, 18053061, 18053060, 18048524, 18049127, 18042991, 18047071, 18055236, 18050039, 18049659, 18048142, 18049378, 18055098, 18046492, 18034696, 18049098, 18031304, 18053141, 18048466, 18046446, 18036897, 18040074, 18053618, 18053062, 18040758, 18038112, 18053219, 18054444, 18040767, 18033900, 18041562, 18042757, 18040194, 18047677, 18053058, 18044296, 18048462, 18040970, 18047673, 18046142, 18046139, 18043058, 18047284, 18046143, 18042178, 18042474, 18036641, 18053616, 18046488, 18033006, 18040969, 18048213, 18047119, 18050362, 18042993, 18039322, 18047286, 18042605, 18047885, 18043057, 18040765, 18042752, 18038935, 18041799, 18036406, 18055146, 18054407, 18042742, 18041534, 18053613, 18047102, 18049443, 18033255, 18045123, 18044855, 18041461, 18047098, 18050436, 18036423, 18046106, 18046249, 18049451, 18037266, 18042864, 18050360, 18033869, 18045973, 18051451, 18048211, 18052710, 18044856, 18040756, 18039119, 18051202, 18040679, 18040304, 18048214, 18042657, 18055839, 18041919, 18039120, 18047675, 18040996, 18053155, 18040961, 18049959, 18036056, 18036229, 18052439, 18050504, 18046679, 18052091, 18046231, 18035872, 18053622
6	Metabolik yolaklar	18037490, 18050847, 18031231, 18035477, 18032624, 18034197, 18031770, 18034961, 18034050, 18032067, 18034842, 18048543,

		18045512, 18037323, 18039464, 18047155, 18034067, 18039876, 18041531, 18040383, 18047288, 18035875, 18042459, 18043258, 18033749, 18043410, 18041240, 18032333, 18037561, 18036700, 18036733, 18037523, 18037667, 18034884, 18051746, 18038903, 18032632, 18035870, 18043195, 18046850, 18044268, 18036879, 18050416, 18032294, 18032287, 18043231, 18040648, 18037959, 18050154, 18047896, 18037752, 18031499, 18038426, 18037588, 18047387, 18053046, 18047141, 18040757, 18051030, 18034358, 18053376, 18037601, 18033565, 18044123, 18034523, 18032690, 18046501, 18036724, 18050548, 18053261, 18038321, 18039998, 18040966, 18054620, 18047168, 18047684, 18034599, 18033822, 18039093, 18036723, 18052478, 18052870, 18036417, 18046474, 18038757, 18037750, 18049178, 18053263, 18037214, 18040919, 18046306, 18054542, 18040524, 18053427, 18033024, 18043691, 18043099, 18042327, 18034004, 18048536, 18043264, 18045042, 18054022, 18035333, 18044062, 18052310, 18040619, 18054218, 18053206, 18053176, 18033723, 18044643, 18046136, 18048424, 18052262, 18041601, 18050546, 18035066, 18044086, 18047321, 18041395, 18035614, 18051023, 18041678, 18033563, 18032946, 18050450, 18055610, 18053694, 18045386, 18038754, 18033386, 18052487, 18046831, 18042626, 18039980, 18034155, 18044443, 18047215, 18054023, 18038142, 18037532, 18044644, 18046154, 18034103, 18031421, 18052541, 18043998, 18045881, 18052500, 18054115, 18047753, 18051403, 18051670, 18045694, 18041946, 18041945, 18053408, 18043147, 18049887, 18048573, 18032013, 18049304, 18036530, 18047143, 18043666, 18050645, 18051920, 18038188, 18043465, 18050954, 18037213, 18049472, 18053722, 18031217, 18055702, 18044829, 18041277, 18035355, 18045318, 18042816, 18055621, 18053178, 18041608, 18042867, 18054194, 18053778, 18038762, 18051745, 18046694, 18049026, 18036620, 18038634, 18037448, 18040833, 18037111, 18034606, 18043301, 18032691, 18047480, 18053483, 18034584, 18044009, 18041027, 18045998, 18044029, 18054392, 18052964, 18045355, 18053259, 18050368, 18033020, 18050208, 18047449, 18047924, 18050938, 18051409, 18037191, 18044064, 18034789, 18049179, 18044798, 18043354, 18039709, 18043257, 18037155, 18055676, 18045615, 18034758, 18035608, 18055038, 18051953, 18035278, 18051006, 18053588, 18049663, 18039754, 18038224, 18033522, 18046507, 18042955, 18046662, 18048888, 18043347, 18053047, 18055236, 18050039, 18042779, 18052469, 18038062, 18053409, 18032717, 18036678, 18039490, 18041607, 18049378, 18031687, 18046492, 18033729, 18053048, 18037192, 18053141, 18042980, 18046446, 18050607, 18037797, 18034941, 18047966, 18045934, 18034359, 18036008, 18039463, 18043337, 18050790, 18048582, 18036802, 18043035, 18047673, 18046139, 18055805, 18046143, 18039951, 18049207, 18033718, 18036547, 18050123, 18042394, 18052497, 18046488, 18048772, 18042808, 18039168, 18054378, 18053589, 18031530, 18044452, 18045039, 18034930, 18050333, 18041534, 18035409, 18033471, 18035943, 18046249, 18046716, 18034019, 18053050, 18032032, 18047709, 18040516, 18041439, 18036843, 18055801, 18055420, 18042673, 18033470, 18047568, 18050693, 18042520, 18055558, 18035044, 18044657, 18033689, 18055821, 18033339, 18048983, 18037996, 18035874, 18039663, 18035904, 18049650, 18036346, 18046679, 18037093, 18043663, 18054054, 18055137, 18055590, 18031502, 18043706, 18042511, 18039079,

		18044580
7	ABC taşıyıcıları	18045900, 18035829, 18040989, 18044764, 18035982, 18034762, 18038685, 18036425, 18038353, 18038557, 18041872, 18053080, 18055524, 18033331, 18031296, 18039350, 18036118, 18041642, 18039322, 18035983, 18047343, 18039076, 18039803, 18054060, 18033021, 18035994, 18035967, 18036098, 18049805, 18042477
8	Fenilpropanoid biyosentezi	18037490, 18039381, 18034842, 18033749, 18037561, 18044555, 18037667, 18050154, 18038426, 18033565, 18055922, 18046501, 18046030, 18036038, 18040966, 18033822, 18044554, 18037750, 18037214, 18044523, 18053812, 18035333, 18054218, 18050450, 18033386, 18038126, 18044783, 18052500, 18037213, 18041277, 18041608, 18049026, 18037155, 18055676, 18033522, 18043320, 18032717, 18036678, 18042980, 18036008, 18039463, 18037076, 18052497, 18037740, 18045039, 18037906, 18043319, 18040146, 18042520, 18044657, 18037215, 18035904, 18033773
9	Limonen ve pinen degradasyonu	18034961, 18039464, 18034067, 18041531, 18037561, 18043231, 18047387, 18054620, 18049178, 18046306, 18033563, 18045386, 18033386, 18031421, 18043998, 18045694, 18041946, 18041945, 18035355, 18044009, 18047924, 18049179, 18035278, 18046662, 18042779, 18031687, 18045934, 18039463, 18043035, 18033718, 18035409, 18056049, 18033470, 18044580
10	RNA polimeraz	18048543, 18045512, 18047288, 18048536, 18041395, 18051023, 18044443, 18047753, 18036620, 18032691, 18034789, 18055236, 18050039, 18049378, 18046492, 18053141, 18046446, 18047673, 18046139, 18046143, 18050123, 18046488, 18048772, 18041534, 18046249, 18050693, 18033339, 18046679
11	Linoleik asid metabolizması	18031770, 18053046, 18055610, 18046831, 18031493, 18053047, 18053048, 18053050
12	Karotenoid biyosentezi	18031231, 18037323, 18036716, 18041240, 18035870, 18031499, 18039758, 18040757, 18037601, 18034599, 18045042, 18033641, 18035066, 18038441, 18042041, 18038754, 18045507, 18034103, 18051403, 18053408, 18043465, 18038224, 18046507, 18053409, 18039951, 18049650, 18054054
13	Benzoxazinoid biyosentezi	18035477, 18051854, 18032067, 18034842, 18051856, 18047896, 18042369, 18036876, 18033522, 18039745, 18032717, 18035314, 18053393, 18051852
14	Zeatin biyosentezi	18035477, 18039876, 18034283, 18035677, 18050970, 18039746, 18035209, 18042369, 18035159, 18034982, 18037288, 18038757, 18036876, 18037957, 18050969, 18043666, 18041695, 18052075, 18039745, 18035314, 18037740, 18043663