

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BADEM (*Amygdalus spp.*) GEN KAYNAKLARININ ÇİÇEKLENME
ZAMANI VE SOĞUĞA TOLERANSI AÇISINDAN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Başak ÖZDEMİR

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BADEM GEN KAYNAKLARININ (*Amygdalus spp.*) ÇİÇEKLENME ZAMANI VE SOĞUĞA TOLERANSI AÇISINDAN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE KARŞILAŞTIRILMASI

Başak ÖZDEMİR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatma Yeşim OKAY

Ilıman iklim meyve türlerinden olan badem (*Prunus dulcis*) yetiştiriciliğinde ilkbahar geç donları üretimi kısıtlayan ve türün yetiştirilme ekolojisini belirleyen stres koşullarının başında gelmektedir. Bitkilerde soğuğa tolerans konusundaki seleksiyonlar çoğunlukla fenolojik gözlemlere dayandırılmaktadır. Türe ait çeşitlerde genetik varyasyon düşük olmakla birlikte toleransta da farklılıklar görülmekte, bunun temelinde ise bireyler arası genetik mekanizma farklılığı rol oynamaktadır. Bu nedenle seleksiyonda fenolojik gözlemler, toleranstan sorumlu genlerin işlevine (ifadesine) dayalı bulgularla desteklenmektedir.

Bu tezde yerli ve yabancı badem tür, çeşit ve selekte edilen tiplerin geç çiçeklenme - soğuğa tolerans açısından değerlendirilmesi konu edinilmiş, toplam 43 materyalde ifade markıra dayalı seleksiyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bitkisel materyalde, çiçeklenme zamanına yönelik tomurcuktan çiçeğe geçiş dönemindeki dokularda (pembe tomurcuk, yaprak) MAS (Marker Assisted Selection) ve Real time PCR'a dayalı gen ifadesi analizleri (*FT* ve *SOCl* genlerinde) kullanılmış, soğuk toleransına yönelik araştırmalar ise yine gen ifadesi (*CBF1* ve *CBF2* genlerinde) analizleri ile pembe tomurcuk döneminde soğuk uygulanmış dokular (pembe tomurcuk) kullanılarak yürütülmüştür.

Tezde kullanılan toplam 43 genotipten 29 genotipte geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili olduğu bildirilen OPK10 RAPD primerine ait bant profili görülmüştür. Bu genotipler arasında geç çiçeklendiği bilinen 14 adet çeşidin 9 adedinde OPK10 primerine ait bant gözlemlenmiştir. SSR markırlar açısından ise; CPPCT008 markırında % 69.77, EPCU2584 markırında % 58.14, UDP06003 markırında % 32.56 ve BPPCT035 markırında % 4.65 oranlarında geç çiçeklenmeyle ilişkili olduğunu gösteren heterozigot allelik belirlenmiştir. CPPCT008 ve EPCU2584 markırlarının geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili olduğu ve bu primerlerin etkin ayırım gücüne sahip olduğu kanıtlanmıştır. Gen ifadesi açısından değerlendirildiğinde, *PpFT* geninin ifade artışı genotiplerin % 69.77'sinde görülürken, genotiplerin % 16.28'inde ifade azalışı belirlenmiştir. *PabSOCl* geninin ifade artışı genotiplerin % 62.79'unda, ifade azalışı ise genotiplerin % 23.26'sında görülmüştür. Çiçeklenmenin başladığı dönemde alınan örneklerde gen ifade artışının görülmesi literatürde verilen yolaklarla uyumlu bulunmuştur.

Soğuk uygulamasıyla ilişkili olarak; *PdCBF1* geninin ifade artışı genotiplerin % 37.21'inde görülürken, genotiplerin % 30.23'ünde ifade azalışı belirlenmiştir. *PdCBF2* geninin ifade artışı genotiplerin % 30.23'ünde, ifade azalışı ise genotiplerin % 44.19'unda belirlenmiştir.

Şubat 2021, 263 sayfa

Anahtar kelimeler: Badem, çiçeklenme zamanı, ilkbahar geç donu, gen ifadesi, Real time PCR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

COMPARISON OF ALMOND (*Amygdalus spp.*) GERMPLASMS FOR FLOWERING TIME AND COLD TOLERANCE BASED ON GENE EXPRESSION ANALYSIS

Başak ÖZDEMİR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Fatma Yeşim OKAY

Late spring frosts are one of the stress conditions that restrict production and determine the ecology of the species cultivation of almond (*Prunus dulcis*) which is one of the temperate climate fruit species.. Selection of cold resistant plants is mostly based on phenological observations. Although genetic variation is low in varieties belonging to the species, there are also differences in tolerance, and this is based on the genetic differences between individuals.. Therefore, phenological observations during selection are supported by findings based on the function of the genes responsible for tolerance.

In this thesis, the evaluation of local and foreign almond species, varieties and selected species in terms of late flowering- and cold tolerance was performed. For this purpose MAS (Marker Assisted Selection) was performed in 43 genotypes. Real time PCR-based gene expression analysis (with genes *FT* and *SOCl*) was used in the tissues (pink bud, leaf) from bud to flower transition period towards flowering time and cold tolerance studies were carried out by using gene expression (with genes *CBF1* and *CBF2*) and cold treated tissues (pink bud) during the pink bud period.

The band profile of the OPK10 RAPD primer, which was reported to be associated with late flowering was observed in 29 genotypes from a total of 43 genotypes used in the thesis,. Among these genotypes, OPK10 primer band was observed in 9 of 14 varieties known to have late flowering. In terms of SSR markers, heterozygous alleles were determined at the rate of 69.77% for the marker CPPCT008, 58.14% for the EPCU2584 marker, 32.56% for the UDP06003 marker and 4.65% for the BPPCT035 marker. It has been proven that the markers CPPCT008 and EPCU2584 are associated with late flowering characteristic and that these primers have effective discrimination. When evaluated in terms of gene expression, the expression increase of the *PpFT* gene was seen in 69.77% of the genotypes, while a decrease in the expression was determined in 16.28% of the genotypes. The increased expression of the *PabSOCl* gene was observed in 62.79% of the genotypes and the decreased expression was observed in 23.26% of the genotypes. The increase in gene expression in samples taken at the beginning of flowering was consistent with the pathways given in the literature.

Regarding the cold application, while the expression increase of the *PdCBF1* gene was observed in 37.21% of the genotypes, a decrease in the expression was determined in 30.23% of the genotypes. The expression increase of the *PdCBF2* gene was determined in 30.23% of the genotypes and the decrease in the expression was determined in 44.19% of the genotypes.

February 2021, 263 pages

Key Words: Almond, flowering time, cold tolerance, gene expression, Real time PCR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkmasında ilk adımı birlikte attığımız, akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de fikirleriyle beni yönlendiren ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Fatma Yeşim OKAY'a (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi),

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, araştırmamın planlama ve uygulama aşamalarında başından sonuna kadar beni bilgisiyle ve tecrübesiyle yönlendiren çok değerli eş danışman hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi),

Önerileriyle çalışmama katkı sağlayan değerli Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ve Prof. Dr. Veli ERDOĞAN'a (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi),

İçten önerileri ile tezime katkılarda bulunan Prof. Dr. Gölge SARIKAMIŞ hocama (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi), çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Canan YÜKSEL ÖZMEN'e ve Dr. Umut KİBAR'a, mesleki yaşamım ve tez çalışmam süresince bana gösterdikleri sevgi, saygı ve arkadaşlık için tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Beni karşılıksız seven aileme, hayatıma girdiği ilk günden beri bu uzun ve zorlu süreçte sabırla yanımda olan sevgili eşim Cihan ÖZDEMİR'e, bu süreci sonlandırırken yaşadığım tüm duyguları her nefesimde hissedenden biricik kızım Nisan ÖZDEMİR'e,

en içten duygularıyla teşekkür ediyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Başak ÖZDEMİR
Ankara, Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	11
2.1 Moleküler Markırlar ve Kullanım Alanları.....	11
2.2 Bademde Yürütülen Moleküler Çalışmalar.....	18
2.3 Bitkilerde Çiçeklenme Zamanı ve Fizyolojik Esasları.....	23
2.3.1 Bademde çiçeklenme özellikleri ve zamanı.....	25
2.4 Çiçeklenme Zamanının Genetik Kontrolü.....	33
2.5 Çiçeklenme Zamanına Dışsal Faktörlerin Etkileri.....	41
2.5.1 Gün uzunluğunun çiçeklenme zamanına etkisi.....	43
2.5.2 Beslenmenin çiçeklenmeye etkisi.....	44
2.5.3 Düşük sıcaklığın çiçeklenme zamanına etkisi.....	45
2.5.4 Ortam sıcaklığının çiçeklenmeye etkisi.....	45
2.5.5 Kuraklık stresinin çiçeklenmeye etkisi.....	46
2.5.6 Tuzluluk stresinin çiçeklenmeye etkisi.....	46
2.5.7 Dış kaynaklı hormonların çiçeklenmeye etkisi.....	47
2.5.8 Dış kaynaklı kimyasalların çiçeklenmeye etkisi.....	48
2.5.9 Biotik stresin çiçeklenme zamanına etkisi.....	49
2.6 Çiçeklenme Zamanına İçsel Faktörlerin Etkileri.....	50
2.6.1 Otonom (kendi kendini yöneten) yolağının çiçeklenmeye etkisi.....	50
2.6.2 MicroRNA'lar ve çiçeklenme zamanının düzenlenmesi.....	50
2.7 Bitkilerde Soğuk Stresi ve Soğuğa Toleransın Fizyolojik Esasları.....	52
2.7.1 Bademin soğuğa tolerans özellikleri.....	58
2.8 Soğuğa Toleransın Genetik Kontrolü.....	60
2.8.1 Bitkisel hormonların soğuğa toleransa etkisi.....	65
2.8.1.1 ABA-bağımlı soğuğa tolerans yolağı.....	66
2.8.2 ICE-CBF-COR yolağı.....	68
2.8.3 CBF transkripsiyon faktörü.....	69
2.8.4 Soğuğa toleransın öncüsü: ICE faktörü.....	71
2.8.4.1 ICE-CBF-COR yolağında hormon düzenlemesi.....	75
2.8.4.1.1 Brassinosteroidler (BR).....	75
2.8.4.1.2 Gibberellik asit, jasmonatlar ve salisilik Asit.....	76
2.8.4.1.3 Etilen.....	77
2.8.4.1.4 Oksin.....	77
2.8.4.1.5 Sitokinin.....	78
2.8.4.1.6 Melatonin.....	78
2.8.4.2 ICE-CBF-COR yolağında günlük saat düzenlemesi (Circadian clock).....	79
2.8.4.3 ICE-CBF-COR yolağında ışık sinyal düzenlemesi.....	80

2.8.5 Soğuğa toleransla ilişkili diğer transkripsiyon faktörleri	81
2.8.5.1 HOS1 (High expression of osmotically responsive gene 1).....	84
2.8.5.2 CAMTA (Calmodulin bağlı transkripsiyon aktivitörleri)	85
2.8.5.3 MYB15 ve MYB14	85
2.8.5.4 HHP (Heptahelical transmembrane protein)	86
2.9 Real Time PCR (qRT-PCR) (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)	86
2.9.1 Real Time PCR çalışmalarında kontrol (Housekeeping) genleri	88
2.9.2 Real Time PCR çalışmalarında erime eğrisi (Melting curve)	89
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	90
3.1 Materyal	90
3.1.1 Yerli çeşitler	91
3.1.2 Yabancı çeşitler	92
3.1.3 Yabancı badem türleri	95
3.1.3.1 <i>Amygdalus arabica</i> Oliver	95
3.1.3.2 <i>Amygdalus orientalis</i> Mill.	95
3.1.3.3 <i>Amygdalus webbii</i> Spach.	97
3.1.4 Geç çiçeklenme özelliği gözlenen seleksiyon materyalleri.....	98
3.2 Yöntem	103
3.2.1 Örnek alımı ve bitki yetiştirme	103
3.2.2 Çiçeklenme zamanı örnekleme	107
3.2.3 Soğuk stresi örnekleme ve uygulaması	111
3.2.4 Geç çiçeklenmeye yönelik MAS (Markır Assisted Selection-Markıra Dayalı Seleksiyon) markır uygulamaları	113
3.2.4.1 DNA izolasyonu	114
3.2.4.2 PCR reaksiyonlarının hazırlanması ve PCR.....	115
3.2.4.3 RAPD markırı.....	116
3.2.4.4 Kapilleri elektroforez ve allel görüntülerinin alınması	117
3.2.4.4.1 SSR markırları	118
3.2.4.5 Gen ifade analizleri	120
3.2.4.5.1 Örnek ezimi	120
3.2.4.5.2 RNA izolasyonu.....	120
3.2.4.5.3 Real Time PCR uygulamaları.....	122
3.2.4.5.3.1 Kullanılan aday genlere ve primerlere ait bilgiler	123
3.2.4.5.3.2 Homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) PCR'da çoğaltılması	123
3.2.4.5.3.3 PCR reaksiyonu sonrası homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) agaroz jel elektroforezi	124
3.2.4.5.3.4 PCR ürünlerinin pürifikasyonu.....	125
3.2.4.5.3.5 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real Time PCR primerlerinin oluşturulması	125
3.2.4.5.3.6 Real Time PCR reaksiyonları	126
3.2.4.5.3.6.1 cDNA sentezi.....	126
3.2.4.5.3.7 Real Time reaksiyonlarına ait primer optimizasyonu ve standart eğrilerin oluşturulması	127
3.2.4.5.3.8 Örneklerin qRT-PCR cihazında yürütülmesi	129
3.2.4.5.3.9 Elde edilen Real Time verilerine ait istatistik analizleri.....	130
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	131
4.1 DNA izolasyonu.....	131

4.2 RAPD markırına ait PCR reaksiyonu	133
4.3 SSR lokuslarının PCR reaksiyonu ve allel görüntülerinin alınması	135
4.3.1 SSR lokusların genetik analizleri.....	141
4.4 RNA izolasyonu	143
4.4.1 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin kontrol örneklerinde RNA izolasyonu.....	144
4.4.2 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin stres örneklerinde RNA izolasyonu	149
4.4.3 Soğuğa tolerans uygulamasına ilişkin RNA izolasyonu.....	154
4.4.3.1 Referans çeşitlerin RNA izolasyonu	154
4.4.3.2 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan örneklerinin RNA izolasyonu.....	159
4.5 cDNAsentezi	164
4.5.1 Geç çiçeklenme değerlendirmesi kontrol örneklerinde cDNA sentezi	164
4.5.2 Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerinde cDNA sentezi	167
4.5.3 Soğuğa tolerans uygulamasına ilişkin cDNA sentezi	169
4.6 Real Time PCR Uygulamaları	174
4.6.1 Aday genlere oluşturulacak primerler	174
4.6.2 Kullanılan primerler	174
4.6.3 Homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) PCR'da çoğaltılması	175
4.6.4 PCR reaksiyonu sonrası homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) agaroz jel elektroforezi	176
4.6.5 PCR ürünlerinin pürifikasyonu	177
4.6.6 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real Time PCR primerlerinin oluşturulması	179
4.6.7 Gen ifade analizleri için her bir gen bölgesine ait standart eğrinin çizilmesi	181
4.6.8 Amplifikasyon eğrisi	183
4.6.9 Erime eğrisi (Melting curve)	186
4.6.10 Real Time PCR Verileri	187
4.6.11 Real Time PCR verilerin relatif ifade analizleri	195
4.6.11.1 Geç çiçeklenme örneklerinde <i>PpFT</i> gen ifadesi	197
4.6.11.2 Geç çiçeklenme örneklerinde <i>PabSOC1</i> gen ifadesi	199
4.6.11.3 Soğuk uygulaması örneklerinde <i>PdCBF1</i> gen ifadesi	202
4.6.11.4 Soğuk uygulaması örneklerinde <i>PdCBF2</i> gen ifadesi	205
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	209
5.1 Geç Çiçeklenme Özelliği Açısından Sonuçların Değerlendirilmesi.....	209
5.1.1 RAPD markır analizleri açısından değerlendirme	209
5.1.2 SSR markır analizleri açısından değerlendirme	210
5.1.3 Gen ifadesi açısından değerlendirme	212
5.2 Soğuğa Tolerans Özelliği Açısından Sonuçların Değerlendirilmesi	220
5.2.1 Gen ifadesi açısından değerlendirme	220
KAYNAKLAR	224
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat
CK	Sitokinin
CMLs	Cam-Like
Ct	Cycle Threshold
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır Sülfat Pentahidrat
CO_2	Karbondioksit
g	Gram
GalL	Galaktono- γ -lakton
HCl	Hidroklorik Asit
H_3BO_3	Borik Asit
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl_2	Magnezyum Klorid
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram
nm	Nanometer
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH_4Mo	Amonyum Molibdat
ppm	Milyonda Bir Kısım
pmol	Pikomol
rpm	Dakikada Devir
SMZ	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
SNZ	AP2-Like Ethylene-Responsive Transcription Factor
Tm	Erime Sıcaklığı
ZnSO_4	Çinko Sülfat

Kısaltmalar

AA	Askorbik Asit
ABA	Absizik Asit
ABF	ABRE-Binding Factor (ABRE-Bağlayan Faktör)
ABRE	ABA-Responsive Element (ABA-Sorumlu Element)
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
AG	MAD-box geni
AHK	Arabidopsis Histidin Kinaz
ANK	Ankyrin Tekrar Proteini
ANOVA	Varyans Analizi
AP1	Aktivatör Protein 1
AP2	APETALA 2
AP2/EREBD	APETALA2/Ethylene-Responsive Element Binding Factor (Etilen Duyarlı Faktör)
APETALA1	Arabidopsis Floral Homeotic Gene
BIN2	Brassinosteroid Incentive 2 (Brassinosteroid Teşvik Edici)
Bplti 36	36kD geni
BR	Brassinosteroid
BSA	Bulked Segregant Analysis (Toplu Segredant Analizi)
BRZ	Brassinazole Resistant (Brassinazol Dayanımlı)
bç	Baz Çifti
bZIP	Basic Leucine Zipper (Temel Lösün Fermuarı)
CAMTA	Calmodulin Bağlı Transkripsiyon Aktivitörleri
CaG-box	Serum Sorumlu Element
CES/HAF	Brassinosteroid Biyosentezinin Düzenleyicisi/ a bHLH-kodlayan transkripsiyon faktörü
cDNA	Komplementer DNA (Tamamlayıcı DNA)
CBF	C-Repeat Binding Factor (C-Tekrar Bağlanma Faktörleri)
CDPKs	Kalsiyum Bağımlı Protein Kinaz
CIPKs	CBL-Etkileşimli Protein Kinaz
CO	Constans
COR	Cold Regulated Genes (Soğuk Düzenleyen Genler)
CRT/DRE	C tekrarlı /Dehidrasyon sorumlu element
CRY2	Cryptochromes 2
CU	Chill Unit (Soğuk Birimi)
Ct	Cycle Thresold
DAM	Dormancy-associated MADS-box (Dormansiyle İlişkili Gen)
DHN1	Dehidrin 1
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
RE/CRT	Dehidrasyona Cevap Veren Bağlı Faktörler
DELLA	Gibberellin Sinyalinin Düzenleyicisi
DREBs	Dehidrasyon Duyarlı Element Bağlama
EDS1	Hastalık Durumu Geliştiren 1
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EKE1	Fotoreseptör

EKF1	Extended Kalman Filter 1 (Genişletilmiş Kalman Süzgeci)
EIN3	Etilen Insensitive 3
ERF	Etilen Response Factor (Etilen Cevap Faktörü)
EVG	Evergrowing (Sürekli gelişen)
FAC	Florigen Aktivasyon Kompleksi
FD	Florigen Etkileşimli bZIP Transkripsiyon Faktörü
FCA	Flowering Control Locus A (Çiçeklenme Kontrol Lokusu)
FLC	Flowering Locus C (Çiçeklenme Lokusu C)
FLD	Flowering Locus D (Çiçeklenme Lokusu D)
FPA	Çiçeklenme Zamanını Düzenleyen Gen
FRI	Çiçeklenme Zamanını Düzenleyen Gen
FT	Flowering Locus T (Çiçeklenme Lokusu T)
FVE	Otonom Yolak Geni
FY	RNA 3' End-Processing Factor
GA	Gibberellik Asit
gal-3	Galectin-3
GDH	Growing Degree Hours (Büyüme Derecesi)
GSH	Antioksidan Glutasyon
GUS	B-Glukuronidaz
HHP	Heptahelical Transmembrane Protein
HOS1	High Expression of Osmotically Responsive Genes 1
ICE1	Inducer of CBF Expression 1
JA	Jasmonik Asit
JAZ	Jasmonate ZIM-Domain
KH ₂ PO ₄	Potasyum Sülfat
K ₂ SO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
Lb	Late blooming (Geç Çiçeklenme Geni)
LD	Long day (Uzun gün)
LEA	Late Embryogenesis Abundant (Geç Emriyojenez Proteini)
LEAFY	Floral Meristem Identity Gene
LHCII	Light Harvesting Complex II
LT	Low Temperature (Düşük Sıcaklık)
LTRE	Low Temperature Responsive Element (Düşük Sıcaklık Sorumlu Element)
MADS-box	Minichromosome Maintenance1, Agamous, Deficiens and Serum Response Factor
MAS	Markıra Dayalı Seleksiyon
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MKK2	MAP Kinase Kinase2
MYB-MYC	Hücre Döngüsü Girişinin ve Proliferatif Metabolizmanın Ana Düzenleyicisi
NAA	Naftalenasetik Asit
OST1	Open Stomata 1
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PdDHN1	<i>Prunus dulcis</i> Dehidrin Geni
PHYA	Fitokrom A
PP2C	Protein Fosfataz 2C

PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
QTL	Quantitative Trait Locus (Kantitatif Karakter Lokusu)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA)
RD29A	Low-temperature-induced 78 kDa protein
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SA	Salisilik Asit
S.D.	Serbestlik Derecesi
SIICE1	<i>Solanum lycopersicum</i> ICE1 geni
SIZ1	Tuz Uyarımlı Zinc Finger Protein 1
SMZ	Işık Sinyal Yolağında SCHLAFMÜTZE geni
SNZ	Işık Sinyal Yolağında SCHNARCHZAPFEN geni
SnRK	Serine/Threonine Kinase
SPL	Squamosa Promoter-Binding-Like Protein
SOC1	Suppressor of Overexpression of Co 1 (CO1 over ekspresyonu baskılayıcı)
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SVP	Short Vegetative Phase (Kısa Vejetatif Faz)
SYBR	Syber Green
TF	Transkripsiyon Faktörü
TFL	Terminal Flowering Locus (Terminal Çiçeklenme Lokusu)
TOE	Target of Eat1 (Eat 1 geni hedefi)
WRKY21	DNA Bağlayıcı Protein 21
36kD	Antifreeze protein gene

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 İlk badem plantasyonunun lokasyonları ve M.Ö 500'e ait Pers İmparatorluğunun haritası.....	2
Şekil 1.2 Eski ticari rotaların ve <i>Euamygdalus</i> alt türünün yabancı badem türlerinin Avrasya dağılımının fiziksel haritası	3
Şekil 1.3 Dünya badem üretim alanı (ha).....	5
Şekil 1.4 Dünya badem üretim miktarı (ton)	5
Şekil 2.1 Tomurcuk dinlenmesinin kırılması ve çiçeklenme	24
Şekil 2.2 Bademin yıllık gelişim safhaları	26
Şekil 2.3 Arabidopsiste çiçeklenme zamanı yolağında rol oynayan temel genler	35
Şekil 2.4 Çiçeklenme zamanı kontrolünün Arabidopsis (a) ve Tahıllarda (b) karşılaştırılması.....	36
Şekil 2.5 Arabidopsiste mikroRNA'ların çiçeklenme zamanını düzenlemesi	51
Şekil 2.6 Soğuk strese maruz kalma ve alışma mekanizmaları boyunca bitkilerin temel tepkileri	57
Şekil 2.7 Soğuk-regüle eden gen indüksiyon yolları.....	66
Şekil 2.8 Soğuk sinyal yolağı.....	73
Şekil 2.9 <i>ICE1</i> ve <i>CBF3/ DREB1A</i> 'yı içeren soğuk sinyal yolağı	74
Şekil 2.10 Soğuğa alışma sırasında <i>CBF</i> sinyal yolağının düzenlenmesi.....	82
Şekil 2.11 Real Time PCR döngü aşamaları	87
Şekil 3.1 Materyal olarak kullanılan yerli çeşitler	92
Şekil 3.2 Materyal olarak kullanılan yabancı çeşitler	94
Şekil 3.3 <i>Spartoides</i> seksiyonunun üyelerinin dağılımı	95
Şekil 3.4 <i>Orientalis</i> tür grubunun doğu üyelerinin dağılımı	96
Şekil 3.5 <i>A. communis</i> L.'nin yabancı formları.....	98
Şekil 3.6 Sırasıyla Enstitü (Gaziantep) merkez bahçesi ile aynı enstitünün havaalanı bölgesinde yer alan koleksiyon parselinden bir görünüm.....	104
Şekil 3.7 Denemede kullanılan bazı badem çeşit ve genotiplerine ait görünümler	105
Şekil 3.8 Sürdürmeye alınmadan önce çeliklerin hazırlanışı	105
Şekil 3.9 İklim odasında sürmeye alınan çeliklerin görünümler	106
Şekil 3.10 Geç çiçeklenme değerlendirmesinde kullanılan pembe tomurcukların görünümü.....	107
Şekil 3.11 Yerli ve yabancı standart çeşitlerin, yabancı türlerin ve seleksiyon materyallerinin iklim odasında pembe tomurcuk açma zamanları.....	108
Şekil 3.12 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin kontrol (0. gün) örneklerinden bir görünüm	110
Şekil 3.13 Geç çiçeklenme değerlendirmesine ait ve soğuk uygulamalarının kontrolü olan pembe tomurcuklar.....	111
Şekil 3.14 Soğuk stresine alınan tomurcuklardan ve soğutma cihazından bir görünüm.....	112

Şekil 3.15 OPK10 markırının- <i>Lb</i> harita üzerinde görünüşü	113
Şekil 3.16 DNA izolasyon aşamaları (supernatant kısmı ve izo-propanol ile çöktürme).....	114
Şekil 3.17 Beckman CEQTM 8800 kapiller elektroforez sistemi.....	118
Şekil 3.18 Tomurcuklarda pul ayrımı ve örnek ezimi.....	120
Şekil 3.19 SV Total RNA izolasyon Promega kiti (Cat no:Z3100)	120
Şekil 3.20 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarı- Roche Light Cyclers 480 cihazı	129
Şekil 4.1 Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların, agaroz jel (%1) görüntüleri	131
Şekil 4.2 OPK10 RAPD markırına ait RAPD-PCR reaksiyonlarına ait bant profilleri	133
Şekil 4.3 UDP96003 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri	135
Şekil 4.4 EPPCU2584 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri	136
Şekil 4.5 BPPCT035 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri	137
Şekil 4.6 CPPCT008 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri	138
Şekil 4.7 EPCU2584 SSR-(yeşil) lokusuna ait örnek homozigot allel pik profili	140
Şekil 4.8 EPCU2584 SSR-(yeşil) ve BPPCT035 SSR-(mavi) lokusuna ait örnek homozigot allel pik profili	140
Şekil 4.9 CPPCT008 SSR-(yeşil) lokusuna ait örnek homozigot allel pik profili	141
Şekil 4.10 İzole edilen RNA'ya ait örnek spektrofotometrik ölçüm örnek (Nanodrop-ND-1000) görüntüsü	144
Şekil 4.11 Geç çiçeklenme uygulaması bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri (tek:tekerrür)	145
Şekil 4.12 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri (tek:tekerrür)	150
Şekil 4.13 Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) bazı referans çeşitlere ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri.....	155
Şekil 4.14 PdCBF2 primerinin referans çeşitlerdeki tüm saat uygulamalarına ilişkin örnek amplifikasyon ve standart eğri görüntüsü	158
Şekil 4.15 Soğuk uygulamasına (6. saat) maruz kalan bazı örneklerle ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri	160
Şekil 4.16 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı kontrol örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri	165
Şekil 4.17 Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri	167
Şekil 4.18 Soğuğa tolerans ile ilişkili olarak referans çeşitlerin pembe tomurcuk safhasındaki örneklerinde cDNA sentezi görüntüsü.....	170
Şekil 4.19 Soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin bazı genotiplerin agaroz jel elektroforezinde (% 1) cDNA görüntüsü.....	172
Şekil 4.20 PpFT aday primer dizaynına ilişkin örnek görüntü	174

Şekil 4.21 PCR’da çoğaltılan PdCBF2 aday primerine ilişkin % 2’lik agaroz jel elektroforezinde örnek görüntü (M: Markır).....	176
Şekil 4.22 Sırasıyla PabSOC1, PdCBF2, PpFT, PdCBF1 aday primerlerinin % 2’lik agaroz jel elektroforezinde PCR amplifikasyonları.....	177
Şekil 4.23 PabSOC1, PdCBF1, PdCBF2 ve PpFT aday primerinin pürifikasyonu sonrasında agaroz (% 1.5’luk) jel elektroforez örnek görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif Kontrol).....	177
Şekil 4.24 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait örnek dizi analiz sonucu	178
Şekil 4.25 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerine ait örnek dizi analiz sonucu	178
Şekil 4.26 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primerine ait örnek dizi analiz sonucu	179
Şekil 4.27 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primerine ait örnek dizi analiz sonucu	179
Şekil 4.28 Geç çiçeklenme - PpFT primer dizaynı	179
Şekil 4.29 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primer dizaynı	180
Şekil 4.30 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primer dizaynı	180
Şekil 4.31 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primer dizaynı	180
Şekil 4.32 Geç çiçeklenme - PdActin primerine ait standart eğri grafiği	181
Şekil 4.33 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait standart eğri grafiği.....	182
Şekil 4.34 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerine ait standart eğri grafiği.....	182
Şekil 4.35 Soğuk uygulaması - PdActin primerine ait standart eğri grafiği	182
Şekil 4.36 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primerine ait standart eğri grafiği	179
Şekil 4.37 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primerine ait standart eğri grafiği.....	183
Şekil 4.38 Geç çiçeklenme - PdAct primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	184
Şekil 4.39 Geç çiçeklenme - PpFT primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	184
Şekil 4.40 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri	184
Şekil 4.41 Soğuk uygulama - PdAct primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	185
Şekil 4.42 Soğuk uygulama - PdCBF1 primerinde 6.saat soğuk uygulama yapılan kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	185
Şekil 4.43 Soğuk uygulama - PdCBF2 primerinde 6.saat soğuk uygulama yapılan kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	185
Şekil 4.44 Geç çiçeklenme - PdActin primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği.....	186
Şekil 4.45 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği.....	187
Şekil 4.46 Farklı badem genotiplerinde geç çiçeklenme değerlendirmesine ait <i>PpFT</i> geninin ifade seviyesi	197
Şekil 4.47 Geç çiçeklenme örneklerinde <i>PabSOC1</i> geni ifade seviyesi.....	197
Şekil 4.48 Soğuk uygulaması örneklerinde <i>PdCBF1</i> geni ifade seviyesi.....	204
Şekil 4.49 Soğuk uygulaması örneklerinde <i>PdCBF2</i> geni ifade seviyesi.....	206

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı badem çeşitlerinde çiçeklenme için soğuklama ve sıcaklık istekleri	28
Çizelge 2.2 Önemli bazı standart badem çeşitlerinin çiçeklenme zamanları.....	32
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan badem materyalleri.....	90
Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler.....	99
Çizelge 3.3 Hoagland Besin Solusyonu'nda bulunan makro ve mikro elementler	106
Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyon solüsyonu içeriği	114
Çizelge 3.5 SSR lokuslarına ait primer bilgileri	116
Çizelge 3.6 RAPD-MAS markırı optimizasyon koşulu.....	117
Çizelge 3.7 UDP96003, EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 SSR markırlarının PCR optimizasyon koşulu	119
Çizelge 3.8 Kullanılan aday genlere ait bilgiler.....	123
Çizelge 3.9 Homolog gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR koşulları	124
Çizelge 3.10 cDNA sentez koşulu ve reaksiyon programı.....	126
Çizelge 3.11 PdAct (Housekeeping) primer optimizasyon koşulları).....	127
Çizelge 3.12 PpFT primer optimizasyon koşulları	128
Çizelge 3.13 PabSOC1 primer optimizasyon koşulları.....	128
Çizelge 3.14 PdCBF1 primer optimizasyon koşulları.....	128
Çizelge 3.15 PdCBF2 primer optimizasyon koşulları.....	128
Çizelge 3.16 Real Time PCR programı.....	130
Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan tür, çeşit ve genotiplere ait DNA'ların spektrofotometrik değerleri	132
Çizelge 4.2 RAPD markırı değerlendirmesi	134
Çizelge 4.3 Badem çeşitlerinin 3 SSR markırındaki allel büyüklükleri (bç).....	139
Çizelge 4.4 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri	146
Çizelge 4.5 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür).....	151
Çizelge 4.6 Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) bazı referans çeşitlerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür).....	156
Çizelge 4.7 Erken çiçeklenen referans çeşitlerde PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin tüm saat uygulamalarına ilişkin Ct değerleri	158
Çizelge 4.8 Geç çiçeklenen referans çeşitlerde PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin tüm saat uygulamalarına ilişkin Ct değerleri	159
Çizelge 4.9 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür).....	161
Çizelge 4.10 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı kontrol örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri	165

Çizelge 4.11 Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri.....	168
Çizelge 4.12 Soğuk uygulaması ile ilişkili olarak referans çeşitlere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri.....	171
Çizelge 4.13 Soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin bazı genotiplere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri.....	172
Çizelge 4.14 PCR'da çoğaltılan genlere ait dizayn edilen aday primer dizileri.....	175
Çizelge 4.15 Pürifikasyon sonrası PCR ürünlerinin Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre cihazı ölçüm sonuçları.....	178
Çizelge 4.16 Real Time PCR'da kullanılan badem spesifik primerlere ait dizi bilgileri.....	181
Çizelge 4.17 Geç çiçeklenme örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri.....	188
Çizelge 4.18 Soğuk uygulaması örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri.....	191
Çizelge 4.19 Geç çiçeklenme örneklerinde <i>PpFT</i> ve <i>PabSOC1</i> genlerine ait normalize veriler.....	195
Çizelge 4.20 Soğuk uygulaması örneklerinde <i>PdCBF1</i> ve <i>PdCBF2</i> genlerine ait normalize veriler.....	203
Çizelge 5.1 Geç çiçeklenme değerlendirmesi yapılan çeşit, tür ve genotiplerin markır taramaları ile gen ifadesi analizlerinin ve soğuk uygulamalarında gen ifadeleri azalış gösteren çeşit ve genotiplerin karşılaştırılması.....	218

1. GİRİŞ

Kültürü yapılmakta olan badem, *Rosaceae* familyasının Prunoideae alt familyasına dahil olup, *Prunus* cinsinde yer almaktadır. Her ne kadar kültür bademinin orjini olarak yalnız *Prunus amygdalus* (*Prunus communis* Fritsch.) üzerinde duruluyorsa da, *Amygdalus fenzliana* Fritsch, *Amygdalus bucharica* Korschinsky, *Amygdalus ulmifolia* Franchet ve *Amygdalus kuramica* Korsh'nın da sert kabuklu bademlerin ataları olabileceği düşünülmektedir. Çoğu literatürde *Prunus amygdalus* olarak isimlendirilmekle birlikte bazı yazarlar bu meyve türünü ayrı bir alt cins (*Amygdalus*) içerisinde düşünmekte ve *Amygdalus communis* olarak isimlendirmektedirler. Başka bir deyişle, kültür bademi için kullanılan *Prunus communis*, *Prunus amygdalus* ve *Amygdalus communis* tür isimlerini sinonim olarak kabul etmek gerekmektedir (Graselly 1976, Browicz ve Zohary 1996).

Amygdalus alt cinsi içerisindeki türler 6 seksiyonda (*Euamygdalus* Spach, *Spartioides* Spach, *Lycoioides* Spach, *Emplectocladus* Torr, *Chamaeamygdalus* Spach, *Amygdalopsis* Caara) yer almıştır. *Prunus* cinsine dahil diğer türler ile birlikte bademin de yabancı türlerinin ortaya çıkarılmaya başlaması XIX'ncü yüzyılın ikinci yarısına rastlamaktadır. Botanikçilerin yaptığı çalışmalar sonucunda *Amygdalus* alt cinsi içerisinde 40 kadar tür saptanmıştır. Türler üzerinde yapılan çalışmalar bunlardan bir kısmının özel karakterli hibritler olduğunu ortaya koymuştur. İslah çalışmalarının sürdürülmesinde yabancı türlerin niteliklerinin bilinmesi büyük önem taşır. Diğer yandan, yabancı badem seksiyonlarının hepsi kültür bademinin ıslahı için aynı önemi taşımamaktadır. Bunlardan bazıları kültür bademinden fazlaca uzaklaşmışlardır veya ıslah çalışmaları için istenmeyen meyve niteliklerini içermektedirler (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979).

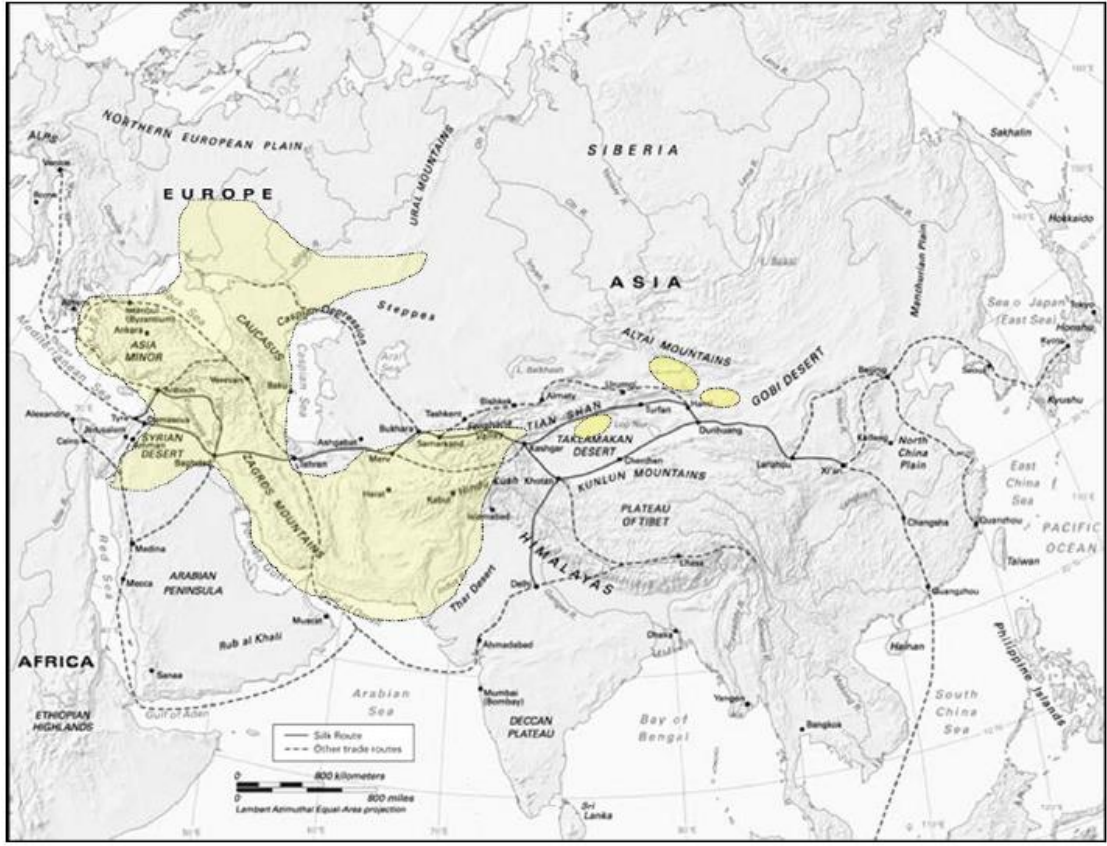
Anavatanı Orta Asya'nın dağlık bölgeleri olan bademin, Tian Şan'dan Kafkasya'ya kadar Afganistan ve İran boyunca çeşitli yabancı formları bulunmaktadır. Bunlardan içi

tatlı ve üstün nitelikli olanların kültüre alınmasıyla bugünkü kültür bademi ortaya çıkmıştır (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979). Badem yetiştiriciliğinin batı yönünde Akdenize doğru yayılımı iki aşamada olmuştur. Badem ilk kez Peloponez yarımadasına ve Yunan adalarına MÖ 300-400’de girmiştir (Şekil 1.1). Daha sonraları badem İtalya, güney Fransa, İspanya, Portekiz, kuzey Afrika ve Madeira adasını içeren Akdeniz’in adapte olmuş alanlarıyla tanışmıştır.



Şekil 1.1 İlk badem plantasyonunun lokasyonları (yeşil alanlar) ve M.Ö 500’e ait Pers İmparatorluğunun haritası (Gradziel 2017)

Orta Asya çıkışlı olan kültür bademi zamanla Akdeniz havzasına yayılmıştır. Bademin geniş yayılımı ve kolay taşınabilirliği, onun tarih öncesi ticaretinde Asya’da, Kuzey Afrika’da ve Avrupa’da önemli bir ürün olarak görünmesini sağlamış, kültüre alınmış tatlı badem veya ‘Greek nut’ yeni türlerinin pazar standardının oluşmasına sebep olmuştur (Gradziel 2017). Bu yeni badem türleri, kuzey-batı Çin’den doğuda kuzey Indus vadisine, oradan Mezopotamya’ya ve batıda güney Avrupa’ya doğal yayılım göstermiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Eski ticari rotaların ve *Euamygdalus* alt türünün yabancı badem türlerinin Avrasya dağılımının fiziksel haritası (Gradziel 2017)

Fransa'da Orta Çağ sonuna kadar badem ağacından bahsedilmediği görülmektedir. Şarلمان'ın hükümdarlığı zamanında imparatorluğun güney ülkelerinde badem dikimi önerilmiştir. Bu sıralarda tıbbi kaynaklarda badem yağının yer aldığı görülmektedir. Elma, armut vb. meyve türlerinde çeşitlerin belirlendiği ve bunlar üzerinde çalışmalar yapılmaya başlandığı halde bu devirde badem hakkında herhangi bir yayına rastlanmamaktadır. Sadece, bir süre sonra kabuklarının sertlik durumuna göre bademde bir sınıflandırmanın yapıldığı görülmektedir (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979).

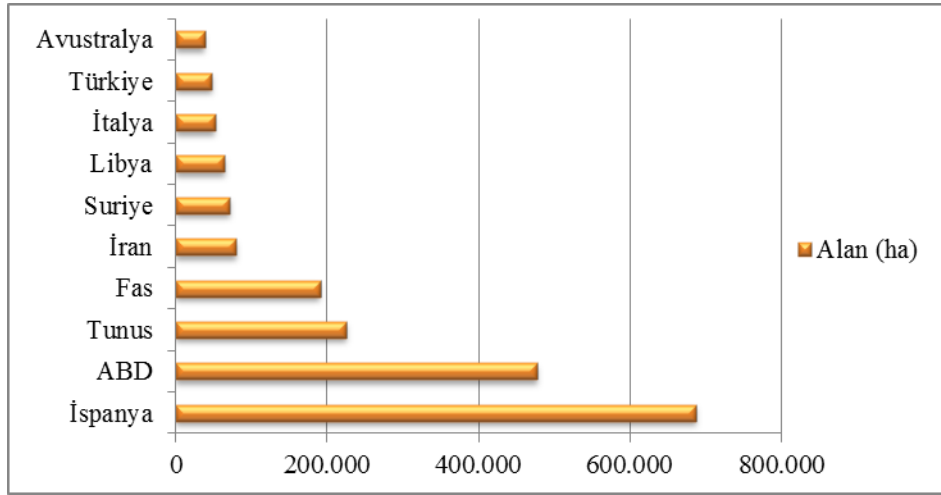
İtalya, İspanya ve bütün Akdeniz bölgesine bademin yayılışı XIX. yüzyıla kadar çok yavaş olmuştur. Tohumla yapılan üretimin atmasıyla, badem yetiştirilen alanlar hemen hemen iki katına çıkmıştır. Sicilya, Yunan adaları ve Balear adaları gibi badem

yetiştiriciliği için iklim koşullarının çok elverişli olduğu yerlerde badem, kapama bahçeler halinde yetiştirilmiştir. Endülüs, Doğu İspanya ve Pouilles gibi bölgelerde bademin zeytin ile birlikte dikildiği, bu dönemlerde Fransa'da bademin sınır ağacı olarak düşünüldüğü belirtilmiştir (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979). Gerek ekolojik şartlar gerekse insan eliyle yapılan bilinçli seleksiyonlar, bazı bölgelerde coğrafik ve ekotipik badem popülasyonlarının meydana gelmesini sağlamıştır.

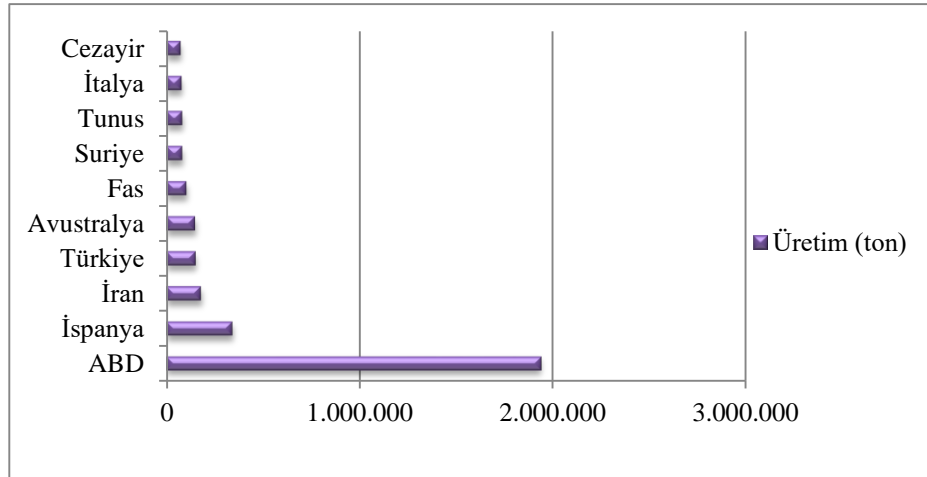
Kültür bademleri ise, *Amygdalus communis* türünden uzun yıllar yapılan seleksiyonlar sonucunda meydana gelmiştir. Seleksiyon süresinde oluşan tipler seçilerek, yabanilerden uzak ancak birbirine genetik benzerlik gösteren, bir örnek meyve özelliklerine sahip bireylerden kültür popülasyonları elde edilebilmiştir. Kültür özellikleri yönünden varyasyonu azaltan bu durum genom ve kalıtımda homozigotluğun artırılmasına büyük katkı sağlamıştır. Bu olanaklar bir örnek üstün özellikli genotiplerin üretimde kullanılmasını mümkün kılarken, yeni çeşit ve anaçların eldesine yönelik materyalin oluşumunda da kolaylıklar sağlamaktadır (Socias i Company vd. 1999).

Dünyada son verilere göre toplam 2.126.304 ha alanda ve 3.497.148 ton üretimle badem yetiştiriciliği yapılmaktadır (Şekil 1.3, 1.4). Badem üretiminde söz sahibi ülkeler sırasıyla ABD (1.936.840 ton), İspanya (340.420 ton), İran (177.015 ton), Türkiye (150.000 ton), Avustralya (146.410 ton), Fas (102.185 ton) ve Suriye (80.258 ton)'dir. Bu ülkeleri Tunus (80.000 ton), İtalya (77.300 ton) ve Cezayir (72.417 ton) izlemektedir. Badem üretim alanı açısından ilk sıralarda yer alan ülkeler ise sırasıyla İspanya (687.230 ha), ABD (477.530 ha), Tunus (225.453 ha), Fas (190.612 ha), İran (79.597 ha), Suriye (71.520 ha), Libya (64.132 ha), İtalya (52.040 ha), Türkiye (47.088 ha) ve Avustralya (37.903 ha)'dır (Anonymous 2019a). Türkiye, bademin gen merkezi üzerinde bulunması sebebiyle badem popülasyonu açısından önemli bir konumdadır. Türkiye'de 523.695 da alanda 159.187 ton badem üretimi yapılmaktadır ve meyve veren yaşta mevcut badem ağaç sayısı 10.380.249 adet iken, 7.093.395 adet badem ağacı da meyve vermeyen yaşıdadır (Anonim 2020). Ülkemiz badem üretiminin bölgelere göre dağılımı; Akdeniz (49.928 ton), Güneydoğu Anadolu (36.847 ton), Ege

(34.231 ton), Batı Marmara (13.479 ton) ve Batı Anadolu (8.777 ton) bölgeleri şeklindedir. Üretimde ilk beş sırada yer alan iller Mersin (28.513 ton), Adıyaman (18.323 ton), Muğla (10.145 ton), Antalya (8.859 ton) ve Çanakkale (7.897 ton) olup, üretim alanı bakımından önde gelen iller ise sırasıyla Adıyaman (78.215 da), Manisa (53.848 da), Şanlıurfa (48.258 da), Mersin (39.840 da) ve Muğla (22.277 da)'dır (Anonim 2020).



Şekil 1.3 Dünya badem üretim alanı (ha)



Şekil 1.4 Dünya badem üretim miktarı (ton)

Badem yetiştiriciliği açısından önemli bir potansiyele sahip olan ülkemizde badem üretimi çok uzun yıllardır uygun ekolojili bölgelerde yapılagelmektedir. Ancak, ilkbahar geç donları açısından riskli olan çoğu bölgelerimizde bu türün ekonomik anlamda yetiştiriciliği ve yeterli ürün eldesi mümkün olamamaktadır (Özbek 1978). Bir diğer önemli durum; ülkemizdeki badem yetiştiriciliğinin uzun yıllardır doğadan toplanan tiplerin tohumları kullanılarak sürdürülmesi ve standart çeşitlerle kurulan kapama badem bahçelerinin oldukça sınırlı sayılarda kalmış olmasıdır. Ancak son yıllarda hem yeni/üstün özellikli standart çeşitlerin hem de belli niteliklerdeki anaçların ülkemizde de kullanılmasıyla modern badem bahçelerinin sayısı artmaya başlamıştır.

Ilıman iklim meyve türleri arasında yer alan badem, diğer bazı meyve türlerinin rahatlıkla yetiştirilemediği kıraç ve kurak toprak şartlarına adaptasyonu nedeni ile yaygın yetişme/yetiştirilme alanlarına sahiptir. Bunun yanı sıra, meyvelerini olgunlaştırabilmek için yüksek bir sıcaklık toplamına gereksinim duymaktadır (Alonso vd. 2005).

Badem soğuklama isteği yönünden diğer türlere göre farklılık göstermektedir. +5°C'nin altında 90-400 saatlik, genel olarak diğer türlerde baz alınan +7°C'nin altında ise 300-500 saatlik bir soğuklamanın yeterli olduğu belirtilmektedir (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979). Çeşide özgü çok önemli bir özellik olan soğuklama isteği, sıcaklık isteğinin aksine, dormansi süresinin uzunluğunu ve çiçeklenme zamanını belirleyen ana faktör olarak kabul edilmektedir (Egea vd. 2003, Ruiz vd. 2007, Albuquerque vd. 2008, Campoy vd. 2011a, Atkinson vd. 2013, Sanchez-Pérez vd. 2012, 2014). Diğer ılıman iklim meyve türlerine göre soğuklama isteği az olan bademde, zorunlu dinlenme koşullarının ortadan kalkması ile birlikte çiçeklenme erken gerçekleşmektedir. Bunun sonucu olarak badem, erken çiçeklenme nedeniyle ilkbahar geç donlarından ve buna bağlı olarak ürün kaybından en çok etkilenen meyve türü olarak bilinmektedir (Ma ve Oliviera 2000, Sathe vd. 2002, Yi vd. 2003, Samani vd. 2005, Arus vd. 2009).

İlkbahar geç donları, badem yetiştiriciliğini sınırlayan etkenlerin başında gelmektedir. Yetiştiriciliği ilkbahar don tehlikesi düşük olan bölgelerle sınırlandırılmış olan badem kültürünün iç kısımlardaki Akdeniz bölgelerine yayılmasının, soğuk zararına bağlı verim düşüklüğü riskini önemli ölçüde arttırdığı ifade edilmektedir (Socias i Company vd. 1999). Geç çiçeklenen tiplerin belirlenmesi ve çeşitlerin ıslah edilmesiyle, ilkbahar geç donları açısından riskli durumlarda da badem yetiştiriciliğine olanak sağlanabilecektir (Felipe 1988). Bu nedenle de badem ıslahı çalışmaları geç çiçek açan çeşitlerin belirlenmesi ve geliştirilmesi yönünde yapılmaktadır (Kester ve Assay 1975) ve çoğu badem ıslah programlarında ilkbahar geç don zararının önlenmesi ve tozlanma-döllenme için istenilen yüksek sıcaklıkların avantajlı olması açılarından, geç çiçeklenen genotiplerin seleksiyonu ve çeşitlerin geliştirmesi hedeflenmektedir (Socias i Company vd. 1999). Oysaki, bu çözüm ilkbahar don zararının üstesinden gelmek için yeterli değildir ve Avrupa ıslah programlarında dona dayanıklılık özelliği de bir seçim hedefi olarak kabul edilmektedir (Socias i Company vd. 1998). Ülkemizdeki badem ıslah çalışmalarında ise geç çiçeklenmeyi kriter alan ağırlıklı olarak seleksiyon ıslahı araştırmaları yürütülmekte, belli özellikler açısından üstün niteliklere sahip tiplerin seçilmesi de amaçlanmaktadır. Bu amaçlarla son yıllarda farklı bölgelerimizde yürütülen seleksiyon (Gülcan 1976, Cangı ve Şen 1991, Şimşek ve Küden 2007, Yıldırım 2007, Şimşek vd. 2010, Alkan vd. 2014, Yılmaz 2017) ve adaptasyon (Kaşka vd. 1998, Kaşka 2001, Küden ve Küden 2000, Atlı vd. 2008) çalışmaları söz konusudur. Ayrıca, kendine verimli ve geç çiçeklenen yeni badem tiplerinin elde edilmesi öncelikli amacıyla melezleme çalışmalarına da başlanmıştır (Açar vd. 2012).

Badem yetiştiriciliğinde erken çiçeklenme nedeniyle ortaya çıkan soğuk zararları ve çeşitlerin soğuğa dayanım özelliklerinin farklılıklar göstermesi, bademde çiçeklenme ve soğuğa dayanım mekanizmaları konularındaki çalışmaları gündeme getirmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan ıslah çalışmalarında geç çiçeklenme özelliği yanısıra soğuğa toleransı daha fazla olan çeşitlerin belirlenmesi konuları da ağırlık kazanmaktadır.

Klasik yöntemler kullanılarak yürütülen ıslah çalışmaları, özellikle çok yıllık bitkilerde oldukça uzun bir süreyi gerektirmektedir. Seleksiyon ve melezleme çalışmalarının süresini kısaltmak ve istenilen hedefe kısa sürede ulaşmak için ıslahta moleküler seleksiyon çalışmaları son derece önemli görülmektedir. Bunun yanı sıra; bitki ve hayvan ıslahı programlarında çalışılan karakterlerin çoğu kantitatifdir ve bu karakterler üzerinde çevre faktörlerinin de büyük etkileri söz konusudur. Çevresel faktörlerin pomoloji, fenoloji vb. özellikler üzerindeki etkileri, DNA'nın değişmeyen kalıtsal yapısında farklılıklar yaratmamaktadır.

Islahı destekleyici ilk moleküler çalışmalar, markör araştırmaları ile başlatılmış, izoenzimler ve özellikle DNA markörler, kantitatif karakterlerle çalışmayı daha kolay hale getirdiği için büyük ilgiyle karşılanmıştır (Ruana ve Sonnio 2003). Bademde yürütülen moleküler çalışmalar ilk olarak DNA markörler ile badem gen kaynaklarının tanımlanması konularında gerçekleştirilmiş, ilerleyen süreçlerde agronomik özelliklerle ilişkili gen/genlere yönelik haritalama çalışmaları başlatılmıştır. Böylece Markıra Dayalı Seleksiyonda (MDS=MAS: Markır Assisted Selection) kullanılacak markır tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda ise, gen ve gen ifade analizleri konusundaki çalışmalara sert kabuklu meyve türlerini de içine alan pek çok türde başlandığı, ancak bademde bu konuda yapılan araştırmaların daha sınırlı olduğu dikkat çekmektedir. Bu çalışmalar, bitkilerde çiçeklenme, stres (soğuk, kuraklık vb.) gibi olayların altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasında da etkin yaklaşımlar ortaya koymaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması, istenilen özelliklere sahip çeşitlerin belirlenmesi ve geliştirilmesinde ıslah çalışmalarına önemli ve hızlı bir katkı sağlayacaktır.

Bademde moleküler düzeyde yapılan araştırmaların çoğunluğu gen kaynaklarının tanımlanması, genetik ilişkilerin belirlenmesi ve genetik haritalama, çiçeklenme zamanı, dayanıklılık ıslahı (kuraklık, su, soğuk stresi gibi) konularında yoğunlaşmıştır (Joobeur vd. 2000, Fathi vd. 2008, Tavassolian vd. 2010, Sanchez-Perez vd. 2012). Ayrıca; geç çiçeklenmeyle ilişkili QTL bölgesinin belirlenmesine dayalı haritalama çalışmaları

yanısına geç çiçeklenme, çiçeklenme fizyolojisi, soğuklama istekleri - çiçeklenme ilişkileri konusunda sınırlı sayıda da olsa yürütülmüş araştırmalar bulunmaktadır. Bu araştırmaların çok büyük çoğunluğu yabancı araştırmacılarca yrtlmştir, ülkemizde ise bu konudaki araştırmalar yok düzeyindedir. Bu nedenlerle, badem yetiştiriciliğini sınırlayan en etkin faktörler de dikkate alındığında; ülkemiz badem eşitleri ve genotiplerinde soğuklara dayanımı yüksek, geç çiçeklenen genotiplerin belirlenmesi, geliştirilmesi ve bu özelliklerin kültür çeşitlerine aktarılması konularında, melezleme çalışmalarının yanısına moleküler düzeyde araştırmaların da hız kazanması gerekmektedir.

Bu yaklaşımlardan yola çıkararak bademde çiçeklenme zamanı ve soğuğa toleransın birlikte ele alındığı bu tezde; ülkemizde badem yetiştiriciliğinde kullanılan farklı zamanlarda çiçeklenen standart çeşitlerde, yabancı badem türlerinde ve doğadan selekte badem genotiplerinde;

- * Çiçeklenme zamanındaki farklılıkları fenolojik ve gen ifadeleri düzeyinde belirlemek, ayrıca ön bilgi niteliğinde verilere ulaşmak için geç çiçeklenme geni ile ilişkili UDP96003 ve OPK10 (*Lb* genine ait) MAS markır taramalarını gerçekleştirmek,
- * Tomurcuktan çiçeğe geçiş (pembe tomurcuk döneminde) dönemindeki soğuğa toleransı gen ifadeleri düzeyinde belirlemek,
- * Konu edilen tür, çeşit ve selekte edilen genotipleri geç çiçeklenme ve soğuğa tolerans açısından populasyon içi karşılaştırmak,
- * Gen ifadesi düzeyinde geç çiçeklenme - soğuğa tolerans arasındaki olası korelasyonları açığa çıkarmak amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmanın aşağıda sıralanan konularda önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir:

Badem moleküler genetiği açısından; *a)* bademde geç çiçeklenme zamanı ile ilgili tespit edilen mevcut DNA-MAS markırının yerli materyallerde optimizasyonu ve diğer çalışmalarda kullanmak üzere yaklaşımlarda bulunulması, *b)* Çok yıllık bir tür olan bademde ülkemizde RNA izolasyonunun optimizasyonu (özellikle çiçek dokularında), yurtdışında tespit edilen gen bölgelerinin homologlarının yerli materyallerde tespit edilerek, gen ifade analizi yöntemlerinin optimizasyonu konularında yaklaşımlarda bulunulması ve böylece ileriye yönelik (gen klonlama, RNA dizileme vs.) çalışmalara alt yapı oluşturulmasına katkı sağlanması, *c)* Her bir gene yönelik elde edilecek bilgilerden oluşturulacak gen-markırları ile genlerin ifadesi yoluyla bireylerin karşılaştırılmasının gerçekleştirilmesi, *d)* seleksiyon kriterlerinin DNA kökenli -MAS markır verilerinden farklı olarak materyalleri derecelendirme kriteri sağlayan (ifadesi artmış/azalmış, a genotipi b'nin 3 katı daha dayanıklı vb.) bulgular yönüyle değerlendirilmesi

Badem yetiştiriciliği ve ıslahı açısından ise; *a)* Bademde mevcut (yerli/yabancı ticari) çeşitlerin, bu çeşitler baz alınarak yeni çeşit adaylarının çiçeklenme zamanı, soğuğa toleransları moleküler bazda karşılaştırılması, *b)* bu karşılaştırmalar sonucunda önemli olabilecek ıslah ebeveyn adayları, üretimde kullanılacak yerli çeşit/çeşit adayları konularında yaklaşımlarda bulunulması, *c)* Bu iki özellik açısından ileriki yıllarda yapılacak seleksiyonlarda kullanılmak üzere (doğal badem tipleri, hibrit vb.) veriler oluşturulması, *d)* Elde edilecek bulgularla yabancı bademlerdeki genetik mekanizma ile kültür bademleri arasında başlangıç karşılaştırma bulgularının sağlanması

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Moleküler Markırlar ve Kullanım Alanları

Moleküler markırlar, genomda bir gen ya da gen bölgesine ilişkin DNA parçası veya biyokimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik bilimlerde büyük atılımlar sağlayan moleküler markırlar, farklılıkları DNA düzeyinde ölçen, araştırılan genotiplerde istenen bir genin ya da özelliğin polimorfikliğini belirlemek için kullanılabilen uygulamalardır. Moleküler markır, genom içinde bir DNA parçasının eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler, duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilen farklılıklarını temsil etmektedir (Filiz ve Koç 2011). Bu nedenle moleküler markırlar, taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği gibi alanlarda çok yönlü amaçlarla kullanılabilen, gözlenebilir karakterlere dayanan morfolojik özelliklere ve temeli proteine dayanan biyokimyasal markırlara göre oldukça güvenli kabul edilmektedir (Schlotterer 2004, Yıldırım 2007). Gen kaynaklarının genetik çeşitlilik seviyesinin değerlendirilmesinde, elit genotiplerin korunması ve belirlenmesinde, özellikle de kültür bitkilerinin ıslahında moleküler markırların katkısı çok önemlidir (Filiz ve Koç 2011).

Genom analizleri ve genetik çalışmalar başta olmak üzere moleküler çalışmalarda morfolojik, protein ve DNA markırları olmak üzere 3 tip markır kullanılmaktadır (Liu 1998). Morfolojik karakterler, özgün genler için güvenilir belirleyiciler olarak kullanılabilirler ve bu özellikleri kodlayan genlerin kromozom üzerinde yerlerinin tanımlanmasında faydalı olmaktadır. Morfolojik markırların gözlenmesi kolay olmasına rağmen allel sayılarının nispeten az olmasından dolayı kullanımı kısıtlı kalmaktadır (Özşensoy ve Kurar 2012).

Genetik tanımlamaların ilk zamanlarında protein polimorfizmlerinin araştırılması amacıyla izoenzim markırları yaygın olarak kullanılmıştır. İzoenzimler, bir enzimin

alternatif formlarıdır ve aynı enzim aktivitesine sahip olmalarına rağmen elektroforetik hareketleri farklılık göstermektedir (Liu 1998). Genetik çalışmalarda proteinler markır olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat özellikle protein (izoenzim) sistemlerinin genomun bazı bölgelerinde toplanmış bulunmaları, polimorfizm değerlerinin nispeten düşük olması, iş yükünün ağır olması ve analizlerin uzun zaman alması nedeniyle ve moleküler biyolojideki gelişmelere bağlı olarak yerini DNA temelli markırlara bırakmıştır (Kurar 2001).

Meyve türlerinin tanımlanmasında morfolojik özellikler kullanılırken, 1980'li yılların başlarında protein molekülleri olan izoenzimler devreye girmiştir. Ancak; iklim koşullarından etkilenmeleri, çeşide ve gelişme dönemine göre farklılıklar göstermeleri izoenzimlerin kullanımını sınırlamıştır. (Küden ve Tanrıver 1996, Polat vd. 1999). Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) keşfedilmesiyle genetik çalışmalarda PCR temelli markırlar daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. 1990'lı yılların başında ise DNA markırları devreye girmiş ve birçok bitki türünde, meyve tür ve çeşitlerinin tanımlanmasında dönüm noktası oluşturmuştur. Bu amaçla kullanılan DNA markırları [RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) gibi] genetik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Weber ve May 1989, Liu 1998). Nükleik asit temeline dayalı genetik markırların genom analizlerinde kullanımı; genetik varyasyonun araştırılması, türlerin taksonomik tanımlanması ve filogenetik akrabalıkların belirlenmesi, soyağacı analizleri, linkage haritalamaları ve seleksiyon programları gibi konularda ıslahçılara büyük kolaylık sağlamıştır. DNA markır sisteminin uygulaması ilk RFLP analizleri ile başlamış (Botstein vd. 1980), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin ortaya koyulması ile RAPD, SSR ve AFLP markır sistemleri oluşmuştur (Küden vd. 2005).

Tekrarlanabilen ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilen moleküler markırlar, genomda birden fazla bölgeyi belirleme imkanına sahiptirler, çevre koşullarından

etkilenmezler, dominant ve kodominant özellik gösterirler ve bütün dokularda tanımlanabilmektedirler (Devran 2003, Altun 2006). Bu nedenlerle DNA markırları ıslah çalışmalarında bitki materyallerinin seleksiyonu için de en iyi araç olarak kabul edilmektedir (Ovesna vd. 2002).

Geleneksel ıslah, zaman alıcıdır ve çevresel şartlara bağlıdır. Özellikle çok yıllık bitkilerde ve meyve türlerinde yeni bir varyetenin ıslahı 8-10 yıl gibi bir süreyi almaktadır. Bu sürecin kısaltılması için yeni teknolojilerin geliştirilmesi son derece önemlidir. Bitki genomlarının yapılarının ve davranışlarının anlaşılmasında moleküler tekniklerin gelişimi önemli bir aşamadır. Bu teknikler, bölge ırklarından yeni ve istenen özelliklerin belirlenerek yeni genetik varyasyon kaynakları oluşturmak ve türler arasında ve içinde DNA dizi varyasyonlarının gözlemlenmesinde kullanılmaktadır (Fernandez i Marti vd. 2009).

Meyve türlerinin uzun gençlik kısırlık dönemi, gelişim farklılıkları, incelenen pek çok özelliğin çevre koşullarına göre önemli değişiklikler göstermesi, değerlendirmelerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi gibi faktörler bitki materyallerinin uygun ve güvenilir şekilde sınıflandırılmasında zorluklar çıkarabilmektedir. Bu nedenle çoğu bitki türünün karakterizasyonunda ve genetik kaynaklarının belirlenmesinde DNA bazlı primerlerin kullanılarak moleküler tanımlamaların yapılması temel bir yaklaşım haline gelmiştir (Fernandez i Marti vd. 2009).

Moleküler teknolojisi, seleksiyon stratejilerini geliştirmek için yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Bitki verimliliğini, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık amacı ile yeni çeşitlerin geliştirilmesine izin veren yeterli çeşitliliğe sahip bitki ıslah programları çok önemlidir (Korzun ve Ebmeyer 2003, Fernandez i Marti vd. 2009, Bhat vd. 2010). Özellikle son 20 yıl içerisinde hızla gelişen moleküler markırların dünyada ve ülkemizde kullanım alanlarının başında bitki tür ve çeşitlerinin genetik olarak ismine doğruluğunun araştırılması çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Öte yandan özellikle

tanımlamada ‘kesin sonuç’, ‘uygulamada kolaylık’ ve ‘ekonomiklik’ sağlayan markırların yenilerinin bulunmasına ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar da yoğun bir şekilde sürdürülmektedir (Ergül 2000). Seleksiyon ve melezleme çalışmalarının süresini kısaltmak ve istenilen hedefe kısa sürede ulaşmak için ıslahta moleküler seleksiyon çalışmaları son derece önemli görülmektedir.

Bitkilerde moleküler markırlar günümüzde tarım alanında etkin olarak kullanılmaktadır.

Çeşit Tanımlama: Morfolojik markırlar genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Ancak morfolojik markırlar, kolay gözlenebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımları mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenerek yanlış seleksiyona yol açabilmektedirler. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve aranılan fenotipik özelliklerin uygun büyüme aşamasında ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçılarını moleküler markırlara yönlendirmiştir.

Çeşit Tescili: DNA markır tekniklerinin bir diğer uygulama alanı ise, çeşit tescilinde kullanılmasıdır. Tescile önerilen çeşidin, diğer çeşitlerden farklılığı, homojenliği ve genetik olarak durulmuşluğu tanımlanmalıdır. Bu ölçütlerin test edilebilmesi için klasik olarak morfolojik veriler temel alınmaktadır. Günümüzdeki moleküler markır sistemleri, bitki çeşitlerinin tescilinde tek başına yeterli bir tanımlama aracı olmamakla birlikte, ıslahçılar kendi çeşitlerini korumak için, yardımcı bir sistem olarak moleküler markır tekniklerinden yararlanmaya başlamışlardır. Moleküler teknikler, özellikle yeni geliştirilen bir çeşit ile var olan başka bir çeşit arasında morfolojik olarak çok az farklılığın bulunduğu durumlarda kullanılmaktadır. DNA markır teknikleri, tohumluk ticaretinde ve ıslahçı haklarında ortaya çıkan, bazı problemlerin kesin olarak çözümlenmesinde de kullanılabilir (Çalışkan 2005).

Islah Hatlarının Tanımlanması ve Tohum Saflık Testleri: Islah programlarının yürütülmesi sırasında ortaya çıkan birçok durum nedeniyle, melez hatlarının tanımlanması gerekmektedir (Henry 1997). Islah çalışmalarında etiketleme vb. durumlardan kaynaklanan karışıklıklar nedeniyle, önemli miktarlarda ıslah hattı kaybedilebilmektedir. Islah hatlarının, tohum örneklerinin karıştırılması nedeniyle saflıkları kaybolabilmektedir. Moleküler markırlar karışan bu hatların tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır. Bununla ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Roose ve Stone (1996), RAPD ve RFLP markırlarının, kuşkonmazda F1'leri F2 tohumlarından ayırmada kullanılabileceğini göstermişlerdir. Phippen vd. (1997), fenotipik olarak ayrılamayan 'Golden Acre' lahana çeşidine ait hatları ayırmada moleküler markırları başarıyla kullanmıştır. Tivang vd. (1996), RAPD tekniğini kullanarak enginar ıslah hatlarındaki varyasyonu belirlemişlerdir.

Hibrit Çeşit Saflık Testleri: F1 hibrit çeşit üretimi, birçok ticari üründe başarıyla yapılabilmektedir. Hibrit geliştirilmesi aşamalarında, istenmeyen polen bulaşmaları ve dişi hatların kendine tozlanması nedenleriyle saflık bozulabilmektedir. Bir hibridin geliştirilmesi için yapılan melezleme işleminin başarısını ve hibrit saflığını belirlemek amacıyla moleküler markırlar kullanılmaktadır. Birçok çeşitte, erkek ebeveyne özel moleküler markırlar kullanılarak, erken dönemdeki gerçek hibritlerle, saf olmayan hatlar ayrılabilir (Crockett vd. 2000).

Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi: Moleküler markırların, bitki türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemede iyi bir teknik olduğu kanıtlanmıştır (Kellerhals vd. 2000). Gen kaynaklarının tarımsal değeri, adaptasyonu ve performansını belirlemede markır tekniklerinin kullanılması bitki ıslahçılarına yardımcı olmaktadır.

Gen Kaynaklarının Genetik Kökeni: Moleküler markırlar, gen kaynaklarının genetik kökenleri hakkında oldukça yararlı bilgiler sağlamaktadırlar. Bu bilgiler ıslahçılar için,

özellikle nadir bulunan genleri içeren gen kaynaklarının kullanılabilirliğine karar vermede önemlidir (Çalışkan 2005).

Tarımsal Performansın ve Adaptasyon Yeteneğinin Tahmini: Moleküler çeşitlilik analizleri birçok tarımsal ve fizyolojik özellikler hakkında önemli bilgiler verebilmektedir. Bazen genetik çeşitlilik analizleri, bazı özellikler için tarama yapılmadan da çeşitlerin adaptasyon yeteneklerini belirlemede kullanılabilirler (Çalışkan 2005). Bitkisel üretimin başarısını etkileyen önemli etmenlerden soğuğa tolerans, kuraklığa tolerans mekanizmalarının ortaya konulması amacıyla moleküler düzeyde pek çok araştırma yürütülmüştür (Thomashow 1990, Neven vd. 1993, Puhakainen 2004, Siligato vd. 2004). Bu mekanizmaların biyofiziksel, biyokimyasal ve moleküler olarak daha detaylı araştırılması sonucu bitkilerin soğuğa toleransı konusunda önemli sonuçlar elde edilebilecektir. Böylelikle dünya üzerinde bitkilerin yayılım sınırlarını belirleyen en önemli faktörlerden biri olan düşük sıcaklıklara daha dayanıklı bitki tür ve çeşitleri seçilebilecek ve bu konuda yapılacak ıslah çalışmalarına önemli katkılar sağlanabilecektir. Ayrıca düşük sıcaklık stres mekanizması için elde edilen bilimsel veriler, kuraklık stres mekanizmasının açıklanmasına da olumlu katkı sağlayabilir.

Basit Karakterlerin Kalıtımı: Moleküler markırlar agronomik olarak önem arz eden tek (major) bir genin geri melezleme yöntemiyle hızlı ve etkin bir şekilde aktarımını sağlarlar. Geri melezleme ıslahında tekrarlanan anacın mümkün olan en yüksek oranda tekrar geri elde edilmesinde kullanılırlar. Fenotipik gözleme gerek kalmaksızın geni taşıyan geri melez hatların doğru seleksiyonunda moleküler markırlar oldukça etkilidirler. Ayrıca farklı karakterlere etki eden birden fazla genin eş zamanlı aktarımını da mümkün kılarlar (Yıldırım 2007).

Kantitatif Karakterlerin (QTL) Aktarımı: Moleküler markırlar, agronomik olarak önem arz eden ve birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen karakterlerin etkin bir

şekilde aktarılmasını sağlamaktadırlar. Çevre şartlarından oldukça fazla etkilenen karakterlerin, fenotipik gözlem zorluklarını aşarak doğru bir şekilde seçilmelerine yardımcı olmaktadır.

Francia vd. (2004), birbiriyle çok sıkı bağlantılı olan düşük sıcaklığa toleranslılıkla ilgili iki QTL bölgesini, PCR markırları yardımıyla transfer etmişlerdir. Mısırdaki, Williamson vd. (1994), kurağa karşı dayanıklılık sağlayan QTL’de uygun allellerin transferinde geri melez ıslahıyla markır destekli seleksiyon yöntemini kombine etmiştir.

Markır Destekli Seleksiyon (MAS): Moleküler markır sistemleri, özellikle ekonomik olarak önemli tarım ürünleri için yapılmış olan DNA markır haritalarının (genetik haritalar) çıkarılmasına izin vermiştir. Böylece gelecekteki markır destekli seleksiyon uygulamaları için bir alt yapı sağlanmıştır. Bu karakterler genetik olarak basit karakterler olabildiği gibi, birkaç gen tarafından kontrol edilen ve çevreden etkilenen kantitatif karakterler de (QTL olarak adlandırılan kantitatif karakter lokusu) olabilmektedir (Young 1999).

Günümüzde markır destekli ıslah çalışmaları çoğunlukla geriye melezleme yönteminde uygulanmaktadır. Klasik ıslaha kıyasla, moleküler markırların kullanımı geri melez ıslahının etkinliğini üç yolla sağlamaktadır; **a)** Fenotipik olarak zor belirlenen karakterler için markırlarla seleksiyon, seleksiyonun etkinliğini ve güvenilirliğini artırır. **b)** Markırlar, hedef gen yanındaki rekombinasyon sonucu oluşan nadir döllerini bile seçebilir. Böylece bağlantı sürüklenmesinin etkilerini minimize edebilirler. **c)** Klasik ıslahta resesif genlerin transferinde, her geri melez sonrası ilave kendileme gerekir. Moleküler markırlar bu tür ilave işlemleri ortadan kaldırmaktadır.

Sayılanlara ek olarak, klasik ıslahla üstün genotiplerin seçilme olasılığı oldukça düşüktür. Islahçılar ancak sayısız melezlemeden elde edilen döllerini test ederek ya da düşük seleksiyon baskısı kullanarak bu problemin üstesinden gelebilmektedir. Oysa

moleküler markırlar erken generasyonda yüksek performanslı genotiplerin teşhisine olanak sağlamaktadır (Francia vd. 2004). Moleküler markırların geliştirilmesinden sonra markır destekli seleksiyon hız kazanmıştır. Özellikle tahıllarda verim, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, pestisit ve herbisitlere dayanıklılık, su stresine, tuzluluğa, alkaliliğe dayanıklılık gibi konularda yapılan çalışmalar giderek artmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

2.2 Bademde Yürütülen Moleküler Çalışmalar

Bademde yürütülen moleküler düzeydeki çalışmalar genel olarak; **genetik haritalama** (Foolad vd. 1995, Viruel vd. 1995, Arus vd. 1998, Joobeur vd. 1998, Ballester vd. 1998, Joobeur vd. 2000, Ballester vd. 2001, Jauregui vd. 2001, Dirlewanger vd. 2003, Tavassolian vd. 2010), **genetik ilişkilerin belirlenmesi** (Bartolozzi vd. 1998, Aradhya vd. 2004, Xu vd. 2004, Küden vd. 2005, Ma vd. 2005, Xie vd. 2006, Bayazit 2007, Shiran vd. 2007, Sorkheh vd. 2007, Zeinalabedini vd. 2007, Fathi vd. 2008, Fernandez-Marti vd. 2009, Gouta vd. 2010, Kadkhodaei vd. 2011, Otaghvare ve Ghaffarian 2011, Elhamzaoui vd. 2012, Distefano vd. 2013, Karakurt 2013, Köse 2013), **genotip tanımlama** (Bianchi vd. 2004, Dangl vd. 2009, Kadkhodaei vd. 2010, Sharma ve Sharma 2010, Zeinalabedini vd. 2010), **meyve bileşimi** (Sánchez-Pérez vd. 2010, Font i Forcada vd. 2012), **badem hastalıklarının incelenmesi** (Adaskaveg ve Hartin 1997, Förster ve Adaskaveg 1999, Verdin vd. 2003, Yüzer 2008), **dayanıklılık ıslahı** (Campalans vd. 2001, Barros vd. 2010, Alimohammadi vd. 2013) ve **çiçeklenme zamanı** (Socias i Company vd. 1999, Ballester vd. 2001, Silva vd. 2005, Barros vd. 2012, Sánchez-Pérez vd. 2012, Sánchez-Pérez vd. 2014) konularında yoğunlaşmıştır (Özdemir 2015).

Bu çalışmaların süreçlerini kısaca özetlemek gerekirse;

DNA markırlar ile badem gen kaynaklarının tanısına yönelik olarak günümüze kadar izoenzim (Viruel vd. 1995, Joobeur vd. 2000, Dirlewanger vd. 2003), RAPD (Bartolozzi vd. 1998, MirAli ve Nabulsi 2003, Bayazit 2007), AFLP (Aradhya vd. 2004, Sorkheh vd. 2007), RAPD ve SSR (Küden vd. 2005, Shiran vd. 2007) ile SSR (Bianchi vd. 2004, Fathi vd. 2008, Fernandez-Marti vd. 2009, Gouta vd. 2010) tabanlı birçok çalışma yürütülmüştür.

Bunları takiben, bir agronomik özellik ile ilişkili genlere yönelik genetik haritalama çalışmaları başlatılmış ve sonucunda Markıra Dayalı Seleksiyon'da (MDS=MAS: Markır Assisted Selection) kullanılacak markır tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Melezleme ıslahı sonucu elde edilen hibrit generasyonlarda üstün özellikli genotiplerin seleksiyonu gözlemlere dayanmakla birlikte, F1 bitkilerinde genotip x çevre interaksyonundan dolayı görülen açılım, fenotipik seleksiyonu oldukça zorlaştırmaktadır. Bunun yanı sıra ıslah aşamasında bazı karakterler için (abiyotik stres koşullarına tolerans ile ilişkili karakterler gibi) seleksiyon çoğu zaman uygulanabilir değildir. Markıra Dayalı Seleksiyon (MAS: Markır Assisted Selection); klasik melezleme ıslahında karşılaşılan bu sorunlara alternatif bir yaklaşım olarak devreye girmiştir (Francia vd. 2004). Islah programlarında hedef alınan karakteri kodlayan gen/genler ile bağlantılı bu markırların kullanılmasının en önemli potansiyel faydaları ise; erken seleksiyon ile ıslah süresinin kısaltılması ve hibrit yetiştirme alanlarından, iş gücünden tasarruf sağlamaktır (Ruana ve Sonnio 2003). Bademde değişik araştırmalarda QTL (Quantitative Trait Locus) (Foolad vd. 1995, Viruel vd. 1995, Joobeur vd. 1998, Dirlewanger vd. 2003, Silva vd. 2005, Tavassolian vd. 2010) ve BSA (Bulked Segregant Analysis) (Rasouli vd. 2014) yaklaşımları kullanarak genetik haritalama çalışmaları tamamlanmıştır, ancak diğer türlerle karşılaştırıldığında sınırlı sayıdadır.

Üçüncü çalışma grubu olarak özellikle son yıllarda hücresel yolların belirlenmesi konularında gen/gen ifadesi analizi araştırmalarına yönelilmiştir. Genom ve fonksiyonel genom bilimindeki gelişmeler; bitki hücresindeki gen, protein ve metabolit tanılarına olanak sağlarken, fonksiyonel yollarda yer alan genlerin, işlevlerinde ve ifadesinde toplu (DNA çip, RNA dizileme) ve bireysel analizleri (Nouthern Blot, Real-time PCR analizi) farklı doku ve organlarda mümkün kılmıştır. Güncel anlamda, ziraat açısından bir türe ait popülasyonda bir genin ifadesi Real-time PCR (Quantitative real-time RT-PCR, Eş zamanlı PCR) yaklaşımları (Bustin vd. 2005) ile taranırken, genom boyutunda bir fonksiyondan sorumlu genlerin tespiti ve ifade analizleri RNA dizileme (RNA sequencing) yöntemi kullanılarak yapılmaktadır (Malone ve Oliver 2011). Bademde gen ifadelerine ve gen fonksiyonlarına yönelik ise *RNase PD2* geni ifadesini (Ma ve Oliveira 2000), gıda alerjisi *Pru du 4* gen ifadesini (Zhang vd. 2014), kuraklık stresi (Campalans vd. 2001, Barros vd. 2010, Alimohammadi vd. 2013), sürgün meristem oluşumu (Santos vd. 2012) konularında çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bademde çiçeklenme zamanı - soğuğa toleransın birlikte ele alındığı bu tezin konusunu kapsayan iki alanda gen adayları ile ilgili çalışmalara bakıldığında genetik haritalama-MDS (MAS) kökenli markır tespiti çalışmaları bulunmaktadır. Kantitatif özellik lokuslarının (QTL'ler) bademde çiçeklenme zamanı ile ilişkili olduğuna yönelik ilk çalışmalar izoenzimlerle yapılmıştır. Bazı izoenzimler ile çiçeklenme zamanı arasında bir ilişki bulunmuş, bu izoenzimlerin, yeni fidelerde yetiştirme programlarından erken seçim yapmak için kullanılabilmesi öne sürülmüştür (Asins vd. 1994). Bugüne kadar bademde geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili aday genlerin belirlenmesine yönelik genetik haritalama çalışmaları gerçekleştirilmiş (Ballester vd. 2001, Silva vd. 2005, Sanchez-Perez vd. 2007, Martinez-Gomez vd. 2012, Sanchez-Perez vd. 2012), somut veri olarak popülasyonların taranabileceği *Lb* geni ile ilgili RAPD kökenli bir MAS markır olan OPK10 (Ballester vd. 2001) ve SSR kökenli bir markır olan UDP96003 (Rasouli vd. 2014) tespit edilmiştir. Yine çiçeklenme zamanı-soğuklama ihtiyacı-sıcaklık isteği ile ilişkili QTL-genetik haritalama çalışmaları şeftalide (Chaparro ve

Beckman 2008, Fan vd. 2010), kayısıda (Tzonev ve Erez 2003, Olukolu vd. 2009, Campoy vd. 2011b) ve kirazda da (Quero-Garcia vd. 2010) gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda sert kabuklu-çekirdekli genlerinin ifade analizleri, çalışmaların esas odak noktasını oluşturmaktadır. Şeftali başta olmak üzere, sert çekirdekli meyve türlerinde her ne kadar genom ve fonksiyonel genom çalışmaları daha fazla ilerleme sağlamış ise de (Verde vd. 2012), sert kabuklu meyve türlerinde çalışmalar henüz başlatılmıştır. Özellikle önemli bitkisel özelliklere yönelik genlerin, gerek populasyon taramalarında kullanımı gerekse genlerin klonlanmasında ilk başlangıcı oluşturan ifade analizi deneyimlerinde sert çekirdekli-kabuklu türlerinde bulunan genlerde gen homolojilerinden yararlanılarak her bir türe özel spesifik çalışmalara gidilmiştir. Bu kapsamda bademde çiçeklenme zamanı (Silva vd. 2005), kurağa tolerans (Campalans vd. 2001, Barros vd. 2010, Alimohammadi vd. 2013), soğuğa tolerans (Barros vd. 2012, Mousavi vd. 2014, Alisoltani vd. 2015); şeftalide çiçeklenme zamanı (Martin vd. 2006, Bielenberg vd. 2008, Jimenez vd. 2010, Yamane vd. 2011, An vd. 2012, Wells vd. 2015), meyve kalitesi (Rahim vd. 2014, Zhou vd. 2015), kurağa tolerans (Eldem vd. 2012), hastalıklara dayanım (Lalli vd. 2005, Lee vd. 2010, Sherif vd. 2013, Rubio vd. 2015); kayısıda soğuklama isteği (Trainin vd. 2013), hastalıklara dayanım (Zuriaga vd. 2013) ve meyve olgunlaşması (Manganaris vd. 2011); kirazda çiçeklenme zamanı (Wang ve Pijut 2013), meyve kalitesi (Alkio vd. 2014, Shen vd. 2014); vişnede don toleransı (Owens vd. 2002); Japon eriklerinde meyve olgunlaşması (El-Sharkawy vd. 2009) üzerine türler arasında gen bölgelerini/gen homolojilerini belirleme ve ifade analizleri konularında da araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Bademde soğuğa tolerans konusunda yürütülen çalışmalarda ise düşük sıcaklık koşullarında devreye giren ‘C-repeat binding’ faktörünün (CBFs) *Arabidopsis thaliana*'daki tanımlanması yapılmıştır (Gilmour vd. 1998, Medina vd. 1999). Yine stres genlerinin kontrol bölgesinde (promotör) görev alan ‘dehydration-responsive element-binding faktörleri’ (*DREBI*) belirlenmiştir (Liu vd. 1998). Bu konuda yürütülen en önemli çalışmalardan birisi ise Barros vd. (2012) tarafından

gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada, bademde soğuğa tolerans ile ilişkili *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN1* genlerinin çiçek tomurcuklarındaki ifadesi araştırılmıştır. Bu çalışmada ilk yıl Kasım ayından sonra *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN1* transkriptlerinin seviyelerinin arttığı, Ocak ayından sonra dūřmeye başladığı, 2. yıl ise *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN1* transkript birikimlerinin Ocak ayında dūřtüđu görülmüştür ve her iki yılda kış ayları boyunca gen ifadesindeki dūřüřün, vejetatif tomurcuk oluşumun zamanı ile uyum gösterdiği görülmüştür. *Prunus mume* üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, *PmCBFa*, *PmCBFb* ve *PmCBFc* genlerinin 168 saat dūřük sıcaklıkta tutulmasıyla kontrole göre bitkilerde mRNA içeriğini (gen ifadesinin) daha yüksek belirlemişlerdir. Kış sonunda *P. mume*'un çiçek tomurcuklarındaki daha az transkriptleri (mRNA, veya gen ifade oranlarının) olan *PmCBFc* geninin mRNA içeriği 168 saat dūřük sıcaklık uygulamasından sonra, *PmCBFa* ve *PmCBFb* genlerinin mRNA içeriklerinden daha dūřük bulunmuştur (Guo vd. 2014).

Ilıman iklim meyve türleri içerisinde en erken çiçeklenen tür olan bademde, özellikle ilkbahar geç donları nedeniyle önemli zararlar ve ürün kaybı ile karşılaşılmaktadır. Bu yüzden ilkbahar geç donlarının sıklıkla karşılaşıldığı bölgelerde badem yetiştiriciliği ekonomik anlamda mümkün olamamaktadır. Sorunun çözüme yönelik olarak, özellikle riskli bölgelerdeki badem yetiştiriciliğinde geç çiçeklenen ve soğuğa toleranslı olan çeşitlerin kullanılması önemlidir. Bu durum, ışlah çalışmalarında geç çiçeklenen ve soğuklara toleranslı olan genotiplerin/çeşitlerin belirlenmesi önceliğini getirmiştir. Bunun için de çiçeklenme ve soğuğa tolerans mekanizmalarının gerek fizyolojik gerekse moleküler düzeyde açıklanması önemlidir. Mekanizmaların tanımlanması, ileride yapılacak ışlah çalışmalarında, geç çiçeklenme ve/veya soğuğa tolerans gibi özellikleri taşıyan genlerin belirlenmesi, aktarımlarının yapılabilmesi gibi konularda önemli katkılar sağlayacaktır. Bu konulardaki fizyolojik ve moleküler yaklaşımlar ve yapılan araştırmalar, genel çerçevede ve badem türü özelinde aşağıda sıralanmıştır.

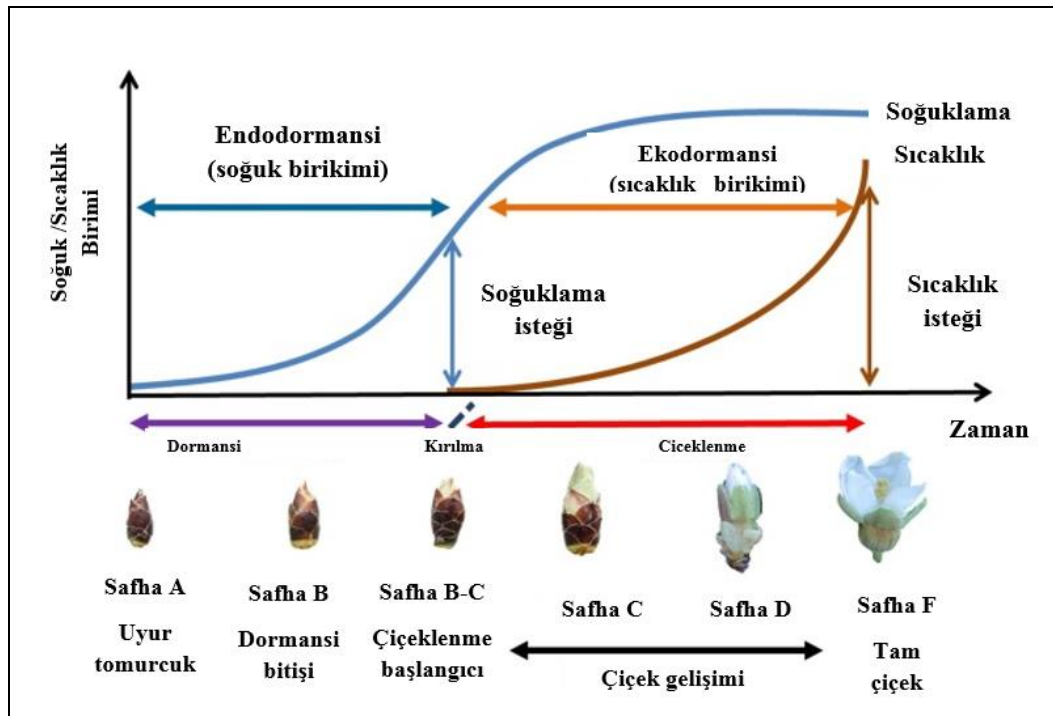
2.3 Bitkilerde Çiçeklenme Zamanı ve Fizyolojik Esasları

Çiçeklenme zamanı meyve türlerinde önemli bir özellik olup, çiçeklenme dönemi boyunca iklim koşullarının iyi olması ve yetiştiriciliği yapılan esas çeşitlerle tozlayıcı çeşitlerin çiçeklenme başlangıç ve sürelerinin eş zamanlı olması gerekmektedir. Çoğu meyve türünün yabancı tozlanmaya gereksinim duyduğu da dikkate alındığında, çeşitlerin çiçeklenme zamanlarının önemi daha da belirginleşmektedir. Ayrıca, çiçeklenme zamanında görülen yağışlar tozlanma sürecini olumsuz yönde etkilemektedir ve bu süreçte görülen ilkbahar geç donları verimi önemli ölçüde azaltmaktadır (Özbek 1978). Bu nedenlerle, geç çiçeklenme özelliği badem ıslah programlarının hemen tamamının amacını oluşturmaktadır.

Yapraklarını döken meyve ağaçları uyanmalarını takiben; çiçeklenme, yapraklanma, meyve verme, gelişme ve kış dinlenme periyodu geçirmektedirler. Kış dinlenmesine giriş ve dinlenme süreci, ağaçların kışın düşük sıcaklıklardan kaynaklanabilecek olası zararları önlemek için hazırlandıkları ve düşük sıcaklıklara dayanarak yaşamlarını sürdürdükleri bir dönemdir. Bu bitkiler böylece iklimsel gereklilikleri yerine getirildiğinde ve yeni bir büyüme dönemi başlayabildiğinde harekete geçen, çevreye bağımlı bir mekanizma geliştirmiştir. Bu mekanizma, sonbaharda ve kış başlangıcında bitkinin dinlenmesini kıran soğuklamanın birikimine dayanmaktadır. Sıcaklık daha sonra çiçek ve vejetatif tomurcukların gelişimini desteklemektedir (Şekil 2.1). Bitkisel üretim, dormansi mekanizmasından, sert iklim koşullarında hayatta kalma şansını artırarak ve büyüme mevsiminde ise çiçek ve meyve gelişimini etkileyerek yararlanmaktadır (Campoy vd. 2011a, Martinez-Gomez vd. 2017).

Çalışmaların çoğu, soğukun, dormansinin kırılmasında en önemli belirleyici faktör olduğunu ve bu nedenle çiçeklenme zamanından sorumlu olduğunu göstermektedir (Tabuenca 1972, Tabuenca vd. 1972, Egea vd. 2003, Sanchez-Perez vd. 2012).

Lang vd. (1987)'ne göre üç farklı dormansi türü bulunmaktadır. *a*) Tomurcuk içindeki kontrol faktörlerine bağlı endodormansi; *b*) uyuyan tomurcuk dışındaki ajanlar tarafından kontrol edilen paradormansi ve *c*) soğuklama isteği dengelendikten sonra sıcaklığa bağlı olarak ekodormansi (Şekil 2.1). Soğuklama isteği bu nedenle endodormansi süresini etkilemektedir ve yüksek soğuklama isteği uzun endodormansiye yol açarken, düşük soğuklama isteği kısa süreli endodormansiye sebep olmaktadır (Campoy vd. 2011a, Martinez-Gomez vd. 2017).



Şekil 2.1 Tomurcuk dinlenmesinin kırılması ve çiçeklenme (Prudencio vd. 2018)

Dormansi başlangıcında çiçek oluşumu tamamlanmıştır (Lamp vd. 2001). Endodormansi sırasında tomurcuk büyümesi sabittir ancak zorlukla farkedilebilmektedir. Düşük sıcaklıklar endodormansinin tamamlanmasını etkileyen en önemli faktördür, ancak sıcaklık, fotoperiyot, ışık yoğunluğu ve nem gibi diğer iklim faktörleri de endodormansi gelişimini etkileyebilmektedir (Freeman ve Martin 1981). Yeterli soğuklama sağlandıktan sonra, endodormansi tamamlanarak yerini

ekodormansiye bırakmaktadır. Endodormansinin sona ermesi, soğuklama isteğinin tamamlanmasıyla örtüşmektedir ve gözle görülür bir değişiklikle sürdürülemediği kabul edilmektedir. Ekodormansi boyunca, çiçek tomurcuklarının gelişimi çoğunlukla sıcaklık birikimine bağlıdır. Sıcaklık ünitelerinin birikimi, endodormansinin kırılması da dahil olmak üzere çoğu bitkinin aktif gelişme süreçlerinde önemlidir (Sherman ve Rodriguez-Alcazar 1996). Ekodormansi başladığında, tomurcuk gelişme hızı uygun gelişme sıcaklıklarına bağlıdır ve Akdeniz iklimlerinde kışın son aşamalarında ılık sıcaklıklarla önemli ölçüde artabilmektedir (Kester ve Gradziel 1996, Westwood 1978).

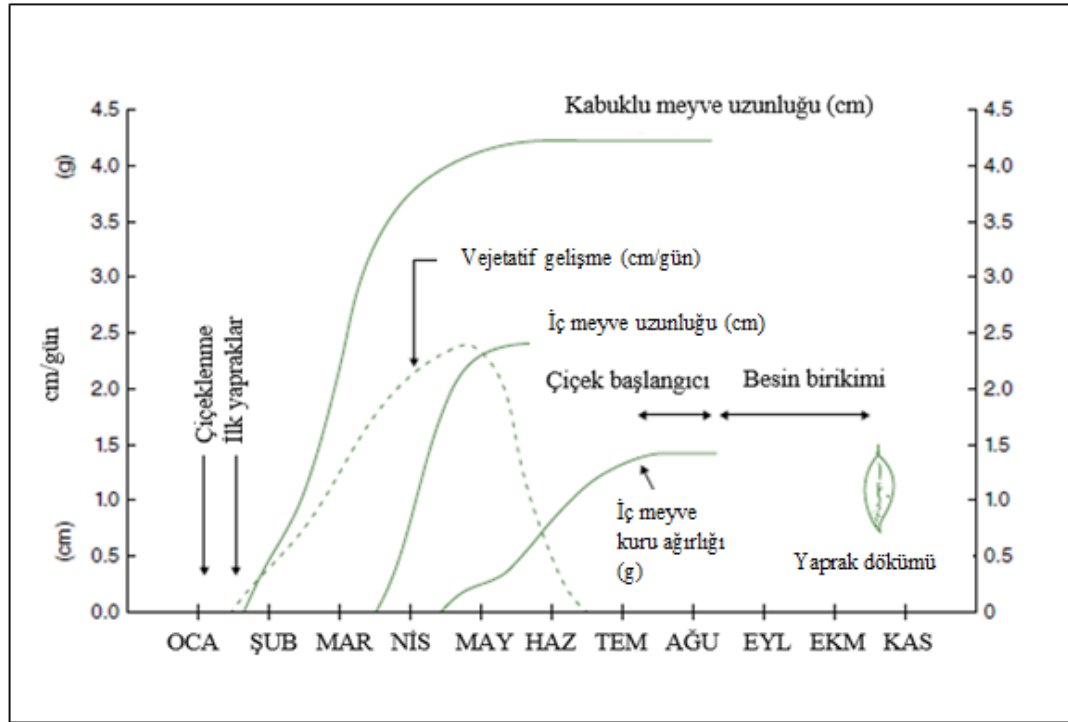
Soğuklama isteği, farklı sıcaklık aralıklarının bir fonksiyonu olarak biriken soğuk birimi (CU= Cold unit) olarak hesaplanır (Richardson vd. 1974). Her çeşidin soğuklama isteği o çeşidin dormansisini kırmak için gerekli olan kadardır. Soğuklama isteği bu nedenle her çeşide özgü çok önemli bir özelliktir (Egea vd. 2003, Ruiz vd. 2007, Campoy vd. 2011a) ve dormansi süresinin uzunluğunu belirler. Öte yandan, sıcaklık isteği, santigrat (C°) cinsi ortalama saatlik ısı derecesinden 4.5 puan çıkarılarak büyüme derecesi (GDH= Growing Degree Hours) olarak hesaplanır (Richardson vd. 1974). Her bitki türünün ve aynı tür içindeki çeşitlerin soğuklama ve sıcaklık istekleri birbirinden farklıdır.

Dormansinin kırılması üzerine soğuklama isteğinin etkisi, karmaşık ve iyi çalışılmış bir konu olsa da (Couvillon ve Erez 1985, Scalabrelli ve Couvillon 1986, Erez ve Couvillon 1987), her çeşidin spesifik sıcaklık isteklerine yönelik çalışmalar daha az sayıdadır ve sıcaklık isteklerinin çiçeklenme süresi üzerindeki etkisi daha az netlik kazanmıştır (Rom ve Arrington 1966, Couvillon ve Erez 1985, Citadin vd. 2001).

2.3.1 Bademde çiçeklenme özellikleri ve zamanı

Bademde çiçeklenme zamanı, özellikle erken çiçeklenen çeşitlerde, üretimi etkileyen ilkbahar geç donlarının zararını önlemek için belirleyici olan önemli bir bitkisel

özelliğidir. Badem, diğer sert çekirdekli meyve türleri gibi (şeftali, erik, kayısı, kiraz) yapraklarını döken bir türdür ve badem ağaçları her yıl dinlenme döneminin bitimiyle birlikte çiçeklenme-yapraklanma, tozlanma-döllenme, meyve oluşumu ve gelişimi, yaprak dökümü, dinlenmeye hazırlık dönemi ve dinlenmeye giriş süreçlerini düzenli olarak geçirirler (Şekil 2.2). Yüksek sıcaklıklarda daha kısa ve soğuk iklimlerde daha uzun olsa da, çiçeklenme süresi genellikle kısadır. Bununla birlikte, süreç aylar öncesinden tomurcukların oluşması ve dinlenmenin indüksiyonu ve kırılması ile başlamakta (Şekil 2.1) ve çiçeklerin açılması ile sona ermektedir (Felipe 2000).



Şekil 2.2 Bademin yıllık gelişim safhaları (Socias i Company vd. 2017)

Soğuklama isteği, bademde ve diğer *Prunus* türlerinde sıcaklık isteğinin aksine çiçeklenme zamanını belirleyen ana faktör olarak kabul edilmektedir (Egea vd. 2003, Ruiz vd. 2007, Albuquerque vd. 2008, Atkinson vd. 2013, Sanchez-Pérez vd. 2012, 2014). Bademin soğuklama ihtiyacı, diğer ılıman iklim meyve türlerine göre çok daha az olduğu için, bu türde zorunlu dinlenme koşullarının ortadan kalkması ile birlikte

çiçeklenme erken gerçekleşmektedir. Bu nedenle de, özellikle ilkbahar geç donlarının görüldüğü bölgelerde yetiştiriciliği sınırlanmış bir türdür (Ma ve Oliviera 2000, Sathe vd. 2002, Yi vd. 2003, Samani vd. 2005, Arus vd. 2009).

Tabuenca (1972), badem çeşitlerinin soğuklama isteklerini 7 °C'nin altındaki saatler olarak belirlemiştir. Ayrıca, badem çeşitlerinin çiçeklenme için sıcaklık isteklerini de tanımlamışlardır (Tabuenca vd. 1972). Bazı badem çeşitlerinde çiçeklenme için soğuklama ve sıcaklık istekleri Çizelge 2.1'de belirtilmiştir (Alonso vd. 2005, Alonso ve Socias i Company 2009, Alonso 2017).

Egea vd. (2003), badem türlerinde çiçeklenme zamanının tamamını temsil eden 10 çeşitte soğuklama ve sıcaklık isteklerini Richardson vd. (1974)'nin metodunu kullanarak incelemişlerdir. Araştırmacılar bu çeşitlerde, çiçeklenme zamanı ile ilişkili soğuklama isteği bakımından, Tunus çeşidi Achaak'tan (266 CU) Fransız seleksiyonu R1000 (996 CU)'a kadar önemli farklılıklar gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, çeşitler arasında sıcaklık istekleri bakımından daha düşük değişkenlik saptamışlardır (5942 GDH - 7577 GDH). Araştırmacılar, çiçeklenme zamanının esas olarak soğuklama isteği ile belirlendiği sonucuna varmışlardır.

Alonso vd. (2005), bademde, çalışmalarının yapıldığı soğuk bölgedeki çeşitlerin sıcaklık isteklerinin (5460 ile 9300 GDH arasında) soğuklama isteklerinden (400 ile 600 CU arasında) daha büyük bir etkiye sahip olduğunu iddia etmişlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Bazı badem çeşitlerinde çiçeklenme için soğuklama ve sıcaklık istekleri (Alonso vd. 2005, Alonso ve Socias i Company 2009, Alonso 2017)

Çeşit	CU	GDH(°C)
Ayles	487	7951
Belona	353	7741
Bertina	468	8587
Blanquerna	468	6949
Cambra	468	7863
Cristomorto	428	8152
Desmayo Largueta	428	5545
Felisia	428	9363
Ferragnes	454	8082
Guara	468	8001
Laurenne	428	8671
Marcona	428	6703
Mardia	503	10233
Masbovera	428	7863
Moncayo	468	8760
Ne Plus Ultra	468	6414
Nonpareil	403	7918
Picantili	428	7481
Primorski	428	8468
Ramillete	454	5998
Soleta	340	7872
Titan	444	8457
Teksas	368	7863
Tuono	468	8001
Yaltinski	468	8587

Bitkilerde soğuk zararından kaçınma ve çiçeklenmenin geciktirilmesi; genellikle soğuklama isteğinin ve/veya soğuklama süresi bitiminde dinlenmenin kesildiği dönemdeki sıcaklık isteğinin artırılması ile gerçekleşmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde; İspanyol çeşitlerinden ‘Felisia’, ‘Moncayo’, ‘Guara’, ‘Cambra’, ‘Aylés’ ve ‘Masbovera’ ile Fransız çeşitlerinden ‘Ferragnes’, ‘Ferralise’ ve ‘Lauranne’nin yüksek; ‘Desmayo Largueta’, ‘Marcona’, ‘Ramillete’, ‘Constantini’ ve ‘Pou de Felanitx’ gibi geleneksel çeşitlerin ise düşük sıcaklık isteği gösterdikleri bilinmektedir.

Eğer bir çeşit adapte olduğu bölgeden daha soğuk bir iklimde yetiştirilmesi veya geleneksel olarak yetiştirildiği bölgede olağandışı soğuklarla karşılaşması gibi nedenlerle, ihtiyaç duyduğu soğuklama süresinden daha uzun süre soğuklara maruz kalırsa; kendine özgü soğuklama ihtiyacını tamamlamış halde olması nedeniyle, sıcaklıkların kısa süreli yükselmesi durumunda dinlenmeden çıkarak uyanır. Ancak peşinden devam eden soğuklara maruz kalan patlamış, yeni açmış tomurcuklar, çiçekler gibi su kapsamı yüksek olan organlar ilkbahar geç donlarından önemli düzeyde zarar görür. Buna karşın, soğuklama ihtiyacını yeterince karşılayamayan bitkilerde ise çiçeklenme ve meyve verme gecikir ve yeterli meyve alınamaz, yapraklanma gecikir ve düzensiz olur.

Bademin soğuklama isteği düşük olduğundan, çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde sıcaklık isteğinin soğuklama isteğinden daha önemli bir belirleyici olduğu belirtilmiştir. Bu durumda çiçek tomurcukları, yüksek soğuklama etkinliğine sahip sürekli düşük sıcaklıklar ile aşırı miktarda soğuklamaya maruz kalırlar. Sonuç olarak endodormansi safhası kısalmış ve soğuklama isteği çoğu badem çeşidinde çok kısa sürede tamamlanır (Rattigan ve Hill 1986, Alonso vd. 2005). Tabuenca vd. (1972), soğuklamanın gerçekleştiği aynı zamanda sıcaklık birikiminin başladığı kış aylarında, badem genotiplerinin son çiçeklenme tarihinin her genotipin sıcaklık isteği ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu belirtmiştir.

Çiçeklenme dönemi; aslında türün/çeşidin, orjini olduğu bölgeye özel adaptasyonlara cevap vermesidir. Yabani badem türlerinin çiçekleri, her bölgede düşük ve yüksek sıcaklıkların oluşturduğu iklimsel yapıya karşılık olarak, çiçeklenmenin tozlanma ve tohum üretimi için elverişli bir ortamda gerçekleşmesini sağlar. Genetik olarak belirli bir bölgedeki ekolojik koşullara uymayan bitkiler, yeterli bir şekilde tozlanamaz veya çiçeklerini donmalarından dolayı kaybederler. Bu tür bitkiler tohum üretmez ve böylece soyları tükenir. Dahası, yabani badem türlerinin çoğu kendine uyumsuzdur, bu

nedenle tozlaşma ve meyve tutumu için farklı badem çeşitlerine ihtiyaç duyarlar (Alonso 2017).

Kültürü yapılan bademde çiçeklenme, türlerin yaşamı açısından farklı bir anlama sahiptir. Yetiştiriciler, ağaçlarda tozlanmanın olabildiğince etkili olmasını sağlamak için çiçeklerin en uygun zamanda açmasını, çiçeklerin dondan korunmalarını ve yüksek oranda meyve elde edilmesini istemektedirler. Böylece her çeşidin çiçeklenme zamanı, çiçeklenmenin meydana geleceği çevresel koşullar ve çevresel koşulların yetiştiricilik üzerindeki etkisi ile belirlenmektedir. Genel olarak en erken çiçeklenmeler daha az uygun hava koşulları (düşük sıcaklıklar, yağmur, rüzgar ve sis) ile, geç çiçeklenmeler ise daha uygun hava koşulları ile birlikte meydana gelmektedir. (Gurdian ve Biggs 1964). Badem türü; çevreye, sıcaklığa ve suyun kullanılabilirliği gibi diğer faktörlere bağlı olarak her bölgede ideal çiçeklenme zamanını seçmiştir.

Çiçeklenme zamanı, bademin yayılma ve yetiştirme alanlarını belirleyen en önemli kriterdir. Bu özelliğin çeşitlere göre değişkenlik göstermesine bağlı olarak, bademin yayıldığı alanlar da çeşitlilik göstermektedir. Bademin eski yıllarda uzun süre tohumla çoğaltılması nedeniyle, çiçeklenme zamanı bakımından farklı özellikler gösteren geniş bir populasyon oluşmuştur. Ancak zaman içerisinde gerçekleşen doğal seleksiyonlarla; soğuk bölgelerdeki populasyonlar dondan kaçınmak ve hayatta kalmak için çiçeklenme zamanlarını geciktirirken, daha sıcak bölgelerde buna gerek kalmamış ve buradaki badem populasyonları daha erken zamanda çiçeklenme zamanlarına sahip olmuştur. Böylece, farklı iklim özelliklerine bağlı olarak her bölgeye özgü çiçeklenme zamanları ortaya çıkmıştır. Bir diğer deyişle; doğa, aynı ortamda yetişen ilk genotiplerden benzer çiçeklenme zamanları ile yavaş ama düzenli bir çalışma yapmış, bölgelere uygun olan genotipleri belirlemiştir. Bu adaptasyon sürecinin bir sonucu olarak, yabani badem türlerinde çiçeklenme zamanı bakımından tür içi ve türler arası önemli düzeyde çeşitlilik bulunmaktadır (Dicenta vd. 2017).

Yabani badem türlerinde yapılan farklı çalışmalar bu çeşitliliği doğrulamaktadır. Grasselly ve Crossa-Raynaud (1980), *Amygdalus bucharica* ve *Amygdalus fenzliana* türlerinin, ıslahçılar tarafından çiçeklenme zamanını geciktirmek için ıslah çalışmalarında kullanıldığını bildirmektedir. Felipe (2000), *Prunus communis*'in erken çiçeklendiğini, *Prunus fenzliana* ve *Prunus bucharica*'nın ise orta-geç çiçeklenme özelliğinde olduğunu belirtmiştir. Gradziel vd. (2001), *Prunus fenzliana*, *Prunus bucharica* ve *Prunus argentea*'nın yüksek soğuklama gereksinimlerine dikkat çekmiştir. Ayrıca, Sorkheh vd. (2007) çiçeklenme zamanının düzenli çeşitliliğini çok erkenciden çok geçciye, 18 yabani badem türünde belirlemiştir.

İnsanoğlunun bademde çiçeklenme zamanının değişkenliğine ilk katkısı; yetiştiriciler tarafından her bir bölgeye adapte olmalarına göre genotiplerin seçilerek uzun süre uygulanmasıdır. Bu durum yerel genotipler arasında gözlenen geniş çeşitliliği ortaya çıkarmıştır. Ancak, çevrenin etkisine rağmen, bademdeki çiçeklenme zamanının çeşitliliğine en fazla katkıda bulunan şey, insanlar tarafından yapılan ıslah olmuştur. İnsan, farklı coğrafi kökenlerden gelen ve farklı çiçeklenme zamanlarına sahip badem çeşitlerini melezleyerek doğal süreçleri şekillendirebilmiştir (Dicenta vd. 2017).

Islahçılar ve yetiştiriciler badem kültürü yapılan her bölgenin iklimine adapte olmuş çeşitler belirlemiştirlerdir. Çiçeklenme zamanının ekonomik yetiştiricilik için önemli olması nedeniyle, bu özelliğin genetik kontrolü üzerine birçok çalışma yapılmış ve her bir bölge için uygun çiçeklenme zamanlarına sahip yeni çeşitler piyasaya sürülmüştür. Islahçılar, badem yetiştiriciliğini soğuk iç bölgelere veya erken çiçek açan çeşitlerin dondan etkilendiği yüksek bölgelere yaymak için çabalarını çiçeklenme zamanını geciktirme üzerine yoğunlaştırmışlardır (Dicenta vd. 2017).

Erken çiçek açan çeşitler: Akdeniz bölgesinde Ocak ayının sonlarında veya Şubat ayının başlarında çiçek açarlar. Her bir bölgede üreticiler tarafından yüzyıllarca yapılan seleksiyonlarla genetik orjini bilinmeyen geleneksel çeşitlerdir (Dicenta vd. 2017).

Geç çiçek açan çeşitler: Bu çeşitler, erken çiçek açan çeşitlerden 20-30 gün sonra çiçek açmaktadır ve genellikle ıslah programlarıyla oluşturulmuş çeşitlerdir (Dicenta vd. 2017).

Ekstra-geç çiçek açan çeşitler: Bu çeşitler erken çiçek açan çeşitlerden 50-60 gün sonra çiçek açmaktadır. Genellikle ıslah programlarında daha önce elde edilen seleksiyonlardan melezlenerek elde edilmişlerdir (Dicenta vd. 2017).

Yetiştiriciliği yapılan önemli bazı standart çeşitlerin çiçeklenme zamanları Çizelge 2.2’de verilmektedir.

Çizelge 2.2 Önemli bazı standart badem çeşitlerinin çiçeklenme zamanları

Çiçeklenme Zamanı	Çeşit	Literatür
Çok Erken	Avola, Cavaliera, Desmayo Largueta, Ramillete, Hacialibey	Vargas ve Romero 2001
Orta-Erken	Aldrich, Carmel, Fritz, Harvey, Marcona, Merced, Nonpareil, Price	Vargas ve Romero 2001
Erken	Achaak, Abundancia, Ardechoise, Atocha, Akbadem, Chellaston, Garrigues, Peerless, Price, Jordanolo, Ne Plus Ultra, Milow, 48-1, Sonora, I.X.L	Küden vd. 2014, Dicenta vd. 2017
Orta-Geç	Cristomorto, Genco, Picantili, Drake	Vargas ve Romero 2001, Küden vd. 2014
Geç	Antoneta, Ayles, Butte, Belona, Cambra, Carmel, Guara, Glorieta, Masbovera, Marta, Moncayo, Soleta, Vairo, Ferrraduel, Ferragnes, Primorski, Texas, Tuono, Laurene, Titan, Marinada, Moncayo, Nikitskij, Tarraco, Tardy Nonpareil, Felisia, Ruby, Thompson, Padre, Gülcan1	Vargas ve Romero 2001, Küden vd. 2014, Dicenta vd. 2017
Extra-Geç	R1000, Garbi, Penta, Mardia, Tardona, Yaltinski	Vargas ve Romero 2001, Dicenta vd. 2017

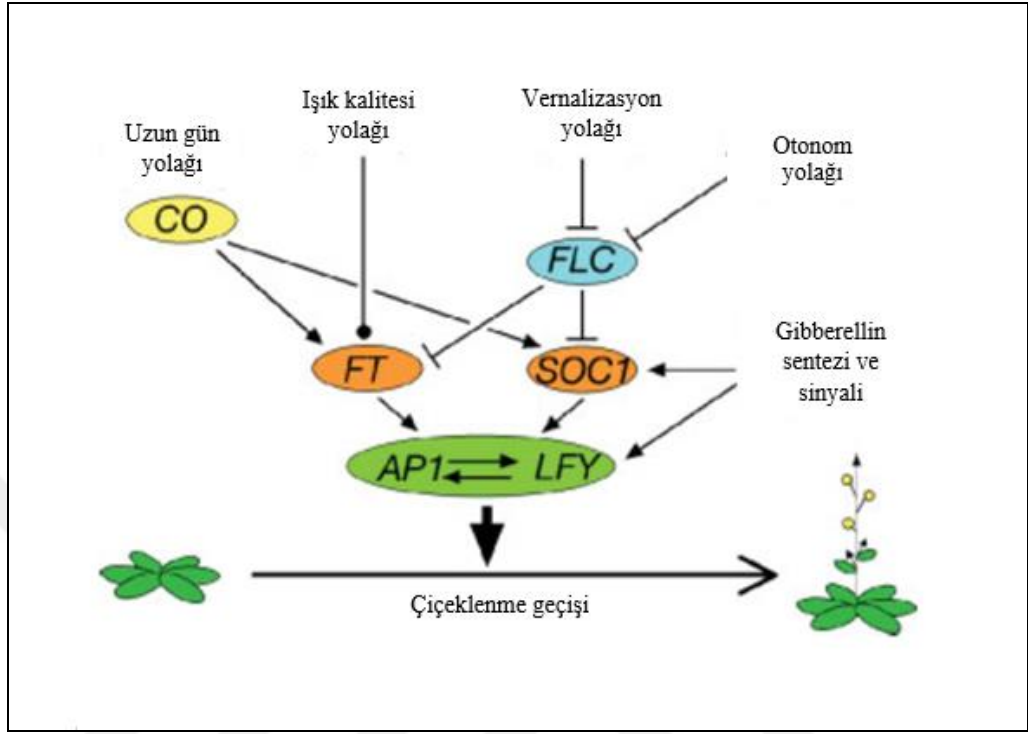
2.4 Çiçeklenme Zamanının Genetik Kontrolü

Meyve ağaçlarının uzun süren gençlik kısırlığı ve yıldan yıla gen ifadesini etkileyen çevresel koşulların etkisi nedenleriyle; karmaşık ve heterozigotik bir özellik olan çiçeklenme zamanının değerlendirilmesi uzun süren bir işlemdir. Bu özellik soğuklama ve sıcaklık isteği arasındaki korelasyonun bir sonucudur. Sanchez-Perez vd. (2012)'nin soğuklama ve sıcaklık isteğinin kalıtımı üzerindeki çalışmalarında; çalışılan dölde soğuklama isteğinin bi-modal dağılımı (çift dağılım: istatistik biliminde sürekli olasılık dağılımı olup iki tepe değer arasında bir frekans dağılım eğrisi), *Lb* geninin varlığıyla açıklanmıştır. İçsel dormansinin kırılması için soğuklama isteğinin kantitatif kalıtımı şeftali çiçek tomurcuklarında ve kayısı vejetatif tomurcuklarında gözlemlenmiştir. Bu türlerde, çiçeklenme zamanı üzerine soğuklama isteğinin daha yüksek etkisi ve tek resesif genin (*EVG*) soğuklama ve sıcaklık toplamıyla ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Çiçeklenme zamanı, içsel dormansinin kırılması için soğuk hava koşullarına bağlıdır (Lang vd. 1987) ve soğuklama isteğindeki farklılıklarla (Tabuenca 1972) ve genotipler arasındaki sıcaklık isteği (Tabuenca vd. 1972) ile ilişkilidir. 'Tardy Nonpareil' badem çeşidinde çiçeklenme zamanı özelliğini kontrol eden dominant bir genin (*Lb*) tanımlanmasına rağmen, çoğu meyve türlerinde özellikle kayısı (Courajou 1995) ve şeftali (Hansche vd. 1972) gibi diğer *Prunus* türlerinde kantitatif özellik olarak düşünülmektedir (Anderson ve Seeley 1993). Geç çiçeklenme özelliğini kontrol eden *Lb* geninin geç çiçeklenen mutant bir Nonpareil'den geldiği bildirilmiş ve Tardy Nonpareil'in bazı melezlerinde çalışıldığında bu özelliğin kantitatif olarak daha küçük genler tarafından modifiye olduğu belirtilmiştir (Kester 1965, Grassely 1978, Socias i Company ve Felipe 1999, Sanchez-Perez vd. 2007).

Bademin çiçeklenme zamanı yüksek kalıtmıdır, bu durum geç çiçeklenen genotiplerin, çeşitlerin melezlenmesi sonucunda geç çiçeklenen melezlerin meydana gelmesini sağlayacaktır. Bademde çiçeklenme zamanının aktarılması üzerindeki sonuçların çoğu, bu kantitatif özelliğin kalıtım oranının % 80'den (Kester vd. 1973) % 67'ye (Dicenta vd. 1993) kadar değiştiğini göstermektedir.

Çiçeklenme zamanından sorumlu olarak tanımlanan birkaç transkripsiyon faktörü genine rağmen çiçeklenme zamanı ile ilişkili gen ifadesi ile ilgili çalışmalar az sayıdadır. Çiçeklenme zamanının genetik temelleri ile ilgili çalışmalar daha çok, uzun gün bitkisi olan *Arabidopsis thaliana*'da gerçekleştirilmiştir. Arabidopsiste çiçeklenme zamanını düzenleyen 60'dan fazla genin olduğu bildirilmektedir (Enrenreich vd. 2009). Bu çiçeklenme genleri; temel olarak fotoperiyot (gün uzunluğu), otonom (kendi kendini yöneten), vernalizasyon (soğuklama), giberellin bağımlı yolağı ve bitki yaşı ile ilişkili genler tarafından düzenlenmektedir (Simpson ve Dean 2002, Boss vd. 2004, Sung ve Amasino 2004, Baurle ve Dean 2006, Tang vd. 2016). Bu çiçeklenme mekanizmasında rol oynayan temel genler *CONSTANS (CO)*, *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *LEAFY (LFY)*, ve *APETALA1 (API)* olarak belirtilmiştir (Simpson ve Dean 2002, Parcy 2005).

Arabidopsiste çiçek oluşum sinyalleri 4 önemli çiçeklenme yolaklarından *CONSTANS (CO)* ve *FLOWERING LOCUS C (FLC)* gibi antagonistik olarak çiçeklenme düzenleyicisine taşınmaktadır. *CO* ve *FLC*, genlerin ifadesini, *FT*, *SOC1* ve *LEAFY (LFY)* adındaki çiçeklenme yolak entegratörlerini düzenler (Şekil 2.3). Bu 3 gen, çoklu çiçeklenme yolaklarından gelen sinyalleri entegre eder ve bu genlerin ifade düzeyleri sonunda tam çiçeklenme zamanını belirler (Simpson ve Dean 2002, Parcy 2005). Çiçeklenme zamanıyla ilişkili *FT* ve *SOC1* genleri farklı yolakların genel hedefleridir.

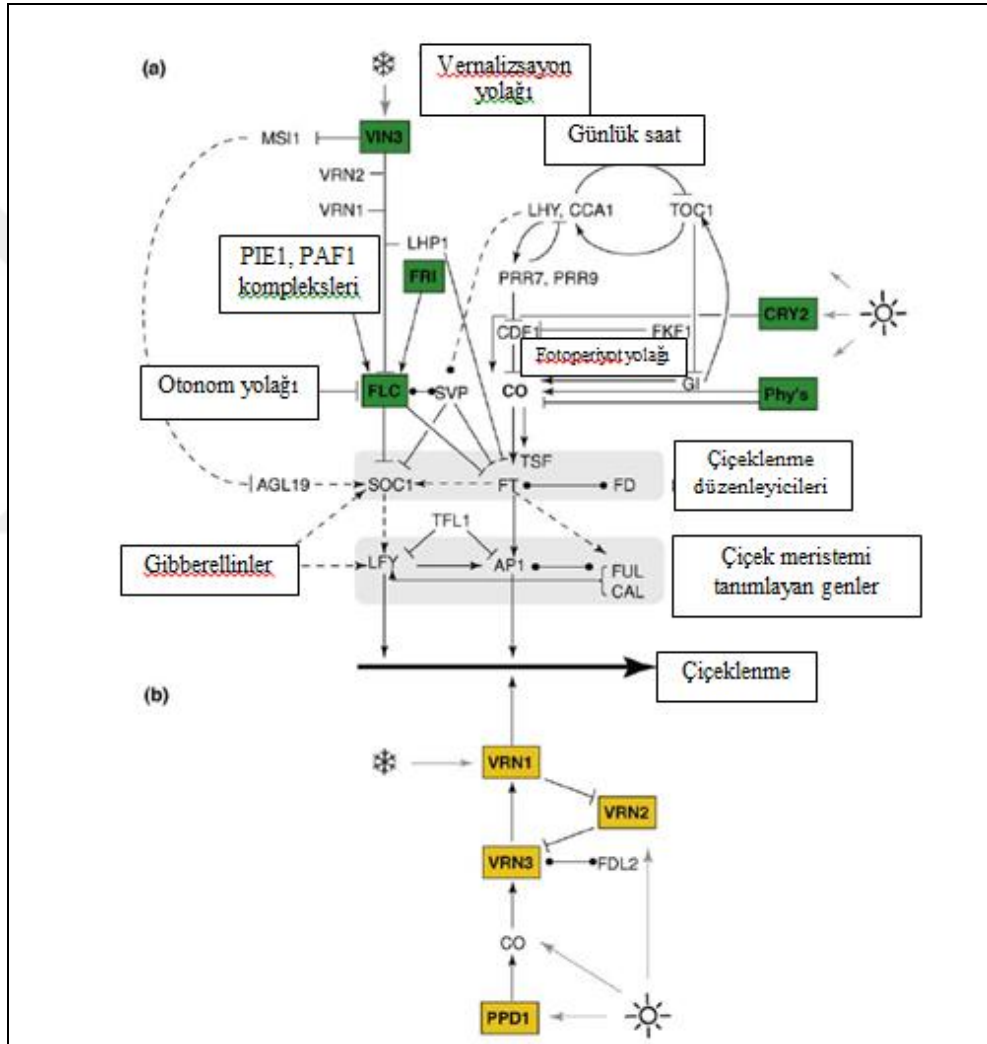


Şekil 2.3 Arabidopsiste çiçeklenme zamanı yolağında rol oynayan temel genler (Putteril vd. 2004)

Işık kalite yolağında görev yapan fotoreseptörler (EKE1, PHYA ve CRY2 vb.) direkt olarak *CO* genine etki ederek, uzun gün koşullarında (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) çiçeklenme zamanını düzenlemektedir. *CO* geni ise, *FT* ve *SOC1* genlerinin direkt olarak ifadesini artırarak çiçeklenmeyi uzun gün koşulunda hızlandırmakta, kısa gün koşulunda (8 saat aydınlık 16 saat karanlık) ise geciktirmektedir. Kısa gün koşulundaki bu gecikmenin sebebi; uzun gün koşulunda *CO* geni ifadesinin *FT* geni ile birlikte aydınlık ortamda düzenlenmesi, kısa gün koşulunda ise karanlık ortamda *FT* geninin ifadesinin artış gösterememesidir (Putteril vd. 2004).

Arabidopsis'te yürütülen bir çalışmada, çiçeklenme mekanizması ile ilişkili diğer bir gen olan *FLC* geninin vernalizasyon ile ilişkili olduğu, vernalizasyon sırasında *FLC* protein düzeyinin azaldığı ve buna bağlı olarak *FLC*-bağımlı çiçeklenmenin engellendiği bildirilmektedir (Putteril vd. 2004). Aynı zamanda *FLC* gen ifadesi

otonom genler tarafından farklı mekanizmalar kullanılarak da baskılanabilmektedir (Putteril vd. 2004). Yapraklarda ifade olan *FLC* geni, *FT* ve *SOC1*'i baskılayarak (Şekil 2.3, 2.4); sürgün ucu meristemindeki *FLC* genleri ise, *SOC1* ve *FD* genlerini baskılayarak çiçeklenmeyi geciktirmektedir (Searle vd. 2006).



Şekil 2.4 Çiçeklenme zamanı kontrolünün Arabidopsis (a) ve Tahıllarda (b) karşılaştırılması (Jung ve Müller 2009)

FT geni, florigen aktivasyon kompleksini (FAC) oluşturan FD'nin transkripsiyonunu aktive eden bir florigendir. FAC, örneğin AP1 gibi çiçek meristemi kimlik genlerinin promotör bölgelerine bağlanmakta, böylece yolak oluşturmaktadır (Taoka vd. 2013). *Arabidopsis thaliana*'da yapraktan apikal meristeme doğru taşınan küçük bir protein kodlayan *FT* (FLOWERING LOCUS T) geni fotoperiyod ve vernalizasyon gibi çiçek oluşum sinyallerini birleştiren önemli bir düzenleyici gen olarak rol oynamaktadır (Abe vd. 2005, Araki 2001, Corbesier vd. 2007, Wigge vd. 2005, Carmona vd. 2007, Endo vd. 2005, Nishikawa vd. 2007). Bu nedenle *FT* proteini çiçeklenmeyi başlatan ve hücre içinde hareket eden 'florigen' adındaki çiçek hormonu için iyi bir adaydır (Şekil 2.4). *FT* Arabidopsiste çiçek entegretörü olduğu için, meyve türlerinde *FT* ortologlarının klonlanması ve karakterizasyonu yapılmıştır (Carmona vd. 2007, Endo vd. 2005, Nishikawa vd. 2007).

TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) ve *FLOWERING LOCUS T (FT)* çiçeklenme zamanının 2 anahtar düzenleyicisidir. Bu genler PEBP ailesine aittir fakat antagonistik (zıt) fonksiyona sahiptir (Sanchez-Perez vd. 2014). *TFL*'nin FD bağlı *API* ve *AG* genlerinin transkripsiyonunu baskılayarak bZIP transkripsiyon faktörü FD ile interaksyona girdiğini, *FT*'nin ise *API* ve *AG* altında aktivasyona sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar *FT* geninin aktivitesinin çiçeklenme zamanının belirlenmesinde *TFL1* geninden çok daha önemli rolü olduğunu, çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde *FT* ve *TFL1* genlerinin ters fonksiyonlara sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Sanchez-Perez vd. 2014, Bianchi vd. 2015).

Çiçeklenme gen ağı ile ilişkili genlerden olan *LEAFY (LFY)*; özellikle çiçek oluşumu, gelişimi ve çiçek taslağı oluşumunda görevlidir. Bu genin ifade seviyesi çiçek oluşumunda belirleyici rol oynamakta olup, özellikle çiçek organ ve çiçek morfolojisi ile ilgili genleri düzenlemektedir (Tang vd. 2016). Arabidopsiste *LEAFY* geninin yüksek seviye ifadesi (over ekspresyon), erken çiçeklenme ve tomucukların çiçek tomucuklarına dönüşümünü tetiklemektedir (Blazquez vd. 1997).

Sepal ve petal oluşumunda görev alan *API* geninin ifadesi, *LFY* geni tarafından aktive edilmektedir. *API* geni çiçeklenme gelişim döneminden bağımsız olarak farklı doku ve organlarda ifade olabilmektedir (Liljegren vd. 1999, Zhou vd. 2019). Bununla birlikte erken çiçeklenme, eğer *APETALA1 (API)* geni yapısal olarak ifade edilirse mümkün olmaktadır (Chi vd. 2011). Yapılan bir çalışmada vişneden (*Prunus avium*) gelen *PsAPI*, arabidopsiste aşırı ifade olduğunda, gençlik periyodunu kısaltarak erken çiçeklenen bir fenotip meydana getirmiştir (Wang ve Pijut 2013).

Diğer bir MADbox transkripsiyon faktörünü kodlayan *SVP* (kısa vejetatif faz), Arabidopsis'te çiçeklenmenin negatif düzenleyicisidir (Hartmann vd. 2000).

Son zamanda yapılan çalışmalar *SOCI*'in sadece çiçeklenme zamanını değil çiçek oluşumu ve çiçek meristemini belirleyen çok fonksiyonel bir protein olduğunu da göstermiştir (Liu vd. 2007, 2009, Melzer vd. 2008, Lee ve Lee 2010, Tao vd. 2012). *CO* ve *FLC* genlerinin *SOCI* gen ifadesini düzenlediği belirtilmiştir (Hepworth vd. 2002, Searle vd. 2006). *SOCI* geninde yapılan mutasyon sonucu oluşan *soci* mutantlarında fonksiyon kaybı ile geç çiçeklenme, kontrol örneklerinde ise aynı gen erken çiçeklenmeyi tetiklemiştir. Yapılan çalışmalarda *SOCI* geninin temel olarak gelişmekte olan yapraklarda ve meristemlerde ifade olduğunu ve ifade düzeyinin bitki gelişim yaşına göre arttığını göstermiştir (Samach vd. 2000).

SOCI gen ifadesinin *SVP-FLC* baskılayıcı kompleksi tarafından *FT* geninden çok daha etkili olduğu vurgulanmaktadır (Li vd. 2008). İlginç bir şekilde, *SOCI* geni transkripsiyon başlama bölgesinde baskılayıcı histon trimetilasyon işareti ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Böylece, *FLC* hedef genlerin aktive olmayan kromatin bölgesini tetikleyen çiçeklenme baskılayıcı kompleksini oluşturarak *SOCI*'i baskılamaktadır (Adrian vd. 2009).

Yapılan ilk genomik (=genom bilimi) çalışmalarda, daha önce belirtilen ana gen *Lb*'nin geç çiçeklenme zamanını kontrol eden varlığını doğrulayan 'Tardy Nonpareil' çeşidinin bir F1 bitkisinde RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve bulk segregant analizi (BSA=Bulk Segregation Analysis) kullanılmış, 'Felisia' x 'Bertina'nın genetik haritasının bağlantı grubundaki (G4) üç RAPD bandının *Lb* ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Ballester vd. 2001). Silva vd. (2005), G1, G2, G3, G5, G6 ve G7 hibrit popülasyonlarında bir aday gen yaklaşımı (CG) kullanarak, türlerarası F1 badem x şeftali melezlerinde çiçeklenme zamanıyla ilişkili birkaç kantitatif özellik lokusu (QTL=Quantitative Trait Loci) tanımlamışlardır. Son zamanlarda farklı çalışmalar, 'Tardy Nonpareil' ('R1000') x 'Desmayo Langueta' (RxD) arasındaki bir F1 popülasyonundaki SSR (Simple Sequence Repeat) markırlarını kullanarak G4'teki *Lb* konumunu doğrulamış ve G1, G6 ve G7'de çiçeklenme zamanıyla ilgili diğer QTL'leri tanımlamıştır (Sanchez-Perez vd. 2007, Martinez-Gomez vd. 2012).

Sanchez-Perez vd. (2007)'nin RxD popülasyonunda gerçekleştirilen çalışmasında, SSR-UDP96003 primeri, haritanın G4 lokusunda *Lb* genine çok yakın yer almıştır. QTL analizi yapıldığında; G4 lokusundaki bu büyük QTL (*Lb*), *Lb* genini taşıdığı varsayılan 'R1000' deki varyans % 56.5 ile % 86.3 arasında ve RxD popülasyonunun haritasında varyans % 54.5-67.7 olarak açıklanmıştır. Diğer *Prunus* türlerinde, çiçeklenme zamanıyla ilişkili QTL'ler poligenik yapıyı teyit ederek, şeftali, kayısı ve kirazda da tanımlanmıştır. Şeftalide, Fan vd. (2010), G1, G2, G4, G6, G7 ve G8'de çiçeklenme zamanıyla ilişkili farklı QTL'leri tanımlamıştır. Campoy vd. (2011b) ve Salazar vd. (2013) kayısıda G1, G5 ve G7'de çiçeklenme zamanıyla ilişkili bir QTL tanımlamıştır. Wang vd. (2000), Dirlewanger vd. (2012) ve Castede vd. (2014) ayrıca vişne ve kirazların G1, G2 ve G4 lokuslarında çiçeklenme zamanıyla ilişkili bir QTL tanımlamışlardır.

Silva vd. (2005) ve Sanchez-Perez vd. (2012), bademde soğuklama (G1, G3, G4, G5, G6 ve G7) ve sıcaklık (G2 ve G7) istekleriyle ilişkili birkaç QTL'i, Fan vd. (2010) ise

şeftalide G1, G2, G4, G6, G7 ve G8'de soğuklama ve sıcaklık istekleriyle ilişkili birkaç QTL'i tanımlamışlardır.

Kayısıda vejetatif tomurcukların soğuklama istekleriyle ilişkili QTL'ler G1, G2, G3, G5 ve G8 lokuslarında Olukolu vd. (2009) tarafından tanımlanmıştır. Kirazda (*P. avium* L.), Dirlewanger vd. (2012) ve Castede vd. (2014) G4 lokusunda bir QTL bölgesi tanımlamışlardır. Japon kayısısında *FT* ortologlarının tanımlanması (Esumi vd. 2009), *Rosacea* familyasında *TFL1* benzeri genlerin incelenmesi (Mimida vd. 2012) konularında da çalışmalar bulunmaktadır.

Arabidopsisten fonksiyonel olarak karakterize edilen 10 genin homologları, badem veya şeftaliden 10 aday gen yaklaşımı olarak kullanılmıştır (*PrdLFY*, *PrdMADS1*, *PrpAPI*, *PrpFT*, *PrpAGL2*, *PrpFAR1*, *PrdTFL*, *PrdGA20*, *PrpAP2* ve *PrpCO*) (Silva vd. 2005). Bu 10 gen, *Prunus* referans haritasında (Texas x Earlygold) haritalanmıştır ve G1, G2, G3 G5, G6 ve G7 lokuslarında bulunmaktadır. Bununla birlikte, hiçbir G4 lokusunda *Lb* geni ile örtüşmemiştir. Bunun bir nedeni, Arabidopsiste çiçeklenme zamanında 60'tan fazla genin bulunmasıdır, bu nedenle diğer aday genler analiz edilmelidir. Diğer bir neden, çiçeklenme zamanı özelliğinin tek yıllık bitkilere göre çok yıllık bitkilerde farklı mekanizmalara bağlı olmasıdır.

Bugüne kadar bademde RNA dizileme ve mikroarray=DNA çip çalışmaları yapılmıştır. Diğer *Prunus* türlerinde yürütülen gen ifadesi çalışmasından biri, farklı dinlenme aşamalarında Japon kayısısının (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) çiçek tomurcuklarında gerçekleştirilmiştir (Habu vd. 2012). Bu türlerde, değişken çiçeklenme zamanı, düzensiz tomurcuk endodormansi oluşumundan kaynaklanmaktadır (Zhuang vd. 2013). *DAM6* gibi *MADS* aile genlerinin çoğu çiçeklenme zamanı dahil olmak üzere farklı çiçek gelişim aşamalarında yer almaktadır (Riechmann ve Meyerowitz 1997). Hali hazırda, şeftali genomunda 50'den fazla *MADs*-tipi transkripsiyon faktörü (TF) tanımlanmıştır.

Bu nedenle çiçeklenmeye katılan daha fazla gen bölgesini tanımlamak için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Çiçeklenen bitkilerin evrimi süresince korunan birçok gen bulunmaktadır. Oysaki, bademde çiçeklenme zamanının gen regülasyonunun analizini derinleştirmek için yeni çalışmalarda da yer alabilen miRNA düzenlemesi veya metabolit sinyallemesi gibi başka mekanizmalar da bulunmaktadır.

2.5 Çiçeklenme Zamanına Dışsal Faktörlerin Etkileri

Genel olarak, fenotipik değerlendirmenin doğruluğu, daha güvenilir genetik ve moleküler çalışmalar için kritik öneme sahiptir. Çevrenin önemli etkisini azaltmak için, çiçeklenme süresi soğuklama ve sıcaklık ihtiyacı gibi iki özellekle incelenebilir.

Çiçek tomurcuğu oluşumu, çiçeklenme ve meyve büyümesi ve olgunlaşması da dahil olmak üzere ağaç büyümesi için önemli çevresel faktörler; çoğunlukla fotoperiyod, ışık şiddeti, soğuklama ve sıcaklık isteği, toprak tipi ve nem içeriğidir. Badem, Akdeniz iklimine adaptasyonu ile karakterize edilmiştir; bunun sonucu olarak, bu türün yetiştiricilik alanı bu iklime sahip bölgeler ile sınırlandırılmıştır.

Badem geleneksel olarak olumsuz çevre koşullarına adapte edilen bir tür olarak kabul edilmiştir, ancak iklim koşullarının olumsuz etkilerinden kaynaklanan yıllık üretim dalgalanmaları bunun fotomorfojenik veya fotoperiyodik olduğunu ve bir anlamda bu adaptasyonun gerçek olmadığını göstermektedir. Ancak bademin birçok farklı ekolojik bölgeye yayılmasına izin vermiştir. Benzer şekilde, badem, düşük soğuklama gereksinimi nedeniyle erken çiçeklenmeye dirençli olan ılık kışlara, kuru ve ılık yazlara iyi adapte olarak adlandırılmıştır (Alonso 2017).

Yüksek sıcaklık, fotoperiyod, ışık şiddeti ve nem gibi diğer iklimsel faktörler, endodormansinin gelişimini etkileyebilecek olsa da, düşük sıcaklıklar endodormansinin tamamlanmasını etkileyen en önemli faktördür (Freeman ve Martin 1981). Yeterli soğuklama elde edildikten sonra, endodormansi ekodormansiye yol vererek biter. Daha sonraki aşamada, çiçek tomurcuğu büyümesi çoğunlukla sıcaklık birikimine bağlıdır. Isı birikimi, endodormansinin kırılması gibi çoğu bitkinin aktif büyüme sürecinde önemlidir (Sherman ve Rodriguez-Alcazar 1996). Soğuklama ihtiyacının çiçeklenme sürelerine etkisi, soğuklama ihtiyacı ve çiçeklenme süresi arasındaki yüksek bir pozitif korelasyona sahip olan sıcaklık isteklerine (Egea vd. 2003) göre çok daha güçlüdür (Sanchez-Perez vd. 2012). Bu sonuçlar kayısı (*P. armeniaca* L.) (Ruiz vd. 2007) ve tatlı kiraz (*P. avium* L.) gibi diğer *Prunus* türlerinde de doğrulanmıştır (Albuquerque vd. 2008). Oysaki, Alonso vd. (2005), matematiksel model kayıt sıcaklıkları ve çiçeklenme sürelerini kullanarak, ancak çiçek tomurcuklarında endodormansinin kırılmasını değerlendirmeyerek, soğuk ortamlarda çiçeklenme süresi üzerine sıcaklık isteklerinin etkisinin soğuklama ihtiyacından daha yüksek olduğunu açıklamıştır.

Bademde endodormansi ve ekodormansinin kırılması için soğuklama ve sıcaklık isteklerinin genetik temeli ve kalıtımı üzerine çalışmalar az sayıdadır. Sánchez-Pérez vd. (2012), bu özelliklerin poligenik doğasını, hibrit bitkilerin gözlemlenen çiçeklenme süresine göre tanımlamışlardır. Bunun yanında, aynı araştırmacılar, 2 yıllık bir çalışmada, incelenen melez bitkilerdeki soğuklama isteklerinin bimodal (çift tepeli: istatistik biliminde sürekli olasılık dağılımı olup iki tepe değer arasında bir frekans dağılım eğrisi) dağılımının, bu soğuklama isteklerine hipotetik (varsayımsal) olarak bağlı *Lb* geninin varlığıyla açıklanabileceğini gözlemlemiştir. Diğer *Prunus* türlerinde, şeftalideki çiçek tomurcuğunda (Fan vd. 2010) ve kayısındaki vejetatif tomurcuklarda endodormansinin kırılması için soğuklama isteğinin kalıtımı gözlenmiştir (Olukolu vd. 2009). Bu türlerde, çiçeklenme zamanı üzerindeki soğuklama isteklerinin daha yüksek bir etkisi de tarif edilmiştir, ancak EVERGROWING (*EVG*) geninin (Rodríguez vd. 1994), soğuklama ve sıcaklık isteğiyle ilgili gen olduğu tanımlanmıştır (Bielenberg vd. 2004, 2008).

Çiçeklenme zamanının iç kaynaklı genetik bileşenlerin yanında sıcaklık, gün uzunluğu ve stres tarafından da belirlendiği yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Cho vd. (2017), çiçeklenme zamanının beslenme, ortam sıcaklığı, kuraklık, tuzluluk, dışsal uygulanan hormonlar ve kimyasallar ve patojenik mikroplar tarafından etkilendiğini belirtmiştir. Bu streslere veya uyarıcılara cevap olarak, bitkiler ya gelecek generasyona yönelik tohum üretmek için çiçeklenmeye başlar ya da metabolizmalarını yavaşlatmak için çiçeklenmeyi ertelerler. Bitkinin verdiği bu cevaplar uyarıcıların dozuna, bitki gelişim safhasına ve çeşide bağlı olarak değişmektedir.

2.5.1 Gün uzunluğunun çiçeklenme zamanına etkisi

İlkbahar ve yaz dönemlerinde (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) uzun günler tarafından çiçeklenmenin teşvik edildiği, kısa gün koşullarında (8 saat aydınlık, 16 saat karanlık) da ertelendiği bilinmektedir. Arabidopsis fakültatif uzun gün bitkisidir. Arabidopsis mutantlarının; ışık reseptörlerini, 24 saat günlük bileşenleri ve *CO* (CONSTANS) gibi saat-ışık düzenleyici genleri içerdiği ve bunların gün uzunluğunun belirlenmesinde ve uzun günlerde çiçek oluşumunda anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (Putterill vd. 2004).

Işık ve fotoreseptörlerin uzun gün yolağında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. *EKF1*, *PHYA* ve *CRY2* gibi fotoreseptörlerin uzun günlerde çiçeklenmeyi teşvik ettiği ve bunu uzun gün anahtar çiçeklenme geni olan *CO*'nun doğrudan aktivitesiyle yaptığı belirtilmiştir. *CO*'nun doğrudan *FT* ve *SOCI* genlerinin ifadesinin artırılması yoluyla çiçeklenmeyi teşvik ettiği görülmektedir (Hayama ve Coupland 2003). Kısa gün koşullarıyla kıyaslandığında, uzun gün koşullarında *FT* ve *SOCI* transkript seviyelerinin ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Uzun gün koşullarında *CO*'nun *FT* transkript ifadesini arttırmasının sebebi, *CO*'nun hem ışık uyarıcılarına hem de iç günlük saat sinyallerine duyarlılığı ile açıklanmaktadır (Hayama ve Coupland 2003, Suarez-Lopez vd. 2001, Yanovsky ve Kay 2002).

SOCI'in baskılanması ve *FT*'nin ifadesi *FLC* tarafından olmaktadır. Oysaki yabancı tip Arabidopsiste *CO*'nun varlığı çiçeklenme zamanının değişen mevsime adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu adaptasyon sıcaklık ve gün uzunluğu gibi birkaç çevresel uyarıcıya cevabı içermektedir. Örneğin kışın yıllık gelişim bitki kış sıcaklıklarına maruz kalana kadar uzun gün tarafından çiçeklenme başlangıcını baskılamaktadır, bitki ardından zorunlu olarak baharda gün uzunluğunu uzatmaktadır. *SOCI* ve *FT*'nin ifadesinin azalmasında rol oynatan *FLC* ve *CO* arasındaki ilişki bu adaptasyonu açıklayabilmektedir. Çünkü *CO* tarafından bu genlerin aktivasyonu ilk olarak yaz mevsiminde *FLC* tarafından önlenmektedir fakat kış boyunca ifadesi azalan *FLC*, sonraki yaz mevsiminin uzun fotoperiyodu boyunca ifadesi azalan genlerin ifadelerini aktive etmek için *CO*'ya izin vermektedir. Çoğu bitkiler vejetatif gelişmenin uzun periyodundan sonra çiçeklenmektedir çünkü birkaç düzenleyici yazın uzun gün koşulları altında çiçeklenmeyi engellemektedir (Cho vd. 2017).

2.5.2 Beslenmenin çiçeklenmeye etkisi

Toprakta temel besin elementlerin yoğun miktarı ya da eksikliği çiçeklenme zamanını değiştirebilmektedir (Robinson ve Jones 1972, Bernier vd. 1993, Wada ve Takeno 2010). Genelde düşük beslenmenin çiçeklenmeyi teşvik ettiği belirtilmiştir (Cho vd. 2017). Kısa gün bitkisi olan *Pharbitis nil* (Kahkaha çiçeği), uzun gün koşullarında yetiştirildiğinde, besin maddesi sınırlıyken çiçeklenme başlamakta, besin solüsyonları iyileştirildiğinde çiçeklenme başlangıcı görülmemektedir (Shinozaki vd. 1988, Wada ve Takeno 2010). *FT*'nin ortologları olan *PnFT1* ve *PnFT2* kısa gün koşullarında artmasına rağmen, sadece *PnFT2*'nin ifadesini kötü koşullarda yükselmektedir (Wada ve Takeno 2010). Bu sonuçlar beslenme yetersizliğinden kaynaklı mekanizmanın kısa gün ve uzun gün koşulları arasında bölündüğünü göstermiştir.

2.5.3 Düşük sıcaklığın çiçeklenme zamanına etkisi

Uzun gün koşullarının yanında uzayan süreçte düşük sıcaklıklar ilkbaharda meydana gelen çiçeklenmeyi sağlamak için bazı bitkiler tarafından önemli bir sinyal olarak kullanılmıştır. Bu yönüme vernalizasyon denilmektedir. *FLC* ve *FRI* genlerinin dominant allelleri vernalizasyon isteğini karşılamak için sinerjik olarak rol oynamaktadır. Vernalizasyon *FLC* geninin moleküler tanımlanmasıyla gelmiştir ve bu nedenle bu genin ifadesinin izlenebilirliği bulunmaktadır. Vernalizasyon *FLC*-mRNA ve *FLC*-protein seviyelerini azaltmaya sebep olarak çiçeklenmenin *FLC* kaynaklı ifadesini ortadan kaldırmıştır (Mouradov vd. 2002).

2.5.4 Ortam sıcaklığının çiçeklenmeye etkisi

Ortam sıcaklığı bitki yaşam döngüsü boyunca büyüme ve gelişmenin oranını etkileyerek çiçeklenme zamanında etkilidir (Putterill vd. 2004, Jagadish vd. 2016). Arabidopsiste 23 °C'den 27 °C'ye yükseliş *FT* gen ifadesinde artışa sebep olmuştur ve kısa gün koşulları altında bile çiçeklenmeyi başlatmıştır (Balasubramanian vd. 2006, Sanchez-Bermejo vd. 2015).

Soğuklama isteği sıcaklığının yanında daha yüksek ortam sıcaklığının da çiçeklenme zamanını *FT*-mRNA miktarının (gen ifadesinin) düzeyleri kontrol edilerek etkilediği vurgulanmıştır (Samach ve Wigge 2005). Arabidopsiste yürütülen genetik çalışmalar 16 °C'de geç çiçeklenmenin 23 °C'ye kıyasla daha düşük sıcaklıklarda *SVP* geninin FCA-bağlı aktivasyonu tarafından gerçekleşmesine sebep olduğu belirtilmiştir. *SVP* CArG-box elementlerine *FT* geninde bağlanmakta ve *SOCI* CArG-box elementlerinin ifadesinin baskılanmasını desteklemektedir. *FLC*, *FT* ve *SOCI*'in ifadesini engelleyerek çiçeklenmenin baskılanmasında rol oynamaktadır (Mouradov vd. 2002). Bu, uzun gün koşullarında çiçeklenmeyi teşvik eden ve *FT* ve *SOCI*'i aktive eden *CO* fonksiyonunun tam tersidir.

FLC'nin sıcaklık cevabında, 24 saatlik periyod uzunluğunda ve daha yüksek sıcaklıklarda çiçeklenmeyi ertelemeye rol aldığı belirtilmiştir (Edwards vd. 2006). Uzun gün koşullarında Arabidopsis'in ve onun geç çiçeklenen mutantlarının çiçeklenmesi 16 °C'de ertelenmiştir.

2.5.5 Kuraklık stresinin çiçeklenmeye etkisi

Arabidopsiste su noksanlığının uzun gün koşulları altında çiçeklenmeyi teşvik ettiği, kısa gün koşullarında ise ertelediği belirtilmektedir. Kuraklık kaynaklı düzenlemenin fotoperiyodik çiçeklenme yolağı ile ilgili olduğu ifade edilmektedir (Cho vd. 2017).

ABA biyosentezi durdurulan, ABA mutanı (*aba-eksik 1*) bitkilerin normal nem koşullarında mutant olmayan yabani tip Arabidopsisten daha sonra çiçeklendiği belirtilmiştir. Bu durum, ABA'nın çiçeklenmeyi teşvik ettiğini göstermektedir. Kuraklık stresi altında ABA mutanı bitkide azalan çiçeklenme oranı, ABA hormonunun çiçeklenmedeki rolünü göstermektedir. ABA negatif düzenleyici Protein Fosfataz 2C (*PP2C*) gen ailesindeki mutasyonlar önemli ölçüde erken çiçeklenmeyi başlatmakta ve normal gelişme koşullarında *FT*, *TSF* ve *SOCI*'in ifadelerini artırmaktadır (Riboni vd. 2013). Kuraklık stresinde bu erken çiçeklenen fenotip de yok olmuştur. Bu sonuçlar, kuraklığa bağlı erken çiçeklenme için ABA sinyalinin gerekli olduğunu kanıtlamaktadır.

2.5.6 Tuzluluk stresinin çiçeklenmeye etkisi

Topraktaki yüksek tuzluluk, diğer çoğu çevresel stresler gibi bitki büyümesinin ve gelişiminin yanısıra çiçeklenmeyi de etkilemektedir. Yabani hardal gibi tuza duyarlı bitkilerde ve arabidopsiste çiçeklenme gecikmiştir (Stanton vd. 2000, Achard vd. 2006). Öte yandan, hafif tuz stresi (25 veya 50 mM NaCl) çiçeklenmeyi ertelerken, yüksek konsantrasyonlar (≥ 100 mM NaCl) arabidopsiste çiçeklenmeyi önemli derecede geciktirmiş veya çiçeklenme başlangıcını tamamen engellemiştir (Cho vd. 2017).

Fotoperiyodik çiçeklenme yolağının bir bileşeni olarak, *GI-CO-FT* genlerinin interaksiyonu tuz stresi altında çiçeklenme zamanının önemli bir düzenleyicisidir. Tuzlulukla *CO* ve *FT* transkript seviyelerinde düşüş görülebilirken, fonksiyonu azalmış *co-2* mutantı hafif tuz stresi altında çiçeklenmesi gecikmiş fenotipi sergilememektedir (Li vd. 2007).

2.5.7 Dış kaynaklı hormonların çiçeklenmeye etkisi

Büyümeyi düzenleyici gibberellik asit (GA) Arabidosiste çiçeklenmeyi teşvik etmektedir (Wilson vd. 1992, Putterill vd. 1995, Blazquez vd. 1998). *GAI*, *GA4* ve *GA5* genleri çiçeklenme zamanını düzenlemekte görevlidir. Kiraz, şeftali, kayısı, badem ve limon gibi türlerde GA'nın çiçeklenme üzerine engelleyici rolü bulunmaktadır (Munoz-Fambuena vd. 2012). *GA₃*'ün turunçgil yapraklarında *FT* ifadesini baskılayarak çiçeklenmeyi engellediği ortaya konulurken; *TFL1*, *FLC*, *SOCI* ve *API* homologlarının aktivitesinin GA uygulamasından etkilenmediği ortaya konulmuştur. Mouradov vd. (2002), çiçeklenme geni *SOCI*'in GA tarafından ifadesinin arttığını belirtmiştir. Hardal (*Sinapsis alba*) bitkisinin *SOCI* ortologunun ifadesi gün uzunluğunun yanında GA ve sitokinin uygulamasıyla da artmıştır (Bonhomme vd. 2000). Bu sonuç, arabidopsiste görülen sonuç ile uyumlu bulunmuş olup, *SOCI*'in sitokininlere cevap verdiğini göstermektedir.

Soğuğa maruz kalmamış iki yıllık bitkilere veya kısa gün koşullarında yetiştirilen uzun gün bitkilerine GA uygulandığında çiçeklenme genellikle gerçekleşmekte (Lang 1957), oysa bazı bitkilerde gecikmektedir. Bu durum GA'nın rolünün türe özgü olduğunu göstermektedir (Davis 2009). Kısa gün koşullarında GA biyosentez geni *gal-3*'ün ifade olmaması çiçeklenmeyen bir fenotipe sebep olduğunu göstermesine rağmen, *A. thaliana*'da dış kaynaklı GA'nın çiçeklenmeyi artırdığı belirtilmiştir (Wilson vd. 1992).

Dış kaynaklı GA uygulaması elmada, çilekte ve gülde çiçeklenmeyi engellerken (Tromp 1982, Guttridge 1985, Roberts vd. 1999, Foucher vd. 2008, Bangerth 2009), Arabidopsiste GA çiçeklenmeyi düzenlemektedir (Blazques vd. 1998, Moon vd. 2003, Hisamatsu ve King 2008, Li vd. 2008). *Rosaceae* familyasına giren çilekte, *TFL1* homologlarının uzun gün ve sıcak koşullarda ifadesi artarken, düşük sıcaklıklar *TFL1*'nin ifadesini azaltmaktadır.

Citrus sinensis, *Prunus persica*, *Malus domestica* ve *Prunus avium* gibi meyve türlerinde çiçeklenme GA uygulamasıyla gecikmiş ya da engellenmiştir (Lord ve Eckard 1987, Garcia-Pallas vd. 2001, Lenahan vd. 2006, Zhang vd. 2016). Bu durum, GA'nın vejetatif gelişmeyi düzenlediği ve içsel hormon konsantrasyonlarını değiştirdiği ile açıklanabilmektedir (Zhang vd. 2016). Oysaki GA biyosentez inhibitörü paklobutrazolun (bitki gelişim düzenleyici) *Lolium temulentum* ve *A. thaliana*'nın çiçeklenmesini baskıladığı (King vd. 2006, Jung vd. 2012) ve *Mangifera indica*'da çiçeklenmeyi artırdığı belirtilmiştir (Kulkarni vd. 1988).

2.5.8 Dış kaynaklı kimyasalların çiçeklenmeye etkisi

Nitrik oksit (NO) üretimi yüksek tuz, kuraklık ve patojenler gibi çeşitli stres etmenleri tarafından artmaktadır (Lamattina vd. 2003). Arabidopsiste nitrik oksidin dış kaynaklı uygulaması çiçeklenme dönüşümünü baskılamaktadır (He vd. 2004). Oysaki nitrik oksit üretiminde kusurlu mutant erken çiçeklense bile, nitrik oksit ifadesi artmış bitkiler geç çiçeklenmektedir. *CO* ve *GI*'nin ifadesi, *FLC* artsa bile, NO tarafından azalmıştır. NO'nun fotoperiyot ve otonom yolağını düzenlemesi bu durumu göstermektedir.

Nitrojen dioksit (NO₂) uygulamasının, arabidopsiste rozet yaprakların sayısını değiştirmeden çiçeklenmeyi hızlandırdığı belirtilmiştir (Takahashi ve Morikawa 2014). Yüksek düzeydeki atmosferik karbondioksitin (CO₂) solunumu azalttığı ve fotosentezi artırdığı, arabidopsisin ve odunsu türlerin yapraklarında karbonhidratların ve şekerlerin

yüksek konsantrasyonlarıyla sonuçlandığı belirlenmiştir (Curtis ve Wang 1998, Teng vd. 2006). Bu artışın genellikle çiçeklenme zamanını ve çiçeklenmenin meydana geldiği bitkinin büyüklüğünü değiştirdiği belirtilmiştir (Springer ve Ward 2007).

Askorbik asidin (AA) çiçeklenme zamanını kontrol ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Bharti ve Garg 1970). Askorbik asidin sentezinde rol alan L-galaktono- γ -lakton (GaIL)'nin *Brassica rapa*'ya dış kaynaklı uygulamasının uzun gün koşullarında çiçeklenmeyi ertelediği fakat kısa gün koşullarında çiçeklenmeyi teşvik ettiği belirtilmiştir (Daniela ve De Tullio 2007). *A. thaliana*'da uzun gün koşullarında GaIL püskürtüldüğünde çiçeklenmenin ertelendiği belirtilmiştir (Attolico ve De Tullio 2006). Askorbik asidin GA, ABA ve etilen biyosentezinde önemli rol oynadığı da belirtilmektedir (Barth vd. 2006). Böylece AA ve bu bitki hormonları bitkilerde çiçeklenmeyi düzenlemede önemli rolü bulunmaktadır.

Bir diğer antioksidan glutatyon (GSH)'nin da çiçeklenme zamanını etkilediği belirtilmektedir. GSH biyosentezinin spesifik engelleyicisi olan L-buthionin sulfoksiminin Arabidopsis'e uygulanmasıyla uzun gün koşullarında çiçeklenmenin teşvik edildiği fakat bu etkinin dış kaynaklı GSH uygulamasıyla yok edildiği belirtilmiştir (Ogawaa vd. 2001).

2.5.9 Biotik stresin çiçeklenme zamanına etkisi

Arabidopsiste, *Pseudomonas syringae* ve *Xanthomonas campestris* bakterilerinden kaynaklı enfeksiyonların çiçeklenmeyi hızlandırdığı belirtilmiştir (Korves ve Belgelson 2003) fakat bitkiler düşük dozlu *P. syringae* uygulanmasında hafif ve yüksek doz uygulamasına göre daha erken çiçek açmışlardır. *FLD* ifadesi, arabidopsis *P. syringae* ile inoküle edildiğinde aktive olmaktadır. *FLD*, *FLC* gen ifadesini baskılayarak çiçeklemeyi teşvik etmektedir (He vd. 2003).

Doğal toprak mikroorganizmaları da çiçeklenmeyi etkilemektedir (Wagner vd. 2014). Panke-Buisse vd. (2015) zayıf beslenme koşullarında yetişen *B. rapa*'nın ve *A. thaliana*'nın erken veya geç çiçeklenmesine sebep olan toprak mikrobiyomlarını izole etmiştir. Mikroorganizmaların yeniden yüksek düzeyde üremeleri, toprak kompozisyonunu değiştirdiği için çiçeklenme zamanını da değiştirmektedir. Endofitler de Arabidopsiste çiçeklenme zamanını geciktirmektedir (Poupin vd. 2013).

2.6 Çiçeklenme Zamanına İçsel Faktörlerin Etkileri

2.6.1 Otonom (kendi kendini yöneten) yolağının çiçeklenmeye etkisi

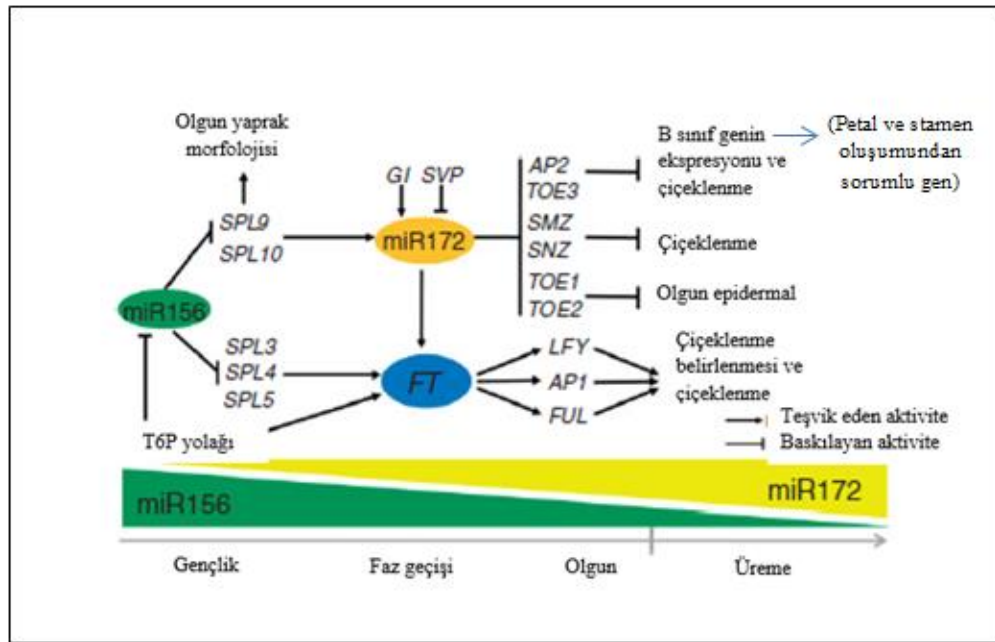
Çevresel faktörlerin yanında çiçeklenmeyi içsel sinyaller de düzenlemektedir. Otonom yolağı 6 genden (*FCA*, *FY*, *FLD*, *FVE*, *FPA* ve *LD*) oluşan bir grubu içermektedir. Genler mutasyona uğradığında geç çiçeklenen fenotiplerin üretildiği belirtilmiştir (Mouradov vd. 2002).

Otonom yolağı genleri ve vernalizasyonun *FLC* ifadesini baskılayarak çiçeklenmeyi teşvik ettiği, *FLC*'nin ise *FT* ve *SOCI* çiçeklenme genlerini baskılayarak çiçeklenmeyi baskıladığı belirtilmektedir (Suarez-Lopez vd. 2001). Farklı otonom genlerinin farklı mekanizmalar kullanarak *FLC* ifadesini baskıladığı belirtilmiştir. *FLC* ifadesi birçok gen tarafından kontrol edilmektedir. *FLC* geni çiçeklenmenin önemli bir baskılayıcısıdır ve vernalizasyon ve otonom yolları dahil birçok farklı genler *FLC*'nin ifadesini düzenlemektedir.

2.6.2 MicroRNA'lar ve çiçeklenme zamanının düzenlenmesi

Çiçeklenme zamanı yollarının çoğu *FT* veya *SOCI*'in ifadesini düzenlemek için birleşmektedir. Bu genlerin aktivasyonu çiçek gelişimine sebep olan *API* ve *LFY*'nin düzenlenmesinin artmasına sebep olmaktadır (Putterill vd. 2004).

Çiçeklenme zamanı 4 temel yolların düzenlenmesinin yanında, diğer başka faktörler tarafından da etkilenmektedir. miR156 ve miR172 vejetatif faz değişiminde anahtar role sahiptir. Erken gelişimde, miR156 seviyesi ilk önce yüksek olup ve genç dönemde vejetatif gelişim safhasını destekler. Bitki yaşlandıkça, miR156 ifade seviyesi düşer ancak SPL9 ve SPL10 proteinlerinin üretimini artırır. Aynı zamanda, SPL9 ve SPL10 miR172'nin ifadesinin artmasını sağlar (Şekil 2.5). Artan miR172 seviyesi normalde çiçeklenmeyi baskılayan AP2-benzeri transkripsiyon faktörlerinden altısının ifadesinde düşüşlerine sebep olmaktadır (Cho vd. 2017).



Şekil 2.5 Arabidopsiste mikroRNA'ların çiçeklenme zamanını düzenlemesi (Khan vd. 2014a)

Arabidopsiste gen ifadesi analizleri sonucu, uzun günlerde çiçek indüksiyonunda görev alan çiçeklenmeyi baskılayıcı protein-gen grubu tanımlamıştır (Schmid vd. 2003). Bunlar AP2 çiçek organı tanımlama genine benzer proteinleri kodlayan SMZ, SNZ, TOE1 ve TOE2 gibi bir grup gen içerir. Uzun günlerde devreye giren bu AP2-benzeri genlerin bazılarının ifadesinin azalması, bu genlerden yapılan mutasyonlarla geliştirilen

transgenik *co* ve *ft* mutant bitkilerinde ortadan kaldırılmıştır, ancak *lfy* mutant bitkisinde ise değiştirilmemiştir. Bu *AP2* benzeri genlerin *CO* ve *FT*'nin ifadesinin azalması fakat *LFY*'nin ifadesinin artması gibi çiçek baskılayıcıları olabileceğini göstermektedir. Ek olarak, çiçek oluşumunu engelleyici olarak işlev gören *AP2*'nin *TOE1*, *SMZ* ve *SNZ* genleriyle uyumlu olduğu, *TOE1*, *SMZ* ve *SNZ* genlerinin ifadelerindeki artışın geç çiçeklenmeye sebep oldukları belirtilmiştir (Schmid vd. 2003, Aukerman ve Sakai 2003).

2.7 Bitkilerde Soğuk Stresi ve Soğuğa Toleransın Fizyolojik Esasları

Sıcaklık, yeryüzünde doğal bitki topluluklarının normal dağılışında etkili olan önemli bir belirleyici faktördür. Yüksek sıcaklığa bağlı olarak oluşan kuraklık ile düşük sıcaklığa bağlı olarak oluşan donlar bitkilerin canlı kalmaları ve gelişimlerini etkileyen ana stres faktörlerindedir. Bitkilerde stres şartlarına dayanım; stresten kaçınma ve strese tolerans olarak iki şekilde sağlanmaktadır (Alonso 2017).

Bitkilerin yüksek ve düşük sıcaklık stresine maruz kalması metabolizmanın modifikasyonuna iki biçimde yol açar. İlk olarak, bitkiler sıcaklıkların yükselmesi veya düşmesi nedeniyle değişmiş olan hücresel metabolizmaları ayarlamaya çalışırlar. Sıcaklık stresi enzimlerin yapısını, katalitik özelliklerini ve işlevlerini ve membran metabolit taşıyıcıları değiştirir (Kubien vd. 2003). İkinci olarak, sıcaklık stresine verilen yanıtlarda metabolizmanın modifikasyonları temel olarak gelişmiş tolerans mekanizmalarıyla bağlantılıdır. Stres toleransına katkıda bulunabilecek önemli özelliklere sahip olduğu düşünülen birçok metabolitin strese cevapla ilgisi olduğu belirlenmiştir (Guy 1990, Thomashow 1999, Nayyar vd. 2005).

Pek çok bitki tür ve çeşidi, çoğu zaman genetik özellikleri çerçevesinde canlı kalabildikleri en düşük sınır derecelerindeki sıcaklıklarla karşı karşıya kalmaktadır. Bitkilerin belli bir süre donma derecesinde olmayan düşük sıcaklıklara maruz kalarak

don zararına karşı toleranslılık kazanabildikleri bu karmaşık adaptasyon süreci, soğuk aklımasyonu veya soğuğa tolerans süreci olarak adlandırılmaktadır. Soğuk aklımasyon süresince, bitkiler don stresinden korunmak veya tolerans sağlamak için farklı mekanizmalar geliştirmektedir. Bunlar lipit bileşiminde, enzim aktivitelerinde değişimler, şeker ve aminoasit içeriklerinde artışlar, bazı proteinlerin seviyelerinde ve gen ifadesinde değişiklikler şeklinde ifade edilmektedir (Howarth ve Ougham 1993, Burke 1995). Benzer şekilde Aslantaş vd. (2010) da, soğuğa tolerans sürecinde, bitkilerin üşüme ve don stresi sonucu oluşabilecek zararlanmalardan veya ölümlerden korunmak veya tolerans sağlamak için geliştirdikleri farklı mekanizmaları; bitkilerde hücre içi ve hücreler arası don oluşum sürecinin ekzotermik etkileri, don zararı sürecinde hücre membranlarında fiziksel değişimler, dona tolerans ve soğuk aklımasyonu süresince biyokimyasal değişimler (bitki öz suyunda bulunan bazı çözülebilir maddelerdeki, hücre membranlarının lipit bileşimindeki, protein miktarındaki, enzim aktivitesindeki, antioksidan sistemdeki, bitki besin elementlerindeki değişimler gibi) olarak kategorize etmişlerdir.

Dormansi başlangıcını takiben, sonbaharda ortalama sıcaklıklardaki düşüş, kış aylarında maksimum seviyeye ulaşan soğuğa tolerans ve donma toleransında artışa neden olmaktadır (Rinne vd. 1998). Bitkilerin soğuğa toleransı, sıcaklıktan, gün uzunluğundan ve su miktarı, beslenme durumu, fizyolojik yaş ve dormansi durumu gibi bitki koşullarından etkilenen karmaşık bir olaydır (Stushnoff 1972). Soğuğa tolerans öncelikle genetik tarafından belirlenmekte, ancak farklı yöntemler ile artırılabilir (Andrews vd. 1983).

Meyve ağaçlarının soğuğa dayanımları türlere göre farklılık göstermektedir. Bitkilerin soğuklardan zararlanmasında; içerisinde buldukları dönemler, düşük sıcaklığın derecesi, düşme hızı ve etkili olduğu süre gibi faktörler etkili olmaktadır. Meyve ağaçlarının organlarının soğuğa toleranslılık dereceleri de değişmektedir (Aslantaş 2008). Soğuklardan en fazla etkilenen organlar çiçek tomurcuklarıdır. Çiçek tomurcuklarının soğuklara toleranslılık düzeyleri içinde buldukları gelişme

periyoduna göre değişmektedir. Bu tamamen bitkinin içindeki metabolik değişimlerden kaynaklanmaktadır. Örneğin dinlenme halindeki hücrelerde şeker oranının ve proteinlerin artışı hücre içindeki buz oluşumunu azaltarak dona dayanıklılığı artırmaktadır (Küden vd. 1998).

Soğuk aklımasyonu sadece donma derecesinde olmayan düşük sıcaklıklar değil, aynı zamanda kuraklık ve ABA gibi farklı uyarıcı etkenler tarafından da tetiklenmektedir (Howarth ve Ougham 1993). Soğuğa tolerans kazanılması sürecinde pek çok fizyolojik olayın gerekli olduğu belirtilmektedir. Bunlar; çevresel değişimlerle beraber hormonal değişimler, değişen gen aktivitesi ve yeni gen ürünleri, çözünebilir maddelerin birikiminde ve lipit bileşiminde oluşan değişimler şeklinde belirtilebilir (Howarth ve Ougham 1993, Aslantaş 1999).

Dokulardaki suyun aşırı soğuma durumu, antifiriz özellikteki maddelerin (krioprotektan) birikimi don stresinden korunmada etkili olabilmektedir. Dona dayanımda otsu bitkilerde genellikle kaçınım mekanizması, çok yıllık odunsu bitkilerde ise tolerans faktörü daha baskın olmaktadır. Her iki mekanizma aynı bitkide birlikte rol alabilmektedir. Örneğin, çiçek ve yaprak tomurcuklarının iç dokularındaki su, tomurcuk pullarına taşınarak burada aşırı soğuma gösterebilmektedir. Bu durum don zararının azalmasına katkı sağlamaktadır. Odunsu bitkilerde parankima, floem gibi dokular bu şekilde don zararını tolere edebilmektedirler (Sakai ve Larcher 1987, Nilsen ve Orcutt 1996).

Don zararı, hücreler arası don oluşumu ve hücre içinde dehidrasyon ile tolere edilmeye çalışılır (Lewitt 1980). Bitki hücrelerinde olduğu gibi, çözeltiler farklı sıcaklıklarda donma ve erime sıcaklığına sahiptir ve genellikle gerçek donma olmadan önce aşırı soğuma gösterirler. Bazı organ ve dokular aşırı soğuma ile dondan korunur. Aşırı soğumanın sınırları aşıldığında hücre dışında buz kristalleri oluşur. Hücre içinden dışarıya meydana gelen su kaybı tolere edilecek seviyeyi aşınca ölüm meydana gelir.

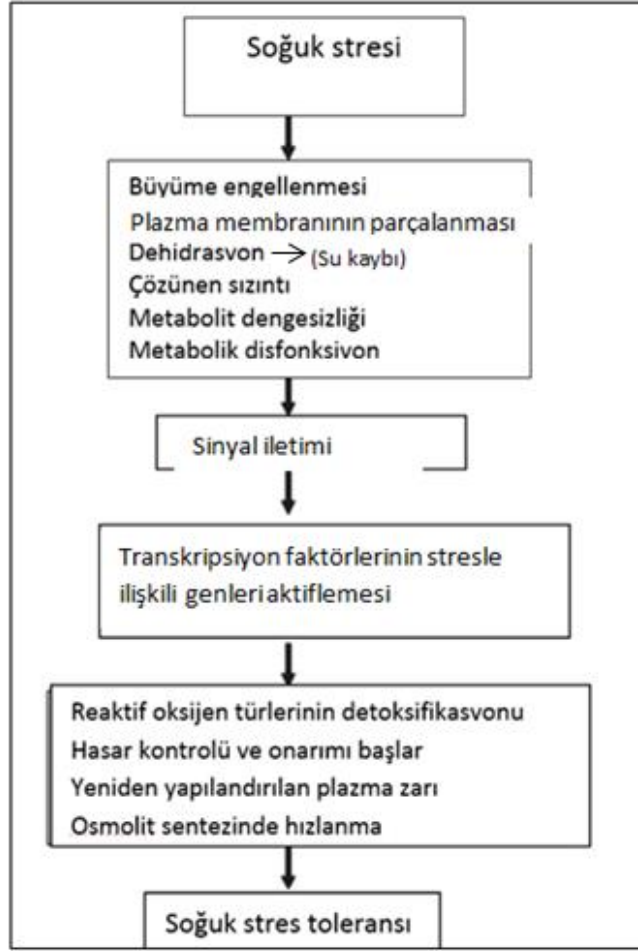
Hücre membranlarındaki yapının kimyasal ve enzimatik bileşimindeki değişiklik, aşırı soğuma özelliğinde de değişikliğe neden olmaktadır. Hücreler arası ve hücre içi don oluşumunda doku için koruyucu özellik arz eden sıcaklık yükselmeleri (ekzoterm) meydana gelmektedir (Aslantaş vd. 2010).

Eğer sıcaklık suyun donma noktasının altına düşerse, hücreler arası boşluktaki su aşırı soğur, hücreler arası boşluktaki çözelti çok seyreltik olduğundan buralarda buz nükleatörleri daha etkili olup buz teşekkülü görülür, hücre içindeki buz teşekkülü hücre zarı tarafından önlenir, hücre içi sıvısı ile hücre dışındaki buz temas etmediği için içeriden dışarıya doğru basınç meydana gelir, plazmolemmmanın geçirgenliği ve yüzeyi ile ilgili olarak soğuma hızına bağlı bir denge oluşur, protoplazmanın dehidratasyon miktarı hücre içindeki osmotik basınca bağlı olarak meydana gelir. Diğer bir ifade ile hücre içinde osmotik basıncı artırmak ve donmayı önlemek için yeterli miktarda su hücre dışına verilir. Eğer dehidratasyon yeterli değilse hücre içinde buz oluşumu başlar ve genellikle bu durum hücrenin tahrip ve ölmesi ile sonuçlanır (Aşkın 1989).

Hücre içi don oluşumu doğada yaygın değildir. Ancak hücrelerarası don, tüm ılıman iklim bölgelerinde kış sürecinde bitkilerde meydana gelmektedir. Çözülebilir kuru maddenin daha düşük konsantrasyonu ve buz oluşumunu sağlayan nükleatörlerin varlığından dolayı buz oluşumu hücreler arası boşluklarda başlar (Pearce 1988). Hücreler arası don, buz çekirdeklerinin oluşumu ile soğuma şiddeti gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Palta ve Weiss 1993). Hücreler arası buzun kademeli olarak artışı, hücrelerden suyu dışarı çekmektedir. Hücreler arası buz oluşumu neticesinde oluşan dehidrasyon ve mekanik stresler don zararına büyük oranda katkı sağlamaktadır (Sakai ve Larcher 1987). Burada meydana gelen buz kristallerine maruz kalma süresi, donma ve erime oranları, erime sonrası koşullar da zararı etkileyebilir. Donma süreci ve don zararının derecesi bitkinin anatomik yapısı, yaşı, su içeriği tarafından da etkilenmektedir (Palta ve Weiss 1993).

Donma sıcaklığına maruz kalan buğday bitkilerinden izole edilen membranlarda lipit peroksidasyonu belirlenmiştir (Pukacki vd. 1991). Don stresinin, membranlarında süperoksit oluşumunu hızlandırdığı belirlenmiştir. Hücreler arası su donduğu zaman, buz-su oluşumunun dışında kalan bitki öz suyunda çözülmüş olan maddeler dokuların bünyesinde tutulmaya devam etmektedir (Kendall ve McKersie 1989, Zhao 1998). Sudaki oksijenin çözünebilirliği daha düşük sıcaklıklarda arttığına, oksijen don stresi süresince kolayca hücrelere yayılır. Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile ilişkili elektron taşıma zincirleri ve enzimler don dehidrasyon zararı nedeniyle bozulmaktadır. Elektronlar vericilerden alıcılara düzenli şekilde aktarılamaz. Bu nedenle taşıma zincirlerinden dışarıya sızan elektronlar süperoksit veya moleküler oksijen oluşumunu artırmaktadırlar. Aktif oksijen türevlerinin oluşumu membran lipitlerinin bozulmasını hızlandırmakta ve serbest yağ asitleri ve/veya peroksidasyon ürünlerinin birikimine neden olmaktadır (Shewfelt 1992)

Soğuk stresi; bitki gelişimi, büyümesini, verimliliğini ve dağılımını sınırlayan en önemli abiyotik strestir. Bitkiler, 0-15 °C arasındaki sıcaklıklarda soğuk veya üşüme stresi yaşamaktadır. Bu gibi durumlarda bitkiler donma toleransı elde etmek için homeostazi (denge) sürdürmeye çalışırlar ve bu, gen ifadesinin ve metabolizmasının kapsamlı yeniden programlanmasını içerir (Thomashow 1999, Cook vd. 2004). Soğuk strese maruz kalma ve aklimasyon (alışma) mekanizmaları boyunca bitkilerin temel tepkileri Şekil 2.6' da sunulmuştur.



Şekil 2.6 Soğuk strese maruz kalma ve alışma mekanizmaları boyunca bitkilerin temel tepkileri (Yadav 2010)

Bitkilerin düşük sıcaklıklarda zararlanmaları çok sayıda faktöre bağlıdır. Bunlar; bitkinin yapısı, kalıtsal nitelikleri, bitki bünyesindeki içsel maddeler ve biyokimyasal değişimler, düşük sıcaklığın derecesi ve süresi, düşük sıcaklığın ortaya çıkış zamanı, sıcaklığın düşüş hızı, bitkiye uygulanan terbiye şekli ve kültürel işlemler, don olayının ortaya çıktığı zamandaki diğer iklimsel özellikler gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin her birinin dona tolerans mekanizmasında ayrı fizyolojik önemi vardır. Ancak bunlar çoğu zaman karşılıklı etkileşerek bitkinin dona toleransını ve duyarlılığını değiştirebilirler.

Dona toleransın fizyolojik mekanizmasında da çok çeşitli faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir. Önceleri don olayı sonucu ölümün, mekanik zararlanmalar ile yani dokulardaki suyun donması ile ortaya çıktığı düşünülmekteydi. Fakat, hücre duvarlarında oluşan don çözüldükten sonra hücrelerin zararlanmadan kalabildikleri ortaya çıkınca, bu görüş yerini, protoplazmanın çözülürken yavaş yavaş öldüğü ve hızlanabilir çözülmede ise, hücrenin hızla ve doğrudan ölebileceği fikrine bırakmıştır. Dolayısı ile hücrelerdeki su miktarının çok olduğu zaman dona toleransın azaldığı ve hücrelerdeki suyun az olduğu zaman ise dona toleransın arttığı düşünülmektedir. Burada hücrelerin su kapsamının yanında, dokulardaki buz oluşumu ve hücre suyu konsantrasyonu da büyük rol almaktadır. Don olayının ortaya çıkışında sıcaklık yavaş yavaş düşüyorsa, bitkilerde buz kristalleri önce hücreler arası boşluklarda oluşur. Sıcaklık hızlı düşerse buz kristalleri hücre içinde oluşur ve ölüm hemen hemen kaçınılmaz olur. Daha önce de belirtildiği gibi düşük sıcaklıklarda doğrudan ölüm ancak hücre içindeki protoplazmanın ve suyun donması ile olur. Hücre içi donmada ölüm kesindir. Hücre içi donmaları ancak çok hızlı ve ani sıcaklık değişimlerinde görülür. Dona toleranslılığı sağladığı bilinen bitki bünyesindeki maddeler, karbonhidratlar, amino asitler ve proteinler, hormonlar, enzimler, lipidler ve lipoidler, yağlar, salisilik asittir (Aşkın 1989)

2.7.1 Bademin soğuğa tolerans özellikleri

Meyve türlerinde soğuk zararı; kış soğukları, sonbahar erken ve ilkbahar geç donları olarak ortaya çıkmaktadır. Badem ağacının odun kısmı -20°C ' ye kadar soğuğa dayanabilmekle birlikte, -18°C 'de gözlerin zararlandığı bildirilmektedir. Bademde kış soğuklarından çok ilkbahar geç donları daha fazla önem taşımaktadır. Bademde ilkbahar geç donlarının zararları ise; pembe tomurcuk döneminde (-4 , $-6,5^{\circ}\text{C}$ 'de), çiçeklenme başlangıcında (-3 , -4°C 'de) ve çağla döneminde (-1 , $-0,5^{\circ}\text{C}$) görülmektedir. İlkbaharda don olayları bakımından en kritik dönem çiçek ve küçük meyve (körpe çağla) dönemidir. Çiçeklenme zamanında -4°C , -5°C 'ye dayanabilen çiçekler, körpe çağla

döneminde -1°C , $-0,5^{\circ}\text{C}$ 'lerde zarar görürler. Dona tolerans bakımından çeşitler arasında farklar görülmektedir (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979).

Badem çiçeği tomurcukları dinlenme döneminde yaklaşık -7°C 'ye (20°F) kadar olan sıcaklıklara dayanabilmektedir. Tomurcuk uyandığında ve yaprakları açıkta kaldıkça duyarlılıkları petal düşene kadar belirgin bir şekilde artar ve -1°C 'de 1 saat (30°F) önemli hasara yol açabilir (Brewer 1978). Çeşitler arasında dona toleransın değerlendirilmesi, çok düşük sıcaklıklara ve aynı zamanda dona cevapta yüksek bir genetik değişkenliğin varlığını göstermiştir. Bu değerlendirme, çiçek ve meyve üzerindeki zararların görsel olarak değerlendirilmesi, meyve tutumu ve verim üzerine zararın boyutunun değerlendirilmesi (Felipe 1988; Kodad ve Socias i Company 2005) ve klorofil floresan varyasyonunun ölçümü (Kodad vd. 2010) gibi geleneksel yöntemlere dayanmaktadır (Büyükyılmaz ve Kester 1976, Kodad ve Socias i Company 2004).

Bununla birlikte, çiçeklerde ve genç meyvelerde zarara neden olan minimum eşik sıcaklık hakkında bademlerde az şey bilinmektedir. Ticari badem çeşitleri (Felipe 1988) ve farklı kritik düşük sıcaklıklarda ıslah seleksiyonları (Kodad ve Socias i Company 2004, Imani vd. 2011) arasındaki don zararı farklılıkları tanımlanmıştır. Çoğu genotipte $-2,5^{\circ}\text{C}$ ağır verim kayıplarına neden olmaktadır. Düşük sıcaklık periyodunun yoğunluğu ve süresi, tomurcuklar, çiçekler ve genç meyveler gibi faktörler, tüm gelişim aşamalarında don şiddeti üzerinde daha güçlü bir etkiye sahiptir (Mazur 1969).

Çiçek tomurcukları ve ksilem, *Prunus* türlerinde dona en duyarlı dokulardır (Quamme vd. 1982, Kaya vd. 2021). Kış ortasında, $-35,3^{\circ}\text{C}$ 'lik bir sıcaklığın, ksilem dokularının % 50'sinde ölümcül bir etkiye neden olduğu, buna karşılık çiçek tomurcuklarının düşük sıcaklık toleranslarının (LT_{50}) ise $-28,7^{\circ}\text{C}$ olduğu gözlenmiştir. *Prunus*'ta, uyuyan tomurcuklardaki çiçek primordium, muhtemelen yüksek sakkaroz düzeylerinin bir sonucu olarak, diğer parçalardan daha düşük bir ozmotik potansiyele sahiptir (Quamme

ve Gusta 1987). Çiçek primordiumunun daha düşük su potansiyeli, donma sonrası çiçek tomurcuklarının su içeriğinin geri kazanımı ile ilişkili olabilir.

Andrews vd. (1983), *Prunus*'larda soğuğa toleransın, ilkbaharda çiçek tomurcuğu kabardığında başladığını ve petal ucu oluşumuna kadar devam ettiğini bildirmektedirler. Aslantaş (1999), Erzincan ekolojisinde bazı yerli ve yabancı orjinli badem çeşitlerinin dona toleransları bakımından farklılık gösterdiğini, geç uyanan genotiplerin daha avantajlı olduğunu, çiçek tomurcuğunun dona dayanıklılığının kuru madde ve Ca içeriği ile pozitif, Cu içeriği ile negatif korelasyona sahip olduğunu belirlemiştir.

Bademde geç çiçeklenmeleri nedeniyle soğuk zararına toleranslı olarak ifade edilen bazı çeşitler; Ferragnes, Ferraduel (Anonymous 2019b), Guara (Dicenta vd. 2015), Primorski, Yaltinski (Zaurov 2015), Tuono (Imani ve Mahamadkhani 2011) olarak bildirilmektedir.

2.8 Soğuğa Toleransın Genetik Kontrolü

Bitkilerin soğuk stresine toleransını sağlayan genler transkripsiyon, post transkripsiyon (mRNA düzeyinde) ve post translasyon (protein düzeyinde) süresince bağımsız/ortak olarak ifade gösterebilir. Bu nedenle, soğuk stresinin altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması, bitkilerde soğuğa toleransı geliştirmek için faydalıdır (Alisoltani vd. 2015).

Farklı bitki tür ve çeşitlerinde soğuğa duyarlı genlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve soğuk aklımasyonunun genetiğinin ortaya konulması için birçok çalışma yürütülmüştür. Soğuk uyartımlı proteinlerin sentezi mRNA'nın translasyonunda değişimlerle olmaktadır. Yapılan çalışmalarla mRNA profilindeki değişim ve artan dona tolerans arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Günümüze kadar birçok bitkide pek çok uyartımlı gen soğuğa alıştırılan ve alıştırılmayan bitkilerden cDNA kütüphanelerinin

incelenmesiyle elde edilmiştir. Bu cDNA klonlarının nükleotit sekansları belirlenmiştir. Fakat bu izole edilen genlerin çoğunun bilinmeyen fonksiyonlara sahip yeni polipeptitleri kodladığı belirlenmiştir (Neven vd. 1993). Soğuk aklimasyonu kabiliyeti ve toleransın genetik analizi bu kompleks sürecin doğasını göstermiştir.

Çalışmaların çoğu buğday ve diğer hububat bitkilerinde yürütülmüştür. Buğday ve odunsu bitkilerde dona toleransın kalıtımı, çok genle (poligenik) kontrol edilmektedir. Hem dominant hem de resesif genlerin kümülatif etkileri de belirlenmiştir. Buğdayda 5A ve 5D kromozomları dona toleransta esas etki göstermelerine rağmen, 21 kromozomun 11'inin dona toleransta etkili olduğu belirlenmiştir (Thomashow 1990). Kayın bitkisinde soğuk aklimasyonu ile ilgili yapılan çalışmada dona toleransta etkiye sahip olduğu belirlenen Bplti36, 36kD geninin, düşük sıcaklık yanında, kuraklık, tuz streslerine ve dıştan ABA uygulamasına tepki gösterdiği belirlenmiş ve bu genin Arabidopsise transplante edilmesi sonucunda bu özelliğin aktarıldığı tespit edilmiştir.

Bitkide dona tolerans mekanizması ile ilgili genler; düşük sıcaklığa cevap genleri (*LTRE*), soğukla indüklenen genler (*COR*), ABA-bağımlı genler (*ABRE*) şeklinde ayrı ayrı incelenmektedirler (Puhakainen 2004). ABA bitkilerde soğuk aklimasyonu süreciyle ilgilidir. ABA'nın düşük sıcaklığa maruz kalan otsu ve odunsu bitkilerde arttığı ve dıştan uygulanmasının üşüme ve don toleransında artış sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca bünyelerinde ABA içeriği düşük olan bazı mutant bitkilerin soğuk aklimasyonu sürecinde zarar gördükleri saptanmıştır (Smallwood ve Bowles 2002, Puhakainen 2004). Elmada *in vitro* şartlarda 'Mondial Gala' elma çeşidinde soğuk uygulaması sonucu gen ifadesindeki değişimlerin incelendiği çalışmada, izole edilen *MYB* geninin katalaz enzim fonksiyonundan sorumlu olduğu ve aklimasyon şartlarında aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Siligato vd. 2004). Sonuç olarak, bitkiler düşük sıcaklıklar sonucu oluşan üşüme ve don stresine tolerans sağlamak ve korunmak için farklı mekanizmalar geliştirmektedirler.

Soğuğa alışma ve soğuk stresine adaptasyon için bitkilerdeki en önemli mekanizmalardan biri, bazı soğuk cevap genlerinin (*COR*) aktivasyon süreçleridir. *COR* genleri bitki hücrelerindeki soğuk hasarına karşı kroyoprotektif (donmaya korumalı) proteinlerini kodlar. Soğuğa alışma sinyal yolağının en iyi şekilde anlaşılmasında ICE1-CBF-*COR* transkripsiyonel basamağı rol oynar. Bu yolla C-tekrarlı transkripsiyon faktörleri (CRT) ile CBF bağımlı cevap genleri (*DREB*) soğuk stresi tarafından hızlı şekilde tetiklenmektedir ve transkripsiyonlarını aktive etmek için *COR* genlerinin promotör bölgelerine bağlanır. CBF/*DREB* *COR* genlerinin promotör bölgelerinde CRT/*DRE* cis elementlerine bağlanır ve bu elementlerin transkripsiyonunu aktive eder (Wang vd. 2017).

Soğuğa alışma, transkripsiyon faktörlerinin ve efektör genlerin ifadelerinin hassas düzenlenmesini içerir ve bunlar soğuk regüle genleri olarak bilinir. Bu kategori altındaki proteinleri kodlayan efektör genler; şaperonları, geç embriyojenez proteinleri (*LEA*) osmotini, antifriz proteinlerini, mRNA bağlayıcı proteinleri, prolin gibi osmolit biyosentezi için anahtar enzimleri, su kanalı proteinlerini, şeker ve prolin taşıyıcılarını, detoksifikasyon enzimlerini, yağ asidi metabolizması için enzimleri, proteinaz inhibitörlerini, ferritini ve lipit transfer proteinlerini içermektedir. (Yadav 2010).

Soğuk stresi, henüz bilinmeyen bir reseptör tarafından algılanır. Sinyal daha sonra sinyal aktarım yollarının birkaç sinyal bileşenleri (kalsiyum, reaktif oksijen türleri, protein kinaz, protein fosfataz) yoluyla aktarılır. Soğuk stres sinyali soğuk ile ilgili genlerin ifadelerinde değişikliklere yol açar ve ifade seviyesi stres altındaki bitkilerin toleransında ve zarar görüp görmemesinde etkilidir. (Yadav 2010).

Soğuğa tolerans için tanımlanan genler arasında transkripsiyon faktörlerini (transkripsiyon faktörlerinin kendisi proteindir, mevcut soğuğa toleranslılık genlerinin dışında herbirini kodlayan genler bulunmaktadır) kodlayan genler bitkilerde stres toleransını iyileştirmek için çok daha etkili bulunmuştur. Bu transkripsiyon faktörlerinin

çoğu arabidopsiste ve çeltikte tanımlanmıştır. Soğuk strese bağlı genler, soğuğa duyarlı genler olarak bilinmektedir. Polipeptitleri kodlayan bu genlerin çoğu LEA (Late Embriyogenesis Abundant) geç embriyoenez proteinlerinin homologlarıdır ve polipeptitler geç embriyoenez fazı sırasında sentezlenir (Dure 1993, Ingram ve Bartels 1996, Close 1997). Tanımlanan arabidopsis soğuğa duyarlı genler *COR78/RD29*, *COR47*, *COR15a* ve *COR6.6*'dır. Bu genler soğuk, soğukla ortaya çıkan dehidrasyon veya absizik asit tarafından tetiklenmektedir (Thomashow vd. 1999).

Bademin don gibi çevresel strese cevabının moleküler düzeyde araştırılmasına ilişkin çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Soğuğa tolerans konusunda bademde yapılan çalışmalarda; stres genlerinin kontrol bölgesinde görev alan 'dehydration-responsive element-binding faktörleri' (*DREB1*) (Liu vd. 1998) ile düşük sıcaklıklarda aktive olan 'C-repeat binding' faktörünün (*CBFs*) *Arabidopsis thaliana*'da tanımlanması yapılmıştır (Gilmour vd. 1998, Medina vd. 1999). *CBF* genleri, *AP2/EREBD* çoklu gen ailesinde yer almaktadır ve bu gen ailesinin *Prunus* türlerinde soğuğa cevap ve soğuğa tolerans ilişkisi belgelenmiştir (Tittarelli vd. 2009, Barros vd. 2012, Trainin vd. 2013). *CBF* genlerinin soğuğa toleransta anahtar düzenleyici olduğu düşünülmektedir ve *CBF1*, 2 veya 3 genlerinin yüksek gen ifadesinin *A. thaliana* türünde don toleransının artırılmasına yönelik olduğu belirtilmiştir (Owens vd. 2002). *CBF*'nin *COR* genlerinin ifadesini başlattığı ve bu genlerin bitkinin soğuğa toleransının gelişiminde temel rol oynadığı belirtilmiştir (Mizoi vd. 2012).

Barros vd. (2012), bademde soğuğa tolerans ile ilişkili *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN1* genlerinin çiçek tomurcuklarındaki gen ifadelerini araştırmışlardır. *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN1* transkriptlerinin seviyelerinin çalışmanın ilk yılında, Kasım ayından sonra artıp, Ocak ayından sonra düşmeye başladığı belirlenmiştir. İkinci yılda ise söz konusu genlerin transkript (mRNA) birikimleri Ocak ayında düşmüştür. Araştırmacılar, her iki

yılda da kış ayları boyunca gen ifadesindeki düşüşün, vejetatif tomurcuk oluşumun zamanı ile uyumlu olduğunu ve sonbahar boyunca *PdCBF2* geninin transkript miktarında artışın soğuğa toleransla yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Zhang vd. (2013) Japon kayısısında (*Prunus mume*) *PmCBFa* ve *PmCBFb* genlerini tanımlamış, bunların kirazda *PaDREB* geninin homoloğu olduğunu ve düşük sıcaklıkta aktif olduğunu belirtmiştir. AP2 alanı bitkilerde düşük sıcaklığa cevapta transkripsiyonu uyaran düzenleyici bir element olarak düşünülmektedir. CBF transkript faktörlerinin, AP2/EREED çoklu gen süper ailesine ait olduğu, soğuğa cevapla ilişkili olduğu ve *Prunus* türlerinde soğuğa tolerans sürecinde etkili olduğu belirtilmiştir (Tittarelli vd. 2009, Trainin vd. 2013).

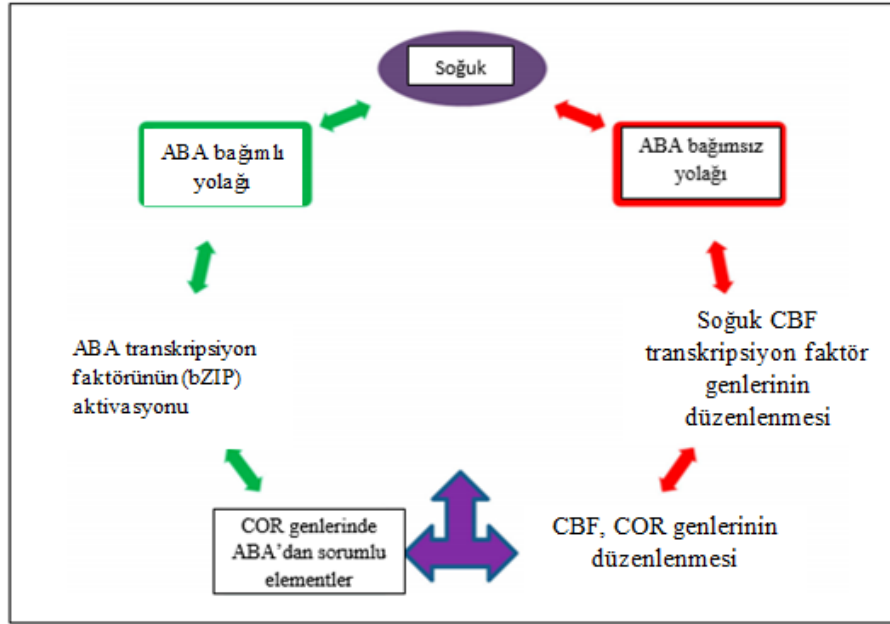
Guo vd. (2014) tarafından *Prunus mume* üzerinde yapılan bir başka çalışmada, düşük sıcaklıkta 168 saat tutulan *PmCBFa*, *PmCBFb* ve *PmCBFc* genlerinin mRNA içeriklerinin (gen ifadesinin) kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kış sonlarında toplanan *P. mume* çiçek tomurcuklarında *PmCBFc* transkriptleri daha az bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulamasından sonra (168 saat) *PmCBFc* geninin mRNA içeriğinin *PmCBFa* ve *PmCBFb* genlerinin mRNA içeriklerinden daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Mousavi vd. (2014)'nin çalışmasında, *CBF/DREB1* geninin bademin ovaryum dokularında don stresi altında yüksek oranda ifade olduğu gözlemlenmiş, anterde ise gen ifadesinde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Alisoltani vd. (2015), dona dayanıklı ve dona hassas badem genotipleri arasındaki *SIZ1*, *ICE1*, *CBF/DREB1*, *WRKY21*, *HOS1*, *ANK* genlerinde gen ifadesi farklılıklarını incelemişlerdir.

2.8.1 Bitkisel hormonların soğuga toleransa etkisi

Bitkilerin soğuga toleransı üzerine bitkisel hormonların (fitohormonlar) etkisi de bulunmaktadır. Bitkisel hormonlar küçük moleküllü kimyasallardır ve bitki gelişiminin abiyotik strese cevabını düzenlemekle görevlidirler. Önemli bitkisel hormonlar; oksin, ABA, etilen, sitokinin, gibberellin, jasmonik asit ve brassinosteroidlerdir. Hormonal bileşimlerin bitki don toleransını düzenlemede önemli rol oynadığı görülmektedir. Bitki hormon aktiviteleri soğukla ilişkili genlerin katlanmasına sebep olmaktadır. ABA bitki hormonu biyotik ve tuz, soğuk, kuraklık ve yaralanma gibi abiyotik strese cevapta kimyasal sinyal olarak temel rol oynamaktadır. ABA bitki fizyolojisindeki, moleküler ve gelişen ilerlemelerdeki çevresel stres durumlarında bitki adaptasyonunu sağlayarak bitkide birkaç değişimi düzenler (Ton vd. 2009). Aynı zamanda sinyal yolağının önemli fonksiyonunu yönettiği kanıtlanmış hücre içi mesajcı olarak da tanımlanmaktadır (Xue-Xuan vd. 2010). Abiyotik stres sırasıyla, stresle ilişkili genlerin ifadelerini aktive ederek ve stomal kapanmaya yol açarak ABA sentezini başlatır (Lee ve Luan 2012). ABA gen ifadesi azalmış stres cevaplarını kontrol eden çeşitli stres sinyallerinin oluşumunda önemli role sahiptir.

Bitkiler stresi ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız yolaklar olarak iki temel mekanizmayla yanıtlamaktadırlar (Şekil 2.7). ABA kaynaklı genler, soğuk, tuz ve kuraklık gibi çeşitli abiyotik stres koşullarında *COR* genlerinin regülasyonlarını arttırmaktadır (Knight vd. 2004). Oysaki *COR* gen ifadesinin artan regülasyonunda ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız yolaklarını içeren birkaç sinyal tanımlanmasına rağmen, gen ifadesinin başlaması üzerinde soğuk etkisinin esas olarak ABA-bağımsız yolağı ile olduğu belirtilmiştir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000).



Şekil 2.7 Soğuk-regüle eden gen indüksiyon yolları (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000)

2.8.1.1 ABA-bağımlı soğuğa tolerans yolağı

ABA, bitkilerin kuraklığa, yüksek tuz ve düşük sıcaklığa toleransında önemli rol oynamaktadır (Sakuma vd. 2002). Düşük sıcaklıklar içsel ABA seviyesinde artışı başlatırken, dıştan ABA uygulaması, soğuk stresi ve dehidrasyonla ilişkili birçok geni uyarılmaktadır (Baker vd. 1994).

Bazı çalışmalar, *COR* genlerinin ifadesi için *CBF*'nin aktivasyonunu uyarda potansiyel ABA uygulamasının, *CBF* genlerinin transkript seviyesini artırdığını göstermiştir.

Absisik asit (ABA)'in, belirli strese cevap veren genleri düzenleyerek soğuk stres tepkisi ile ilgili olduğu gösterilmiştir. ABA-sinyal yolağı, bitkilerde soğuk, kuraklık ve tuz-stres tepkilerinin merkezinde yer almaktadır (Shi ve Yang 2014). Stres

sinyalizasyonunda son yılların en önemli ilerlemelerinden biri, ABA reseptörlerinin tanımlanması ve temel ABA sinyal yolağının aydınlatılması olmuştur. Düşük sıcaklıkta cevap veren genlerin birçoğu dışardan ABA uygulamaları ile indüklenmektedir ve bu genlerin promotörleri ABA yanıt elementlerine (ABRE) sahiptir.

ABRE'ler, C/TACGTGGC dizisi olan elementlerdir, birçok genin ABA yanıtının oluşmasını sağlarlar. ABF'leri (ABF1-4) kodlayan genler ABA tarafından indüklenir ve çeşitli çevresel streslerle farklı düzenlenir. *ABF1* soğuk ile, *ABF2* ve *ABF3* yüksek tuz konsantrasyonu ile, *ABF4* soğuk, yüksek tuz konsantrasyonu ve kuraklık ile (Choi vd. 2000) indüklenir. Ayrıca ABA'ya bağımlı ve ABA bağımsız düzenleyici sistemler arasındaki yolak etkileşimi (cross-talk), moleküler analizlerle (Krebs vd. 2002, Seki vd. 2002a, b) tartışılmıştır. Bu yolak etkileşimi, farklı cis-aktif elementler arasındaki etkileşimle gerçekleşir.

Soğuk ve kuraklıkla tetiklenen birçok gen, promotörlerinde DRE/CRT ve ABRE elementlerini içerir. Bu cis-aktif elementlerin bağımsız olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bununla birlikte, *RD29A* gen ifadesinde bu elementlerin dakik analizi, DRE/ CRT'nin ABRE ile birleşmiş element gibi, kuraklık karşısında ABA'ya cevap veren genin ifadesinde birlikte işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Narusaka vd. 2003). Yapılan çalışmalar; *LEA* genlerinin aktivasyonunda ABA bağımsız sinyal yolunun önemli bir rol oynadığını, ABA sinyal yolağı dışında bu genlerin aktivasyonunun zorlaştığını göstermiştir (Xiong vd. 2002). Bu öneri, *CBF*'lerin ABA tarafından da indüklendiğini gösteren bir çalışma ile doğrulanmıştır (Knight vd. 2004). *CBF/DREB1* elementlerinin *COR* geni ifadesine dahil edilmesi kapsamlı bir şekilde aydınlatılmış olsa da *ABRE* aracılığıyla *COR* geni ifadesi karakterize edilmemiştir.

ABA; SnRK2.2, SnRK2.3 ve SnRK2.6/ OST1'i güçlü, SnRK2.7 ve SnRK2.8'i ise zayıf bir şekilde aktive eder (Boudsocq vd. 2004). Arabidopsis'deki *snrk 2.2 / 3/6* üçlü mutant, tohum çimlenmesi, fide büyümesi, stomatal kapanma ve gen regülasyonunda

ABA'ya son derece duyarsızdır (Fujii ve Zhu 2009). Son yıllarda yapılan proteomik alanındaki çalışmalar ile binlerce SnRK2 ilişkili proteinler tanımlanmış olup, bu proteinlerin, çiçeklenme zamanı kontrolü, miRNA ve kromatin düzenlemesi amaçlı RNA splicing gibi olaylarda görev aldığı belirtilmiştir (Wang vd. 2013).

Soğuk stres cevabı sırasında transkripsiyon faktörleri; C-tekrar bağlanma faktör ifadesi-1 indükleyicilerini, C-tekrar bağlanma faktörlerini, miyeloblastları ve mitojen aktif protein kinazları içermektedir. Soğuk regüle edilmiş genlerin ifadelerinin analizleri, başlangıç stres sinyalleri ve gen ifadesi arasında çoklu sinyal transdüksiyon yollarının varlığını gösterir. Tarımsal ürünlerin genetik modifikasyonunda (transgenik vb.), bu genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin kullanımı, soğuk stresi toleransı ve verimliliği artırabilir.

2.8.2 ICE-CBF-COR yolağı

Çoğu transkripsiyon faktörü soğuk sinyalini ve soğukla ilgili genlerin düzenlenmesinde rol alan genlerin gen ifadelerine yardımcı olmaktadır (Chinnusamy vd. 2007, Jiang vd. 2013). Soğuk stresine cevap için, *ICE-CBF-COR* yolağı en iyi çalışan savunma mekanizmasıdır. Bu yolak temel ICE (CBF ifadesinin başlatıcısı) ve CBF (C-tekrarlı bağımlı faktörler) transkripsiyon faktörlerini kapsamakta ve soğuk düzenleyen proteinleri (COR) çeşitlendirmektedir. Bu temel *ICE*, *CBF* ve *COR* genleri dışında soğuk toleransını doğrudan ya da dolaylı olarak katkı sağlayan başka aktivatörler ya da baskılayıcılar da bulunmaktadır. Bitki hormonları, günlük saat ve ışık da, ya CBF-bağılı ya da CBF-bağımsız yolakları boyunca soğuk stresine yanıtta önemli rol oynamaktadır (Wang vd. 2017).

Bitkilerde *COR* gen ifadesi, soğuğa tolerans için önemlilik göstermektedir. Transkripsiyon faktörü olarak CBF, soğuk stresine cevapta *COR* genlerinin gen ifadesini kontrol etmektedir. *ICE*, CBF'nin pozitif gen ifadesi düzenleyicisi olarak rol

oyunmaktadır. Bu yolakta, *CBF* gen ifadesinin başlaması, *COR* genlerinin ifadesinin başlangıcından daha erken olurken, soğuk uyarımlı *ICE* geni *CBF*'den önce aktive olmaktadır (Gilmour vd. 1998, Chinnusamy vd. 2003).

2.8.3 *CBF* transkripsiyon faktörü

CBF ailesi arabidopsiste 4 homolog içermektedir. Bunlardan sadece 3'ü (*CBF1*, *CBF2* ve *CBF3* veya *DREB1b*, *DREB1c* ve *DREB1a*) soğuk yanıtı başlangıcından sorumludur. Bu genlerden *CBF4* geni ise düşük sıcaklıklarda değil, kuraklık ve tuz stresi koşulları altında aktif olmaktadır (Haake vd. 2002).

CBF genlerinin ifadesi düşük sıcaklık koşullarında oluşmakta ve *COR* genlerinin ifadesini aktive etmektedir. Bitkiler normal gelişme sıcaklıklarından düşük sıcaklığa geçtikçe, *CBF* ve *COR* genlerinin ifadeleri önemli ölçüde ve hızlı bir şekilde (15 dakika içinde) artış göstermiştir (Gilmour vd. 1998). Önceki çalışmalar arabidopsisteki her bir *CBF* geninin artan ifade düzeylerinin soğukla ilişkili genlerin ifadesini başlattığını ve düşük sıcaklık uyarısı olmadan soğuğa toleransı artırdığını göstermiştir (Gilmour vd. 1998, Thomashow 2001, Medina vd. 1999).

CBF'lerin karbonhidrat ve yağ metabolizmasını, hücre duvarı değişimini ve gen transkripsiyonunu kapsamlı olarak düzenlediği belirtilmektedir (Jia vd. 2016).

CBF genlerinde soğuk toleransının ifade düzeyleri ve sayıları arasında genetik bir ilişki olduğu belirtilmektedir. Özellikle, düşük sıcaklıklara cevap olarak *CBF1* ve *CBF3* ifadelerinin *CBF2*'nin önüne geçtiği bulunmuştur (Novillo vd. 2004). *CBF1*'in artan ifadesinin *CBF3* transkript düzeylerine belirgin bir etkide bulunmadığı belirtilmiştir. *cbf2* mutant bitkilerin soğuğa toleransı, soğuğa alışmadan sonra artarken, *CBF1* ve *CBF3* *cbf2* mutant bitkilerde daha yüksek birikim göstermiştir (Gilmour vd. 1998, Novillo vd. 2007). *CBF1* ve *CBF3* fonksiyonunun eksikliği soğuk stresi altında *COR*

genlerinde ifade düşüşlerine sebep olmuştur (Novillo vd. 2007). *CBF2*'nin *CBF1* ve *CBF3*'ü negatif yönde değiştirdiği, *CBF1* ve *CBF3*'ün de *CBF2* üzerinde negatif yönde düzenleme yapmadığı belirtilmektedir (Jia vd. 2016).

CBF'lerin temel fonksiyonları arabidopsiste detaylı olarak çalışılmış ve diğer bitki türlerindeki çoğu *CBF* homolog genleri izole edilip, analiz edilmiştir. Transgenik arabidopsisteki pirinçten (*Oryza sativa* L.) gelen *OsDREB1A*'nın ifade düzeyindeki artış arabidopsisin *COR* genlerinin ifadesini başlatmıştır ve arabidopsisin soğuğa toleransını artırmıştır (Ito vd. 2006).

CBF1/ DREB1B ve *CBF3/ DREB1A* aynı anda ve soğuk uygulamasından sonra *CBF2/ DREB1C*'den daha önce indüklenmektedir (Medina vd. 2011). *CBF/ DREB1* aşırı ifade eden transgenik bitkilerdeki transkriptom analizleri, arabidopsisteki *COR* genlerinin yaklaşık % 12'sinin *CBF/ DREB1* 'ler tarafından kontrol edildiğini ortaya koymaktadır (Matsui vd. 2010, Zeller vd. 2009). ERF/AP2 faktörlerinin, RAP2.1 ve RAP2.6 ve C2H2 tipi ve STZ/ ZAT10 gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin, *CBF* ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Fowler ve Thomashow 2002, Vogel vd. 2005).

Gen ifade analizlerinde, üç *CBF/ DREB1* geni arasında fonksiyonel bir fark bulunmasa da, *cbf2* boş (null) mutanti üzerinde yapılan bir çalışmada, *CBF1/ DREB1B* ve *CBF3/ DREB1A*'nın donma tolerans ve gen ifadesinin *cbf2* mutantında arttığını göstermiştir. Bu durum *CBF2/ DREB1C*'nin hem *CBF1/ DREB1B* hem de *CBF3/ DREB1A*'nın negatif bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Novillo vd. 2004). Öte yandan, *CBF1/ DREB1B* ve *CBF3/DREB1A*, diğer *CBF/ DREB1*'lerin düzenlenmesinde yer almamakta ancak aynı *CBF/ DREB1* hedef genlerinin alt gruplarını aktive ederek soğuk aklimasyonunu pozitif yönde düzenlemektedir (Novillo vd. 2007).

Bu veriler *CBF1/DREB1B* ve *CBF3/DREB1A*'nın *CBF2/DREB1C*'den farklı işlevlere sahip olduğunu ortaya koymaktadır ve *CBF1/DREB1B* ve *CBF3/DREB1A* genleri aynı alt grubu kontrol etse de, bu genler birbiri ile uyumlu ifade olarak, soğuk aklimizasyonu gerçekleştirilmektedir (Chinnusamy vd. 2007, Novillo vd. 2007).

CBF/DREB1 homologları farklı türlerde tanımlanmıştır. Bu homologların fonksiyonel karakterizasyonu, bazılarının Arabidopsis *CBF/DREB1*'lere benzer görevlere sahip olduklarını ortaya koymaktadır. Transgenik pirinç, tütün ya da Arabidopsis bitkilerindeki homologların fazla gen ifadesi; soğuk kontrollü *CBF* düzenleyici genlerin gen ifadesini ve soğuk toleransı artırmaktadır. Ayrıca ifadesi artan bu bitkilerde ve *CBF/DREB1* geni yüksek ifadeli olan Arabidopsis bitkilerinde büyüme yavaşlaması görüldüğü de belirtilmiştir (Novillo vd. 2007).

Öte yandan, arpa veya Arabidopsis'in *CBF/DREB1*geninin; patates, buğday ve çeltik gibi farklı bitkilerdeki ektopik gen ifadesi, düşük sıcaklıklara toleransı artırmaktadır (Oh vd. 2007, Behnam vd. 2007, Benedict vd. 2006). *ICE1* genindeki gibi, *CBF/DREB1* geni de bitkilerde yüksek derecede korunmuş dizilere sahiptir. Bununla birlikte, bazı bitkilerde bu genler aşırı ifade olduğunda soğuk toleransında belirgin bir artış gözlenmediği için, farklı türlerdeki *CBF/DREB1*'lerin fonksiyonundaki farklılıkların göz önünde bulundurulması gerektiği de ifade edilmiştir (Zhang vd. 2004).

2.8.4 Soğuğa toleransın öncüsü: *ICE* faktörü

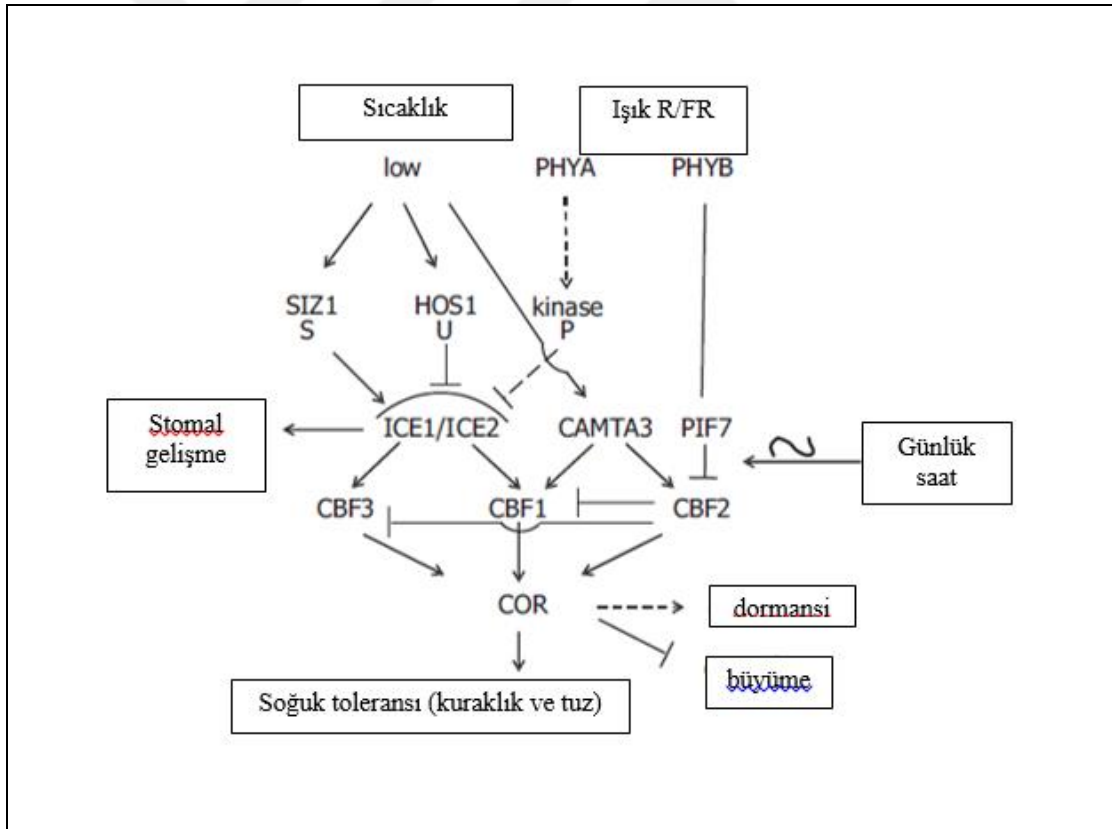
Bitkilerde soğuğa toleransla ilişkili olarak sinyal taşıyıcı olan *ICE*, *ICE-CBF-COR* yolağında önemlidir. Arabidopsiste *ICE* ailesinin iki üyesi *ICE1* ve *ICE2* bulunmuştur. *ICE1* soğuk uygulamasında *CBF3*'ün promotörüne bağlanmış ve *CBF3*'ün ifadesini aktive etmiştir. *ICE1* temel olarak çekirdekte yerleşmiş ve ifade olmuş, fakat *CBF*'lerin gen ifadesini sadece soğuk koşullar altında başlatmıştır.

ICE2'nin, *CBF1* geninin transkripsiyonda *ICE1* ile homolojisinin yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir (Fursova vd. 2009). Düşük sıcaklık koşullarında oluşan *ICE1*'in, çiçeklenme baskılayıcılarını oluşturarak çiçeklenmeyi geciktirebildiği belirtilmiştir. Çiçeklenmeyi teşvik eden koşullar altında *SOC1*, *ICE1*'in *CBF3* promotörüne bağlanmasını engellemektedir. Bu sonuçlar, *ICE*'in soğuk toleransında, stomal gelişimde ve çiçeklenmenin ertelenmesinde çoklu rol oynadığını göstermektedir.

ICE1, 'Helix-Loop-Helix' tipi transkripsiyon faktörleri arasında gruplanmış olan bir transkripsiyon faktörüdür ve *CBF3/DREB1A* promotörünü tanımaktadır ve bu yüzden esas soğuk sinyali düzenleyicilerden sayılmaktadır (Lissarre vd. 2010). Ayrıca, *ice1* mutant'ında SA (salisilik asit) indüklenebilen genler artış göstermektedir (Chinnusamy vd. 2003). Bu sonuçlar, *ICE1*'in soğuk ve SA sinyal bütünleştiricisi olarak, önemli işlevi olduğunu göstermektedir. Kalmodulin'a bağlanan transkripsiyon aktivatörü *CAMTA3/AtSR1*, pozitif şekilde soğuk toleransını düzenleyebilmek için *CBF2/DREB1C* promotörünü tanımaktadır (Doherty vd. 2009). Bu sonuçlara göre, soğuk ve SA sinyalleri birbiriyle ilişkilidir.

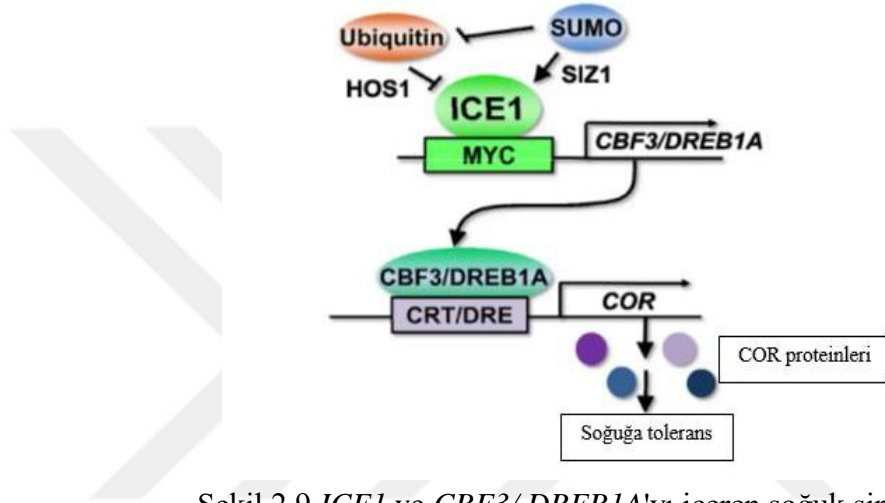
Birkaç soğuk sinyal yolağı arasında, *CBF/DREB1*'e bağımlı soğuk sinyal yolağı, en iyi karakterize edilen ve kilit yolaktır (Chinnusamy vd. 2007). Arabidopsiste üç *CBF/DREB1*, *COR* genin ifadesi soğuk toleransın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Gilmour vd. 2004). *CBF/ DREB1* (çoğunlukla *CBF3/DREB1A*) yolağı MYC tipi transkripsiyon faktörü, *ICE1* (*CBF* ifadesinin indükleyicisi) tarafından kontrol edilmektedir (Chinnusamy vd. 2003). Arabidopsis *ICE1* mutanti soğuk ve dona karşı duyarlılık göstermekte ve *ICE1*'in aşırı ifadesi ise donma toleransını artırmaktadır (Chinnusamy vd. 2003). *ICE1*, *CBF3/ DREB1A*'nın dizisinde bulunan MYC-tanım cis elementlerine (CANNTG) bağlanabilir ve soğuk aklimasyonu sırasında *CBF3/DREB1A*'nın ifadesini indükleyebilmektedir (Chinnusamy vd. 2003).

COR genlerinin yaklaşık % 40'ı ve soğukla regüle edilen transkripsiyon faktörü genlerinin % 46'sı *ICE1* tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.8). *ICE1*'in, *CBF3/DREB1A* ve diğer birçok *COR* genini kontrol eden bir ana regülatör olarak işlev gördüğü belirtilmektedir (Lee vd. 2005). *ICE1* mutasyonu, *CBF1/DREB1B* ve *CBF2/DREB1C*'nin erken soğuk indüksiyonunu etkiler, ancak indüksiyon daha sonraki zamanlarda azalmaz (Chinnusamy vd. 2003), bu da diğer *ICE1* benzeri proteinlerin *CBF1/DREB1B* ve *CBF2/DREB1C*'in soğuk indüksiyonuna aracılık ettiğini düşündürmektedir. Bu fikri destekleyerek, *ICE1*'in bir homologu olan *ICE2*'nin aşırı ifadesi, Arabidopsiste *CBF1/DREB1B* ifadesini ve soğuk toleransını arttırmaktadır (Fursova vd. 2009).



Şekil 2.8 Soğuk sinyal yolağı (Wisniewski vd. 2014)

ICE1, ubiquitin (Dong vd. 2006) ve SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) ile düzenlenmektedir (Şekil 2.9) (Miura vd. 2007). Bununla birlikte, *ICE1*'in aktifleştirilmesi ve algılanan sinyallerin sekonder taşıyıcılar ile *ICE1*'e iletilmesinin mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.9 *ICE1* ve *CBF3/DREB1A*'yı içeren soğuk sinyal yolağı (Miura ve Furumoto 2013)

ICE1, bir MYC tipi transkripsiyon faktörüdür ve ifadesini başlatmak için *CBF3/DREB1A* promotöründeki cis elementlerine bağlanmaktadır. *CBF3/DREB1A*, *COR* (soğuk-regüle genler) ifadesini ve soğuk toleransını düzenleyen bir AP2-tipi transkripsiyon faktörüdür. *ICE1*'in ubiquitinasyonu-ubikütin E3 ligazı olan *HOS1* aracılığı ile yapılmaktadır. Bir *SUMO* E3 ligazı olan, *SIZ1*, *ICE1*'in sumoilasyonuna (transkripsiyonun, kromatin yapısının ve DNA onarımının düzenlenmesinde rol alan birçok proteini modifiye etmek-SUMO konjugasyonu) aracılık etmekte ve muhtemelen ubikütinasyonun bloke edilmesinde ve *ICE1*'in stabilize edilmesinde rol oynamaktadır (Miura vd. 2012).

ICE1, yüksek bitkilerde fonksiyonel olarak korunmuştur. *SIICE1*'in aşırı ifadesi soğuk toleransını artırmaktadır ayrıca ifadesi artan *SIICE1*, domates bitkilerinin meyvelerinde

antioksidan, birkaç aminoasit, amin ve şeker birikiminin artması, antioksidan aktivitesinde artışa neden olmaktadır (Miura vd. 2012).

2.8.4.1 ICE-CBF-COR yolağında hormon düzenlemesi

Bitkisel hormonlar çeşitli çevresel uyarıcılara ve strese karşı bitkilerin verdiği tepkilerin düzenlenmesinde hayati bir role sahiptir. Bu anlamda en önemli hormonların absisik asit (ABA), gibberellik (GA), brassinosteroidler (BR), jasmonatlar (JA), oksin, sitokinin (CK), melatonin ve poliaminler olduğu bildirilmektedir. Arabidopsiste *ICE-CBF-COR* yolağının soğuğa cevapta dominant düzenleyici olduğu düşünülmekle birlikte, son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, soğuk sinyali ve hormon sinyali arasındaki karşılıklı iletişimin (crosstalk) bitkilerin soğuğa toleransında önemli rol oynadığını göstermektedir (Wang vd. 2017).

2.8.4.1.1 Brassinosteroidler (BR)

BR sinyal yolağında, BR'ler, BIN2 (Brassinosteroid Incentive 2)'yi negatif olarak düzenlemekte ve BES1 (Br1-Ems-Suppressor1) ile BRZ1 (Brassinazole-Resistant 1)'in aktivitesini fosforilasyon boyunca baskılamaktadır (Khan vd. 2014b). BR-eksik mutantları soğuk stresine karşı hassas olurken, soğuğa tolerans öncesi ve sonrasında BR sinyalinin aktivasyonunun, soğuğa toleransı uzattığı bulunmuştur (Eremina vd. 2016).

Bitkilerde soğuk sinyaline karşı, BR-sinyal kinaz BIN2'nin negatif düzenleyici, BZR1 ve BES1'in ise pozitif düzenleyici olarak rol oynadığı belirtilmektedir. BIN2'nin hedefi olan CESTA/HALF FILLED (*CES/HAF*)'ın *CBF* ifadesinin özellikle *CBF1* ve *CBF3*'ün düzenlenmesine doğrudan promotörlerine bağlanarak katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Eremina vd. 2016). Bu durum, BRZ1'in *CBF* promotörlerine direkt olarak bağlanabildiği ve *CBF1* ve *CBF2*'nin ifadesini pozitif olarak değiştirebildiğini göstermektedir.

2.8.4.1.2 Gibberellik asit, jasmonatlar ve salisilik Asit

DELLA proteinleri büyümei teşvik eden GA sinyal yolağında çekirdek gelişimini baskılayan düzenleyicileri etkileyerek büyümei engelleyen, çiçeklenmeyi yavaşlatan bir protein sınıfı olarak bilinmektedir. DELLA'lar büyümei engellerken; GA, DELLA'ların çöküşüyle büyümei teşvik etmektedir. Bu süreçte *CBF1*, GA'nın biyoaktif düzeyini azaltır ve DELLA'ların artışını teşvik eder. *CBF1* geninin ifadesi, GA'ların düşük seviyede ifade olması ve antioksidan enzim aktivitesinde artış meydana gelmesine sebep olmaktadır (Niu vd. 2014). *CBF1* ifadesi fazla olan bitkilerde bodurlaşmanın görüldüğü ve dıştan GA uygulamalarının bodurlaşma üzerine ters etkide bulunduğu belirlenmiştir. GA uygulaması, tütünde *CBF3* yüksek ifadesinde gelişmeyi baskılamayı durduramamıştır (Achard vd. 2008). Son yapılan çalışmada, azalan GA seviyelerine ve yüksek oranda DELLA proteinlerine göre, *CBF3* ifadesindeki artış, *CBF1* ve *CBF2* ile karşılaştırıldığında ifade artışlarının aynı seviyede olduğu görülmektedir (Wang vd. 2017).

Önceki çalışmalar DELLA'nın *CBF1-2-3* promotör bölgelerine doğrudan bağlanamadığını göstermiştir (Zentella vd. 2007). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, DELLA'nın jasmonik asit sinyali yolağı ile birlikte, *ICE1*'in *CBF1-2-3*'ün soğuk stres yanıtını düzenleyebildiğini göstermektedir.

Dıştan JA uygulamasının arabidopsisin soğuğa toleransını önemli ölçüde artırırken, JA biyosentezinin engellenmesinin soğuğa toleransı baskıladığı belirlenmiştir. Bu süreçte, bazı JAZ proteinlerinin *CBF*'nin aktivasyonunu engellemek amacıyla *ICE1* ile interaksiyon yapabileceği, DELLA genlerinin ise temel transkripsiyon aktivatörü olan *MYC2*'yi serbest bırakmak amacıyla, JAZ proteinlerine bağlandığı belirlenmiştir. Öte yandan, *MYC2*'nin soğuk koşullarda *CBF* genlerinin transkripsiyonunu uzatmak için *ICE1* ile interaksiyona girdiği belirtilmiştir (Wild vd. 2012, Hu vd. 2013, Zhou vd.

2017). Bu çalışmalar, GA ve JA'nın *ICE-CBF-COR* yolağında etkili rol oynadıklarını göstermektedir.

2.8.4.1.3 Etilen

Biyosentez ve sinyal yolağında etilen, bitkilerde *CBF*'lerle interaksiyon boyunca soğuga toleransla ilişkili bazı genlerin ifadesini kontrol edebilmektedir (Shi vd. 2012). *EIN3* (Etilen Insensitive 3)'ün *CBF* genlerinin ifadesini baskılamak için *CBF* genlerinin promotörlerine doğrudan bağlanabildiği belirtilmektedir (Chao vd. 1997).

Soğuk stresi çok sayıda *ERF* (Etilen Response Factor)'nin ifadesini başlatabilmektedir. Son zamanlarda, soğugu düzenleyen yeni *ERF* transkripsiyon faktörü *ERF105*'nin, arabidopsiste soğuga toleranslılık ve alışım süreçlerine ciddi anlamda katkı sağladığı belirtilmiştir. *ERF105*'in soğuk koşullar altında ifadesinin artmasının kısa süreli olduğu ve erken maruz kaldığı belirtilmektedir.

Erf105 mutantlarının arabidopsiste *CBF1-2-3* ve birkaç *COR* genleri gibi soğukla ilişkili genlerin ifadelerini azalttığı belirlenmiştir (Bolt vd. 2017). Buradan *EIN3*'ün *CBF* ifadesini engellediği, *ERF105*'in etilen biyosentezi ve sinyal yolağında *CBF* genlerini pozitif olarak düzenlediği görülmektedir.

2.8.4.1.4 Oksin

Oksin hormonundaki değişikliklerin gelişme sürecini kontrol ettiği belirtilmiştir (Vanneste ve Friml 2009). Bugüne kadarki bazı kanıtlar oksinin ışık ve gravitropik (geotropizm) üzerindeki önemli rolünü gösterse de (Eremina vd. 2016), oksinin soğuk strese cevaptaki rolü hakkında az şey bilinmektedir. Gaveliene vd. (2013)'ün bir çalışmasında, kanola (*Brassica napus*) üzerinde oksin analoglarının uygulamasının soğuk zararı boyunca stres-koruyucu metabolitlerden prolin ve sakkaritlerin birikimini

uyardığı gösterilmiştir. Son yapılan bir çalışmada, *CBF1* düzenleyicisi olan *ROCI* mutasyonunun *CBF1* ve *CBF3*'ün soğuk stresini önemli ölçüde engellediği ve mutantların soğuk stresine yüksek hassasiyet gösterdikleri belirtilmiştir. Oksin uygulamasının *ROCI* gen ifadesini artırdığı, ABA uygulamasının ise artırmadığı görülmüştür (Dou vd. 2016).

2.8.4.1.5 Sitokinin

Sitokinin fizyoloji ve gelişim süreçlerini düzenleyen temel hormondur (Veselov vd. 2017). Arabidopsisin sitokinin (CK) sinyalinde sırasıyla AHK2, AHK3 ve AHK4 (arabidopsis histidin kinaz) adında 3 histidin protein kinazı kullandığı belirtilmektedir. AHK2 ve AHK3 proteinlerinin *CBF*-bağımsız yolu boyunca soğuğa toleransı düzenleyebileceği, bu proteinlerin soğuk stresine adaptasyon cevabında negatif düzenleyici olarak rol alabileceği belirtilmektedir. Ancak pamuktan alınan *GhDREB1*'in arabidopsiste yüksek ifadesinin donma toleransı önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Öte yandan, *GhDREB1* ifadesi yüksek bitkilerin sitokinine karşı daha az duyarlı olduğu ve sitokinin cevaplarını tip-A ve tip-B ARR'lerini baskılayarak azalttığı belirtilmiştir (Huang vd. 2009). Bu durum, *GhDREB1*'in CK sinyal iletimi üzerinde negatif etkili olduğunu ve *CBF* soğuk stresi yolağı ile CK sinyali arasındaki interaksiyon olduğunu göstermiştir.

2.8.4.1.6 Melatonin

Melatonin hayvanlar alemindeki canlılarda biyoritmi düzenleyen bir hormon olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, çiçeklenme, fotosentetik elektron flux, kök sistem meristemi ve soğuğa tolerans gibi bitki gelişim sürecinde de önemli bir düzenleyici olduğu, bitkilerin strese toleransları üzerinde etkili olabildiği de belirtilmektedir (Wang vd. 2016, Zhao vd. 2016). Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkilerine dışardan melatonin uygulandığında, bitkisel bir hormon olan absisik asit (ABA) ve hücre içi antioksidan

sistemlerin düzenlenmesiyle soğuga toleransta artış sağlandığı belirtilmiştir. ABA'nın bitkilerin çevresel stres koşullarına verdikleri tepkilerde önemli rol oynadığı, örneğin kış aylarının soğuk koşullarında bitkiyi korumak adına büyümeyi yavaşlattıkları bildirilmiştir. Böylece ileride karşılaşılabilecek olumsuz iklim koşullarında bitkilerin abiyotik stres toleransının artırılması amacıyla bitkilerde melatonin üretiminin düzenlenmesinin umut vaad eden bir yaklaşım olacağı da ifade edilmiştir (Li vd. 2016a).

Arabidopsis yapraklarındaki melatonin düzeyi soğuk stres uygulamasından sonra hızlı bir şekilde artarken, soğuk stresine maruz kaldıktan sonra dıştan melatonin uygulamasında *CBF1-2-3* genlerinin ifade düzeyleri artmıştır. Dahası, melatonin ön uygulaması *COR15A* gibi spesifik *COR* genlerinin mRNA seviyelerini önemli ölçüde artırmıştır (Shi vd. 2015a).

2.8.4.2 ICE-CBF-COR yolağında günlük saat düzenlemesi (Circadian clock)

Düşük sıcaklığa cevapta *CBF* gen transkriptlerinin düzeyi gün saati tarafından belirlenmektedir. *CBF1-2-3*'ün maksimum ve minimum transkript birikimi gün doğumundan 4 veya 6 saat sonra görülmektedir (Fowler vd. 2005).

CCA1 ve LHY günlük saat bileşenlerinin soğuk düzenlemesinde etkili olduğu ve soğukla ilişkili *CBF* genlerinin günlük saat tarafından düzenlendiği görülmüştür. LUX (LUX ARRHYTHMO) geni günlük saatin kurucu bileşenidir ve hem *CRT/DRE*'yi hem de promotör bölgesiyle birlikte EE (akşam elementi)'yi içermekte, sıcaklık düzenlemesine katılmaktadır. *CBF1*'in yüksek ifade düzeyi LUX'un artışıyla sonuçlanmıştır ve diğer gün saati gen transkriptlerinin de ifade düzeyini değiştirmiştir (Chow vd. 2014). Bu durum günlük saatin soğuk düzenlemesini kontrol ettiğini ve *CBF* ve diğer ilgili genlerin ifadesi boyunca soğukla ilişkili günlük ritimlerin geri döngüsünü içerdiğini kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar düşük sıcaklık düzenlemesinin ve günlük saat

integrasyonunun karmaşık bir durum olduğunu, bitki gelişiminde *ICE-CBF-COR* yolu için önemli mekanizmalar sağladığını göstermektedir.

2.8.4.3 *ICE-CBF-COR* yolunda ışık sinyali düzenlemesi

Soğukla ilişkili mRNA'ların soğuğa toleranslılık için ışık sinyaline ihtiyaç duyduğu ileri sürülerek düşük sıcaklık altında soğuğa toleransta artış olmadan ışığın yokluğunda *COR* mRNA'ların biriktiği belirlenmiştir (Wisniewski vd. 2014). Soğuk koşullar altında, bZIP transkripsiyon faktörü HY5 arabidopsis'in tüm *COR* genlerinin yaklaşık % 10'unun oluşumuna aracılık etmektedir ve HY5 transkript seviyesinin uzun gün koşullarında ve 4 °C'de bitkilerde anlık olarak biriktiği belirtilmiştir (Catala vd. 2011).

ABA-eksik (*aba2*) ve *CBF*-eksik (*cbf2* ve *CBF1-AS3*) mutant bitkilerinde, HY5 proteininin soğuğa toleransın düzenlenmesinde, ABA ve *CBF* bağımsız yolunun bir bileşeni olabileceği ve bu durumun, düşük sıcaklık ile ışık sinyali arasında bir bağ olabileceğini göstermektedir.

Düşük sıcaklık, ışık toplama sistemlerinde fotosentezin enzimatik reaksiyon oranlarını elektron transfer reaksiyon oranlarından daha fazla sınırlamaktadır. Sonuç olarak, düşük sıcaklıktaki ışık, fotosistemlerde bir enerji dengesizliği yaratır; bu da fotosentetik elektron taşıma bileşenlerinin redoks durumunda değişikliğe ve PSII'nin yüksek uyarılma basıncına (excitation pressure) neden olmaktadır (Ergon vd. 2017, Ensminger vd. 2006). Değişken fotosistem redoks durumu ışık şiddetine bağlı bir soğuk sensörü olarak işlev görmektedir.

PSII aşırı uyarılmasının bir sonucu olarak, reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir ve bunlar, soğuk toleransında yer alan genlerin ifadesine yol açan sinyal yollarında (Winfield vd. 2010, Bode vd. 2016) ve otsu bitkilerin soğuklamada kompakt büyüme alışkanlığında rol almaktadır (Dal Bosco vd. 2003, Crosatti vd. 2013). Soğuğa alışma

dönemi sonbahardan daha sonraki bir döneme kaydırılırsa, özellikle yüksek enlemlerde yılın kış mevsiminde ışın düzeyleri hızla azaldığı için, soğuk algılama mekanizması daha az etkili olabilmektedir. Bununla birlikte, bitkilerin düşük sıcaklığı algılamasına ve donma direncinin gelişmesine neden olan diğer mekanizmalar da (membran sertliği, sıcaklığa bağlı histone-DNA etkileşimleri ve RNA ve proteinin yapısal değişiklikleri gibi) vardır (Winfield vd. 2010, McClung ve Davies 2010).

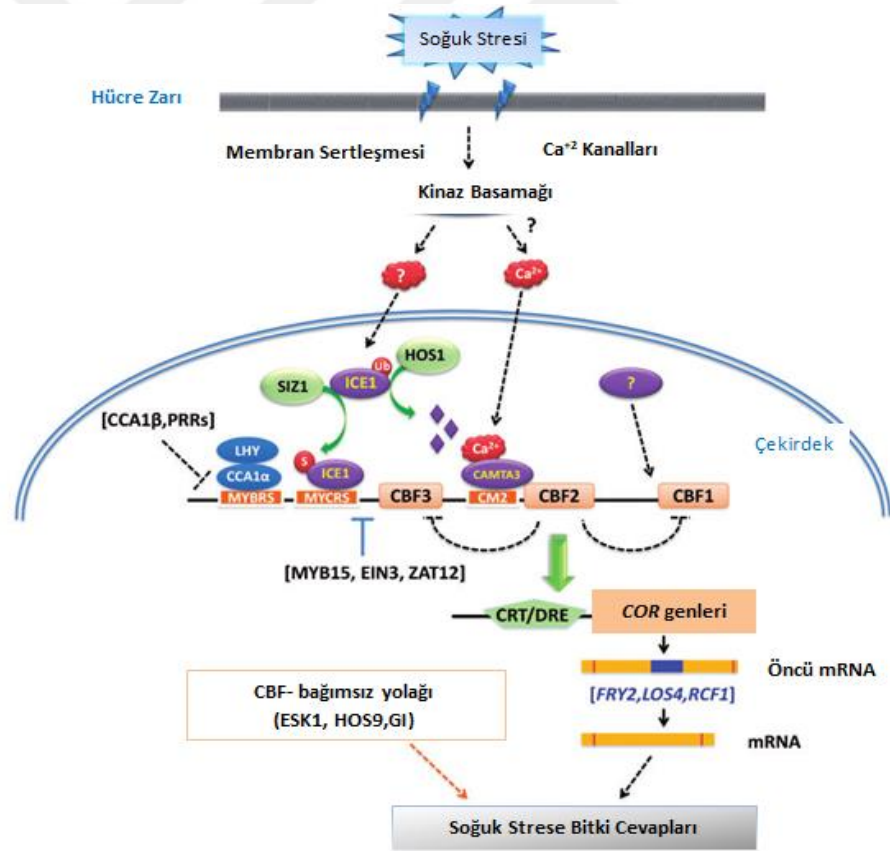
2.8.5 Soğuğa toleransla ilişkili diğer transkripsiyon faktörleri

Son zamanlarda, çoğu çalışmalar soğuk uyarımına karşı farklı bileşenlerin *ICE-CBF-COR* yolağındaki etkilerini göstermektedir. *ICE* ve *CBF* trans faktörlerinin düzenleyici fonksiyonlarının yanında, bazı özel transkripsiyon faktörlerinin ifadesi *HOS1*, *CAMTA3*, *MYB*, *HHP*, *ZAT*, *ROCI*, *CSP* gibi ligaz veya regülönlər bu yolağın düzenlenmesinde de etkili olmaktadır (Şekil 2.10).

Soğuk stresi kaynaklı *CBF* gen ifadesi bazı transkripsiyon faktörleri tarafından pozitif olarak düzenlenmektedir (Şekil 2.10). *ICE1* (*CBF* gen ifadesini teşvik eder) geni *CBF3* promotörüne bağlanabilen, *MYC* tipi bHLH transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Bu durum *CBF3* gen ifadesini aktifleştirir. Yapılan çalışmalarda *ice1* mutantının soğuk stresinde *CBF3* gen ifadesini gerçekleştirmediği için soğuğa dayanımında azalma olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, *ICE1* genindeki yüksek ifade (over ekspresyon) artışı soğuğa dayanımı artırmaktadır. *ICE2* geni *ICE1* geninin homologudur ve *CBF1* gen ifadesini pozitif yönde düzenleyerek soğuğa dayanım süresini uzatmaktadır. *CBF2* geni *CAMTA3* (calmodulin-bağlı transkripsiyon aktivatörü 3) transkripsiyon faktörü, *CBF2* promotörüne bağlandığı zaman aktif olmaktadır (Shi vd. 2015b).

CBF genlerinin transkripsiyonal düzenlenmesi ile birlikte birkaç önemli bileşenin de soğuğa alışma/uyum sürecini post-translasyonel seviyede *CBF* yolağını modüle ederek düzenlediği belirlenmiştir (Şekil 2.10). RING finger E3 ligaz enzimi, *HOS1* geniyle

interaksiyona girmekte ve 26S proteasom yolağı aracılığıyla *ICE1*'in yıkımına sebep olmaktadır. Diğer bir deyişle *ICE1* geninin protein yapısını değiştirmektedir. *hos1* mutantına yönelik yapılan bir araştırmada (Shi vd. 2015b), *CBF* genleri soğuk uygulaması boyunca en yüksek seviyede etkilenmektedir. Öte yandan, soğuk stresi ile ilişkili olarak, *HOS1* geninin yüksek ifadesi (over ekspresyon) ise *CBF* genlerinin ifadesini ve böylelikle soğuğa dayanımı azaltır. Bunun tersi olarak, SUMO (small ubiquitin ilişkili modifiye edici) E3 ligaz enzimi ve *SIZ1* geni, *ICE1* geninin sumolasyonuna (protein modifikasyonu) aracılık eder. Sonuç olarak, *siz1* mutantı soğuk kaynaklı *CBF* genlerinin ifadesinin azalmasına sebep olurken, yüksek ifadeye sahip *SIZ1* transgenik bitkilerinin dona dayanım süresinde artış gerçekleşmektedir.



Şekil 2.10 Soğuğa alışma sırasında *CBF* sinyal yolağının düzenlenmesi (Shi vd. 2015b)

Jiao vd. (2017)'nin çalışmasında, 9 yaşlı aşılı 'Xiahui 6' şeftali çeşidinde şeftali stigmalarının transkriptomunu karakterize etmek ve farklı açılardan ifade olmuş genlerin tanımlanması için yeni nesil sekanslama teknolojisi kullanılmıştır. Örnekler, karanlık odada tutulmuş ve uygulamadan 26 saat önce 17 °C'lik ortama alınmıştır. Daha sonra, örnekler -2 °C'de 4 saat (S1) ve -2 C'de 26 saat (S2) tutulmuş, kontrol örnekleri oda sıcaklığında bekletilmiştir. S2 koşulunda 966 gen ifade olurken, S1 koşulunda 276 gen ifade olmuştur. Şeftali stigmaları 4 saatlik düşük sıcaklık uygulamasından sonra soluk renkli olurken, kontrol örneklere göre morfolojik özelliklerinde önemli bir farklılık olmamıştır. Ancak 26 saatlik düşük sıcaklık stresinde stigmaların renkleri kahverengi olmuştur. Tanımlanan birkaç transkripsiyon faktörünün (serin/threonin-protein kinaz ALE2 reseptör benzeri haricinde) gen ifadelerinde düşük sıcaklıkta artış olmuştur. Ubikitilasyonla ilişkili proteinlerin S2 koşulunda gen ifadesinde 50 kat artış görülmüştür. Peroksidaz-5, varsayılan pektinesteraz/pektinesteraz inhibitör 28, lipoksigenaz 2, kloroplastik, b11-benzeri protein endoglukanaz 16, beta-glukosidaz 24, tubulin beta-6 zinciri, aktin-depolimeraz faktör 7, fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfat ve mor asit fosfotaz 17'yi içeren çoklu genlerin gen ifadelerindeki artış S1 ve S2 arasında ortalama 40 kat artmıştır.

Hosseinpour vd. (2018), 6 yaşlı 'Nonpareil', 'Shahroud' ve '6-8' ('Ferraduel'in açık tozlanmasından elde edilen genotip) genotipinden, Mart 2013 ve Nisan 2014 tarihlerinde, 3 farklı fenolojik dönemde (pembe tomurcuk, tam çiçeklenme ve küçük meyve) 12 dal örneği toplamışlar ve bu örneklerde soğuk uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Soğuk uygulama sırasındaki ortam nemi % 60, başlangıç sıcaklığı 50 dk boyunca 7 °C olarak belirlenmiş, daha sonra soğuklama oranı aşamalı olarak -2 °C'ye kadar düşürülmüştür. Her çiçeklenme döneminde 3 farklı düşük sıcaklık test edilmiştir. Farklı düşük sıcaklıklara maruz kaldıktan sonra çiçekler 6 saat boyunca 4 °C'de tutulmuştur. Çalışmada pembe tomurcuk döneminde -3 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; -5 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; -7 °C/30 dk, 4 °C/6saat; tam çiçek döneminde -1.5 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; -3 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; -4.5 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; küçük meyve döneminde -0.5 °C/30 dk, 4 °C/6 saat; -1.5 °C/30 dk, 4 °C/6; -2.5 °C/30 dk, 4 °C/6 saat

soğuk uygulanmıştır. Çiçekler her uygulamada 21 °C’de 24 saat, 16 saat fotoperiyot 28 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda ve % 60 nemde tutulmuştur. Pembe tomurcuk dönemi ‘6-8’ ve ‘Nonpareil’de soğuğa en toleranslı dönem olmuştur. Pembe tomurcuk döneminde ‘6-8’ genotipinin çiçekleri aynı safhadaki ‘Nonpareil’ çiçeklerinden daha az don zararı görmüştür.

Aynı çalışmada, PT, SPK, PIT, CDPK13-benzeri, MIOX1-benzeri ve DNAJB8-benzeri aday 6 genin gen ifadesi incelenmiş, *PT* geni tam çiçek döneminde soğuk uygulamasından sonra *SPK* ve *PIT* genlerine göre 2.5 kat daha yüksek değişime uğramıştır. PT proteinleri membranlarda bulunmakta ve Pi gibi minerallerin hücreye geçişi için seçici geçirgen bariyer olarak rol oynamaktadır. PHT4;6 tuza toleransın belirleyicisidir (Cubero vd. 2009).

Söğüt ağacında (*Salix* ssp.) arseniğe dayanıklı genotiplerde *PT*’nin farklı gen ifade seviyeleri gözlemlenmiştir (Puckett vd. 2012). *PT*’nin farklı gen ifade seviyelerinin, badem çiçeklerinde soğuk stresinde fosfat taşınımına katkı sağladığı ileri sürülmektedir. Soğuğa toleranslı ‘6-8’ genotipinde, *PT* gen ifadesinin soğuğa hassas ‘Shahroud12’ çeşidine göre ifadesinindaha fazla arttığı, kontrol koşullarında ise, her iki çeşitte de *PT* geni ifadesinin düşük bulunduğu belirtilmiştir.

2.8.5.1 HOS1 (High expression of osmotically responsive gene 1)

HOS1 (ozmotik sorumlu gen 1’in yüksek gen ifadesi) *ICE1*’in düşmesi ve ubiquitin ekleyerek proteinin yapısını değiştirme yoluyla bastırıcı olarak rol oynarken, *SIZ1* *SUMO* E3 ligaz *CBF3*’ün gen ifadesini kolaylaştırarak ve sumolasyon tarafından *ICE1*’i stabilize etmektedir (Ishitani vd. 1998, Ding vd. 2015). Bunun yanında soğuk stres altında protein kinaz *OST1* (açık stomata 1) aktive olmaktadır ve *OST1* proteini, *ICE1*’i fosforlamakta ve böylece HOS1 tarafından düşüşü baskılanmaktadır. *OST1*’in

oluşumunun stomatal hareketliliğini kontrol eden ABA'nın sinyal yolağında orjinal olarak bulunduğu belirtilmektedir (Mustilli vd. 2002).

2.8.5.2 CAMTA (Calmodulin bağlı transkripsiyon aktivatörleri)

Kalsiyum bitkilerde içsel ikincil mesajcı uyarıcıdır ve orta derecede yaygın bulunmaktadır. Bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıktan sonra, düşük sıcaklık algısının sitosolik kalsiyumda hızlı artışa sebep olan plazma zarında oluştuğu düşünülmüştür. Kalsiyum sensör proteinleri sonra aktive edilmiştir ve bu proteinler *CBF* genlerinin ve soğukla uyarılmış proteinlerin ifadesini başlatmıştır (Eckardt 2009). *CAMTA3*'ün *CBF2*'nin ifadesinin pozitif düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir. Düşük sıcaklıklarda, *CBF1*, *CBF2* ve *CBF3*'ün ifade seviyelerini artırmak amaçlı, *CAMTA1* ve *CAMTA2*'nin *CAMTA3* ile uyum içinde olduğu belirtilmiştir.

2.8.5.3 MYB15 ve MYB14

MYC ve MYB proteinleri, gen düzenlenmesiyle ilişkili promotörlerine bağlanarak çoğu genin ifadesini aktive edebilen transkripsiyon faktörleridir. *CBF1*'in kontrolcüsü olarak *ICE1*, *CBF3* promotöründeki MYC spesifik tanımla dizilerine bağlanmaktadır. MYC spesifik tanıma dizilerinin yanı sıra, MYB spesifik tanıma dizileri de *CBF* promotörleriyle birlikte rol oynamaktadır. MYB benzeri transkripsiyon faktörleri *CBF* gen ifadesinin düzenlenmesinde ayrıca rol oynamaktadır (Shinwari vd. 1998).

Transkripsiyon faktörü MYB15 proteini ICE1 proteini ile interaksiyon içindedir ve *CBF* genlerinin promotör bölgesindeki *CBF* ifadesini baskılayan ve soğuğa toleransı azaltan MYB tanıma bölgesine bağlanmaktadır (Agarwal vd. 2006). MYB14 de *CBF* genlerinin ifadesini etkileyen nüklear proteini kodlamaktadır (Chen vd. 2013). MYB15 ve MYB14'ün artan ifadesi *CBF* genlerinin ifadesinin azalmasıyla sonuçlanırken, bunların susturulması (knock-down) soğuk stres altında *CBF* genlerinin ifadesinde artışa sebep

olmaktadır. İlginç bir şekilde, MYB15'in gen ifadesi artarken, MYB14'ün soğuk uygulamasıyla gen ifadesi azalmıştır (Agarwal vd. 2006, Chen vd. 2013).

2.8.5.4 HHP (Heptahelical transmembrane protein)

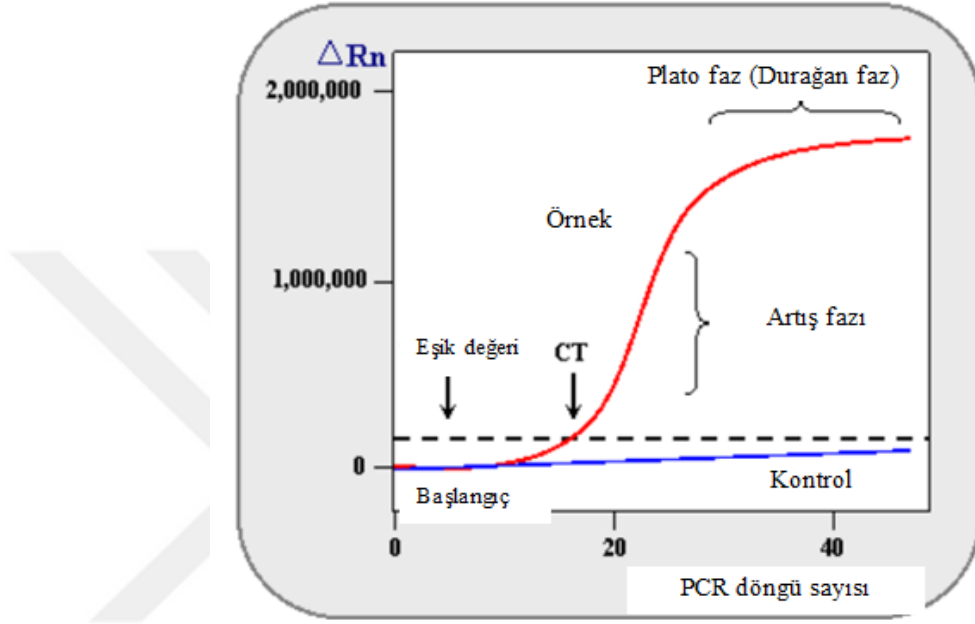
HHP, arabidopsiste ABA ve ozmotik sinyal yolağında düzenleyici olup, *CBF* genlerinin ifadesini negatif yönde düzenlemektedir. *CBF* genlerinin ifadesi sürecinde HHP ailesinin üyeleri *ICE1*, *CAMTA3* ve *ICE2* ile interaksiyon içerisindedir (Lee ve Seo 2015).

2.9 Real time PCR (qRT-PCR) (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesine olanak sağlayan ve temeli PCR teknolojisine dayanan analiz teknolojisidir. Bu teknolojiye ortamdaki DNA sarmalına bağlanan ve floresan ışığa yapan özel boyalar (SYBR Green, SYTO9 gibi) kullanılarak, sinyal oluşturan prob dizileri yardımı ile ortamdaki amplifikasyon miktarı tespit edilebilmektedir. Her PCR döngüsü sonrasında, ortamda oluşan çift zincirli ürünün bu sayede miktarı belirlenebilmekte ve kantitatif analizleri yapılabilmektedir (Bustin vd. 2005, Nolan vd. 2006). Real Time PCR; çok sayıda örneğin aynı zamanda analizine olanak sağlaması, amplifikasyonun erken evrelerde saptanabilmesi, ifade farklılıklarının rahatlıkla saptanabilmesi gibi çok sayıda avantajlara sahip bir yöntemdir.

qRT-PCR reaksiyonları; exponensiyal faz (yükselme fazı), linear faz (yüksek farklılık) ve plateau faz (sonlanma noktası) olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.11). Artış fazında (Exponential phase) tüm reaksiyon içerikleri ortamda yeterli miktarda bulunduğu için etkinlik % 100 olup, bu nedenle PCR ürün miktarı her döngüde iki katına çıkmaktadır. Linear fazda ise yavaş yavaş reaksiyon komponentleri azalmaya başlar bu nedenle PCR ürünlerinin oluşumunda azalma gözlemlenmektedir.

Plato fazda (Plateau phase) ise PCR ürün oluşumu tamamen sonlanmaktadır (Ginzinger 2002).



Şekil 2.11 Real Time PCR döngü aşamaları (ΔR_n : Normalize raportör, CT: Cycle threshold) (Heid vd. 1996)

Real Time PCR'da; hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri ve SYBR green olmak üzere 3 çeşit ışık kaynağı (floresan ışıkta görevli) kullanılmaktadır. Bunlardan hibridizasyon problemlerinin, 3' ucu (530 dalga boyu) floresan işaretli olup, 5' ucunda (640 dalga boyu) ise başka bir prob bağlıdır. 3' ucu normalde aldığı enerjini geri salmaktadır. Reaksiyon sırasında bu iki prob bir araya gelince (maksimum iki baz uzaklıkta) 3' ucundaki probun saldığı enerjini 5' ucundaki prob alır ve 640 dalga boyunda ışık (FRET-floresans rezonans enerji transferi) gerçekleşmektedir. Hidroliz problemleri ise dizi spesifik problemlerdir. Ortamda Quencher (söndürücü) ve reporter (haberci) olmak üzere iki prob bulunmaktadır (Ginzinger 2002). Hibridizasyon problemlerinden farklı olarak ışığın gerçekleşmesi için bu iki probun bir arada olmaması gerekmektedir. Reaksiyon sırasında uzama başlayıp Quencher (söndürücü) parçalandığı zaman reporter (haberci)

prob ışıması yaparak analize olanak sağlamaktadır. SYBR Green ise diziye spesifik olmayıp, ortamda çift zincir DNA'nın minör grubuna bağlanarak ışımaya gerçekleştirmektedir (Ginzinger 2002).

Real Time PCR analizlerinde temel parametre eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct)'dir. Bu değer gerçekleşen amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınımının eşik çizgisini kestiği noktadır. Başka bir ifadeyle; eşik döngü değeri, reaksiyonda ilk anlamlı artışın gerçekleştiği noktayı (eksponensiyal faza ilk geçiş) belirtmektedir. Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri eksponensiyal faza o kadar erken girecektir (Pfaffl 2001). Böylece Real time PCR sırasında farklı örneklerde oluşan ürün miktarı Ct değerleri ile karşılaştırılabilmektedir (Wong ve Medrano 2005). Ayrıca analizler sırasında standart tanımlama çalışmasında kullanılacak kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Kontrol gruplarından ifadesi olan bir örnek, seri dilüsyonları yapılarak, standart olarak tanımlanabilmektedir. Burada önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilmektedir (Pfaffl 2001). Yapılan standart dilüsyonlar varsayılan konsantrasyon miktarları içermektedir. Bu nedenle bu standartlar kullanılarak konsantrasyonlara karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek, kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Reaksiyonu gerçekleşen örneklerin Ct değerlerinin standart eğri üzerinde önceki yapılan dilüsyonlardaki hangi konsantrasyonu temsil ettiklerine bakılarak göreceli miktar tayini belirlenmektedir (Ginzinger 2002).

2.9.1 Real Time PCR çalışmalarında kontrol (Housekeeping) genleri

Real time PCR çalışmalarında analiz edilen tüm örneklerin normalizasyonu için, çeşitli koşullarda ifade düzeyinin değişmediği bilinen bir referans gene ihtiyaç vardır (Pfaffl 2001). Analizler sırasında ilgilenen genin ifade düzeyi, referans gen olarak seçilen

housekeeping genin ifade düzeyine oranlanır. Böylece başta örneklere ait RNA'lerden elde edilen cDNA miktarlarının örnekler arası başlangıç farklılıkları ve deney aşamalarında meydana gelen farklılıklar normalize edilmektedir. Real time PCR çalışmalarında seçilecek türe spesifik housekeeping genin ifade düzeyinin değişim göstermemesi analizin doğruluğunu yükseltmektedir.

2.9.2 Real Time PCR çalışmalarında erime eğrisi (Melting curve)

SYBR dayalı Real time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde 'erime eğrisi' (melting curve) analizi yapılabilmektedir. Her çift zincirli DNA kendine özgün bir 'erime eğrisi (T_m)' yani çift zincirli DNA'nın % 50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklığa sahiptir. Gerçekleştirilen amplifikasyon sonrası sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilmektedir. Bu sırada çift zincirli DNA denatüre olmaya başlar ve boya (SYBR Green) serbest kaldığı için ölçülen floresan miktarı da azalmaya başlamaktadır. Buradan elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgünlüğü tespit edilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tezde bitkisel materyal olarak; Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü koleksiyon parselinde bulunan standart yerli (9 çeşit) ve yabancı (12 çeşit) badem çeşitleri ile yabancı badem türleri (3 tür) ve Gaziantep ili Araban ve Yavuzeli ilçelerinde yürütülen seleksiyon çalışmalarında (Yılmaz 2017) geç çiçeklenme özelliği gösterdiği belirlenen tipler (Araban 11 genotip, Yavuzeli 8 genotip) olmak üzere toplam 43 genotip kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan badem materyalleri (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979, Gülcan 1985, Yılmaz 2017)

<u>Referans Çeşitler</u> <i>Geç çiçeklenen referansları</i> : Ferragnes ve Bertina <i>Erken çiçeklenen referansları</i> : Nurlu ve 48-1
<u>Yerli Çeşitler</u> <i>Erken çiçeklenen</i> : Akbadem, 17-4, Hacılibey, Nurlu (referans çeşit), 48-1 (referans çeşit) <i>Orta geç-geç çiçeklenen</i> : Gülcan I, Gülcan II, Bozkurt, Halitbey
<u>Yabancı Çeşitler</u> <i>Erken çiçeklenen</i> : Ne Plus Ultra, Garrigues <i>Orta geç-geç çiçeklenen</i> : Nonpareil, Supernova, Ferraduel, Guara, Moncayo, Teksas, Yaltinski, Primorski, Ferragnes (referans çeşit), Bertina (referans çeşit)
<u>Yabancı Badem Türleri</u> <i>Amygdalus arabica, Amygdalus webbi, Amygdalus orientalis</i>
<u>Geç Çiçeklenme Gözlenen Seleksiyon Materyalleri</u> Araban 10, Araban 17, Araban 94, Araban 95, Araban 96, Araban 125, Araban 126, Araban 129, Araban 136, Araban 146, Araban 164, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103

Tezde materyal olarak kullanılan yabancı badem türleri, standart çeşitler ve seleksiyon genotiplerinin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

3.1.1 Yerli çeşitler

Akbadem : Erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 63, iç meyve randımanı ise % 48.6'dır (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

17-4 : Erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. El bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 7.3, iç meyve randımanı ise % 54.8'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Hacialibey: Erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 18.1, iç meyve randımanı ise % 31.5 'dur. (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Nurlu: Erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 4, iç meyve randımanı ise % 24'tür (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

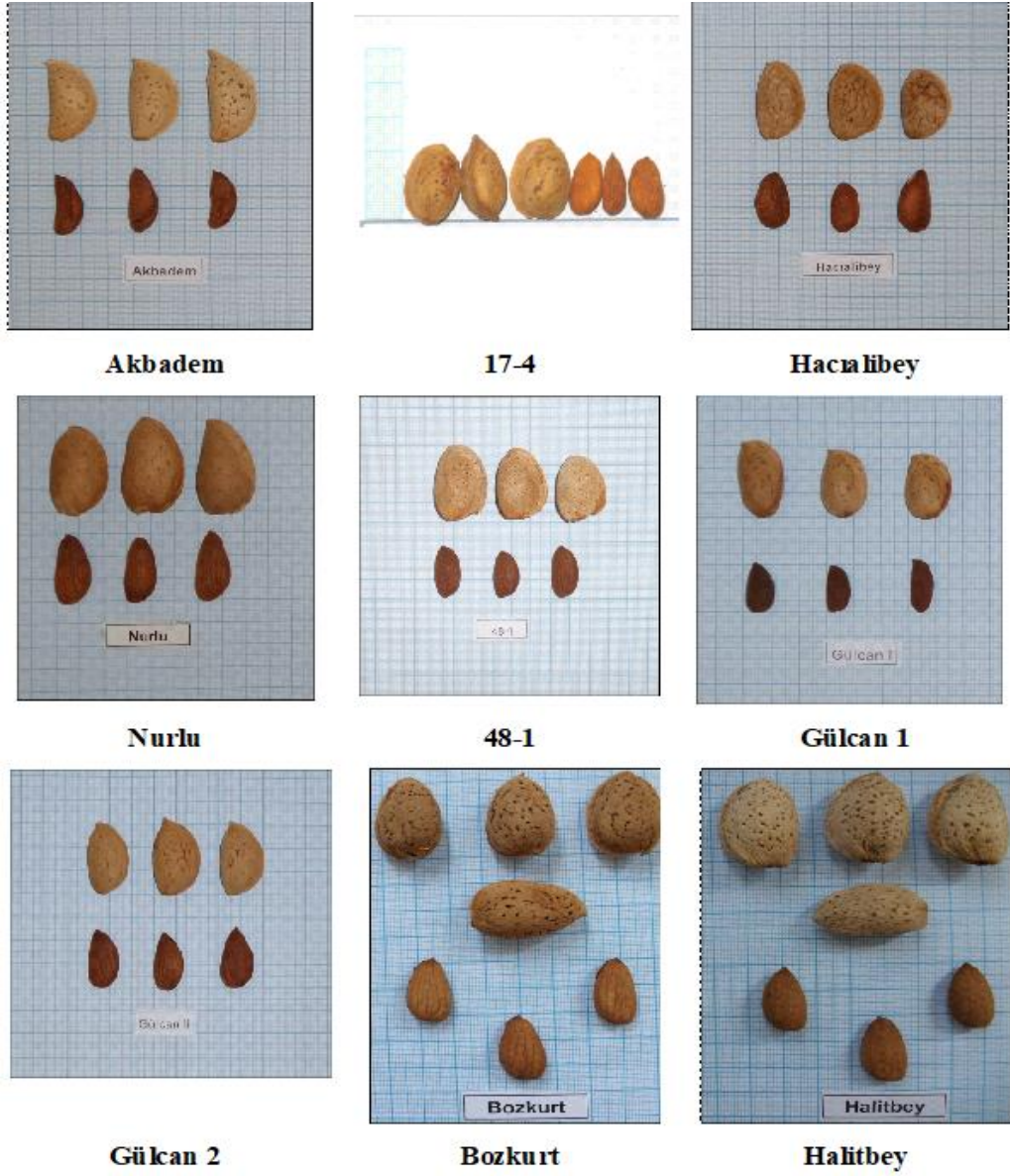
48-1: Çok erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 3.8, iç meyve randımanı ise % 37'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Gülcan 1: Orta geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 11.8, iç meyve randımanı ise % 35.1'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Gülcan 2: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 1.8, iç meyve randımanı ise % 27'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Bozkurt: Orta geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 2.33, iç meyve randımanı ise % 44.4'tür (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).

Halitbey: Geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 8, iç meyve randımanı ise % 43.5'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Materyal olarak kullanılan yerli çeşitler (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020)

3.1.2 Yabancı çeşitler

Ne Plus Ultra: Erken çiçeklenen, kendine verimli bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı %8, iç meyve randımanı ise % 35.4'dür (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Garrigues: Erken çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer alır. Çift meyve oranı % 1.1, iç meyve randımanı ise % 32.1'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Nonpareil: Orta geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. El bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 2.8, iç meyve randımanı ise % 57'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Guara: Geç çiçeklenen, kendine verimli bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 11, iç meyve randımanı ise % 31'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Moncayo: Geç çiçeklenen, kendine verimli bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 8, iç meyve randımanı ise % 30.2'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020). (Şekil 3.2).

Teksas: Geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 3.9, iç meyve randımanı ise % 40.4'dür (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Ferraduel: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 0.3, iç meyve randımanı ise % 27.1'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

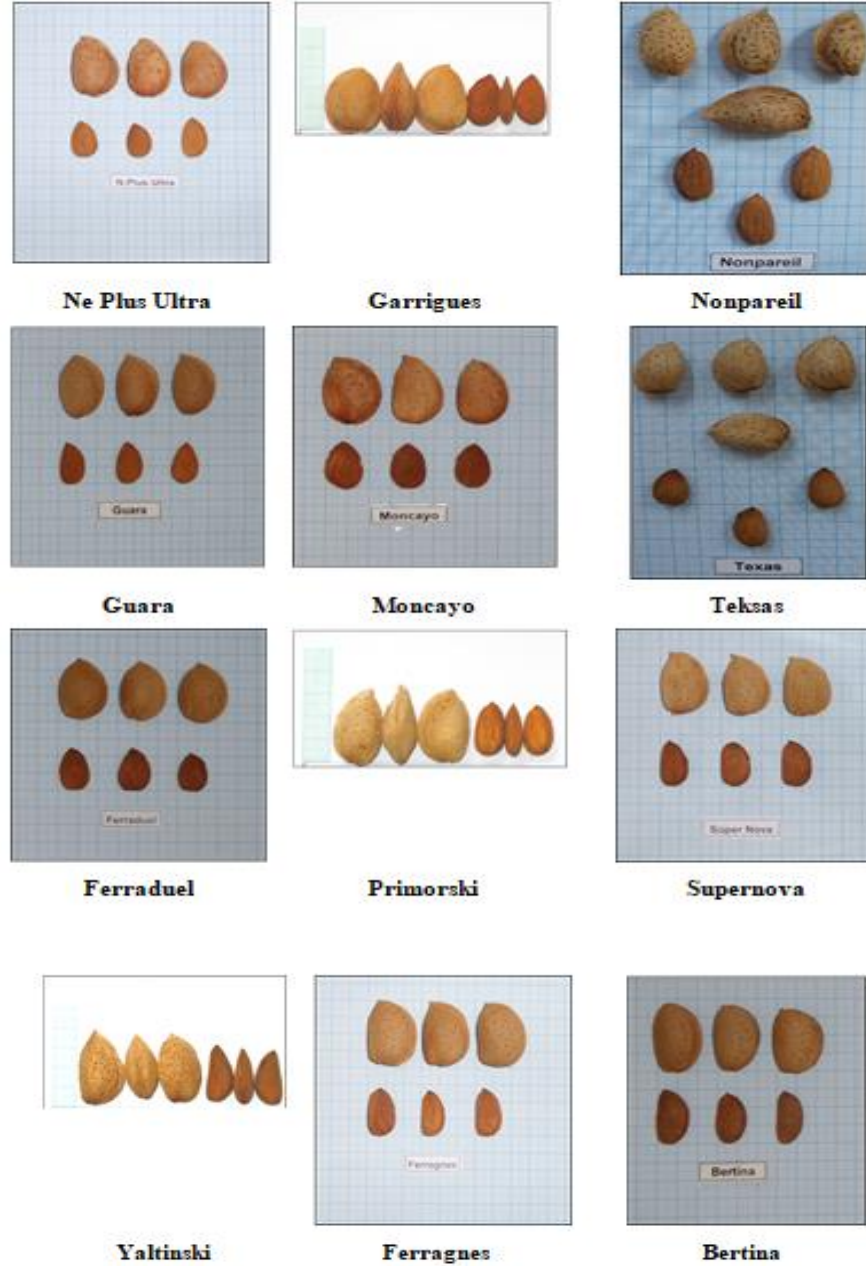
Primorski: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Diş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 5.7, iç meyve randımanı ise % 43.2'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Supernova: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 1, iç meyve randımanı ise % 31'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Yaltinski: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. El bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 1.3, iç meyve randımanı ise % 43.1'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Ferragnes: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli olmayan bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 0, iç meyve randımanı ise % 32.1'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

Bertina: Çok geç çiçeklenen, kendine verimli bir çeşittir. Taş bademi sınıfında yer almaktadır. Çift meyve oranı % 3, iç meyve randımanı ise % 28'dir (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020) (Şekil 3.2).

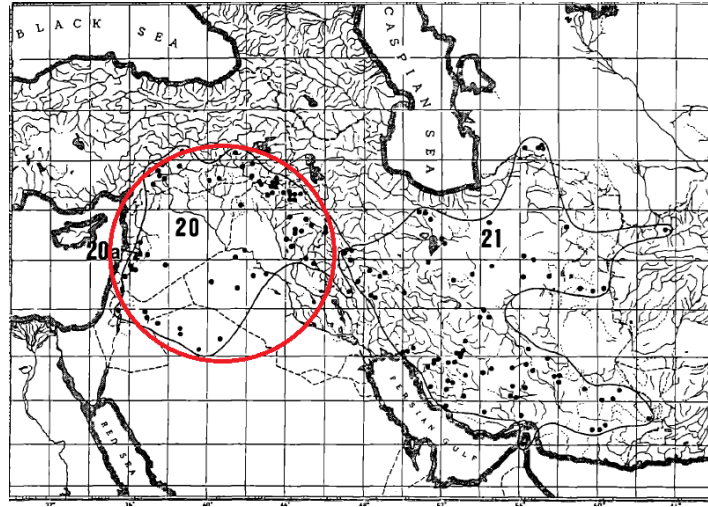


Şekil 3.2 Materyal olarak kullanılan yabancı çeşitler (Atlı vd. 2008, Bozkurt 2020)

3.1.3 Yabani badem türleri

3.1.3.1 *Amygdalus arabica* Oliver

Arabica bir Yakın Doğu türüdür. Menzili güneydoğu Anadolu, Irak ve Suriye'yi kapsamaktadır (Şekil 3.3). Batı İran, İsrail, Ürdün ve Kuzeybatı Suudi Arabistan'dan da tek stantlar bilinmektedir. Bu badem türü, hem alçak hem de dağlık arazilerde kuru çıplak kireçtaşı kayaları ve kumtaşı kayalıklarında yetişir. Dağılımının kuzey kısımlarında bozulmuş meşe ağaçlarında meydana gelirken, daha kurak güneyde orman bozkır, bozkır ve yarı çöl oluşumlarına girmektedir. *A. arabica* kumlu yerlerde ve vadi yataklarında bulunmaktadır. Yükseklik aralığı 150-1200 m arasında değişmektedir, nadiren de 1500 metredir (Browicz ve Zielinski 1984).

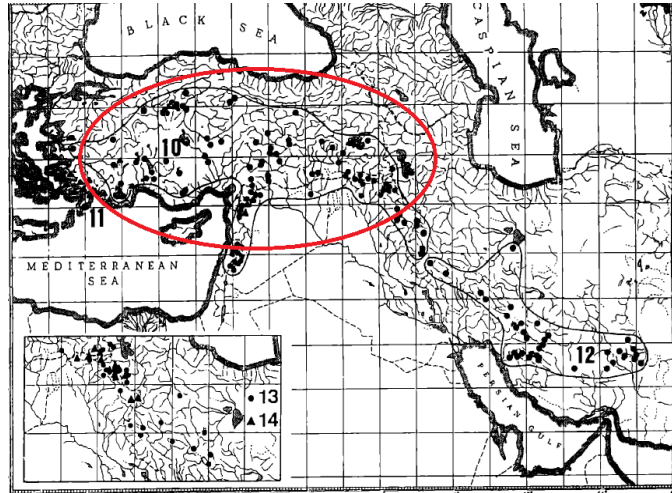


Şekil 3.3 Spartioides seksiyonunun üyelerinin dağılımı: 20: *A. arabica*, 21: *A. scoparia*

3.1.3.2 *Amygdalus orientalis* Mill.

Amygdalus orientalis, bir Yakın Doğu türüdür. Kuzeydoğu Irak'ta ve güneyde ve Orta Anadolu'da en yaygın yabani badem türlerinden biridir (Şekil 3.4). *A. orientalis* esas

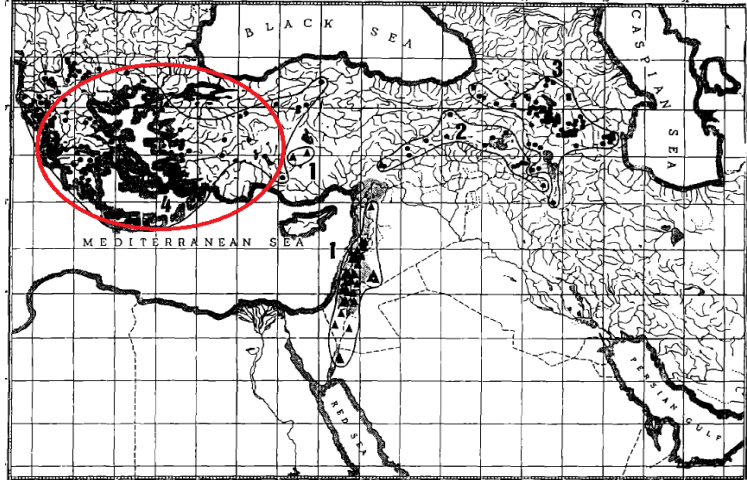
olarak, bozkır veya bozkır ormanı bitki örtüsüyle kaplı kum, gevşek çakıl ve kireçtaşı kayalıkları veya kayalık yamaçlar gibi açık ve güneşli yerleri kaplamaktadır. İlk olarak Suriye’de Şam yakınındaki dağlarda bulunmuştur. Ağaçları dik büyür, üç metreye kadar yükselir ve çok dikenlidir. Genç dalları ve yaprakları çok tüylüdür (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979). Türkiye’de yetişen ve yaygın olan türlerdendir. Ülkemiz doğal kaynaklarından birisi olan *Amygdalus orientalis* badem türünün kıraç, kireçli ve taşlık alanlarda yetiştiği bilinmektedir. Schneider’e göre *Amygdalus orientalis* ile *Amygdalus elaeagnifolia*, Browicz’e göre *Amygdalus orientalis* ile *Amygdalus argentea* ve *Amygdalus elaeagnifolia* ile *Amygdalus Kotschi* sinonimlerdir. Kaliforniya’da yapılan çalışmalara göre, *Amygdalus argentea* çiçeklerinin soğuğa kültür çeşitlerinininkinden çok daha toleranslı olduğu belirtilmiştir (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979).



Şekil 3.4 Orientalis tür grubunun doğu üyelerinin dağılımı (*A. mongolica* hariç):
10. *A. orientalis* Duhamel, 11. *A. graeca*, 12. *A. elaeagnifolia*, 13. *A. kotchyi*,
14. *A. carduchorum*

3.1.3.3 *Amygdalus webbii* Spach.

İlk defa Webb tarafından Çanakkale bölgesinde dikkati çeken bu dikenli tür bütün Balkan yarımadasında, Yugoslavya'da, Yununistan'da, Bulgaristan'da ve Sicilya'da bulunmaktadır. Bu türün yaprakları küçük, dar ve parlaktır. Meyveleri ise uzun olup, çok kısa olan formlarına da rastlamak mümkündür (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979). Godini (2000), İtalyan bölgesi Puglia'dan Sicilya'ya uzanan bir Balkan türü olan *Prunus webbii*'nin kendine uyuşur olması ve çoğu badem bahçelerinin tarih öncesi zamanlardan günümüze kadar tohumla meydana gelmesinden dolayı, bu özelliğin yerli kültüre alınan badem alanlarına katkı sağlayabileceğini göstermiştir (Şekil 3.5). Nadir olarak kendine uyuşur badem çeşitlerinin (özellikle Puglia bölgesinde, İtalya'da keşfedilen) yerel *Amygdalus webbii* ile melezlenmesi yoluyla kendine verimliliklerini elde ettikleri ileri sürülmüştür. *Amygdalus webbii*, kireçtaşı kayaları veya deniz seviyesinden 900 m yüksekliğe kadar çakıllı yamaçlarda açık güneşli yerlerde yetişmektedir. Çok az bir kısmı 1200-1600 m'ye kadar yetişenleri bulunmaktadır. Diğer badem türlerinin aksine, *A. webbii*'nin bazı popülasyonları kendine uyuşmazdır (Socias i Company 1990).




Şekil 3.5 *A. communis* L.'nin yabancı formları 2. *A. trichamygdalus* (El-Mazz) Woronow. 3. *A. fenzliana* (Fritch) Lipsky. 4. *A. webbii* Spach. Batı *A. webbii* bu haritanın sınırlarının ötesinde, güney İtalya'ya doğru uzanmaktadır






3.1.4 Geç çiçeklenme özelliği gözlenen seleksiyon materyalleri

Gaziantep ili Araban ve Yavuzeli ilçelerinde yürütülen seleksiyon çalışmasında (Yılmaz 2017) geç çiçeklenme özelliği bakımından öne çıkan tipler incelenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler (Yılmaz 2017)

Materyal görünümü	Çiçeklenme ve meyve özellikleri
	<p>Araban 10: İlk çiçeklenme 29 Şubat-1 Mart, çiçeklenme sonu 8-19 Mart, çiçeklenme periyodu 9-19 gün.</p>
	<p>Araban 17: İlk çiçeklenme 29 Şubat-3 Mart, çiçeklenme sonu 12-19 Mart, çiçeklenme periyodu 12-20 gün.</p>
	<p>Araban 94: Sert kabuklu meyveleri uzun oval şeklindedir, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç meyve iri ve tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-5 Mart, çiçeklenme sonu 12-23 Mart, çiçeklenme periyodu 19-24 gün.</p>
	<p>Araban 95: Sert kabuklu meyveleri uzun oval şeklindedir, çok sert kabuklu ve iridir. İç meyve iri ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-6 Mart, çiçeklenme sonu 12-23 Mart, çiçeklenme periyodu 19-24 gün.</p>
	<p>Araban 96: Sert kabuklu meyveleri uzun oval şeklindedir, çok sert kabuklu ve ufaktır. İç meyve ufak ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-6 Mart, çiçeklenme sonu 12-23 Mart, çiçeklenme periyodu 19-24 gün.</p>


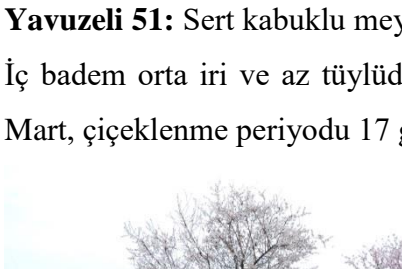



Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler (Yılmaz 2017) (devam)

Materyal görünümü	Çiçeklenme ve meyve özellikleri
	Araban 125: İlk çiçeklenme 29 Şubat-4 Mart, çiçeklenme sonu 12-22 Mart, çiçeklenme periyodu 19-23 gün.
	Araban 129: İlk çiçeklenme 29 Şubat-7 Mart, çiçeklenme sonu 12-27 Mart, çiçeklenme periyodu 13-28 gün.
	Araban 136: İlk çiçeklenme 29 Şubat-6 Mart, çiçeklenme sonu 15-24 Mart, çiçeklenme periyodu 16-18 gün.
	Araban 146: Sert kabuklu meyveleri uzun dar şeklindedir, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç badem ufak ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-10 Mart, çiçeklenme sonu 12-27 Mart, çiçeklenme periyodu 19-24 gün.
	Araban 164: Sert kabuklu meyveleri uzun oval şeklindedir, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç badem orta iri ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-6 Mart, çiçeklenme sonu 11-14 Mart, çiçeklenme periyodu 17-18 gün.


Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler (Yılmaz 2017) (devam)

Materyal görünümü	Çiçeklenme ve meyve özellikleri
	<p>Yavuzeli 19: Sert kabuklu meyveleri kalp şeklinde, çok sert kabuklu ve ufaktır. İç badem ufak ve tüylüdür. İlk çiçeklenme 29 Şubat-6 Mart, çiçeklenme sonu 10-23 Mart, çiçeklenme periyodu 11-23 gün.</p>
	<p>Yavuzeli 24: Sert kabuklu meyveleri elips şeklinde, çok sert kabuklu ve iridir. İç badem orta iri ve tüylüdür. İlk çiçeklenme 29 Şubat-7 Mart, çiçeklenme sonu 9-25 Mart, çiçeklenme periyodu 10-26 gün.</p> 
	<p>Araban 129: İlk çiçeklenme 29 Şubat-7 Mart, çiçeklenme sonu 12-27 Mart, çiçeklenme periyodu 13-28 gün.</p>
	<p>Araban 136: İlk çiçeklenme 29 Şubat-6 Mart, çiçeklenme sonu 15-24 Mart, çiçeklenme periyodu 16-18 gün.</p>

Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler (Yılmaz 2017) (devam)

Materyal görünümü	Çiçeklenme ve meyve özellikleri
	<p>Araban 146: Sert kabuklu meyveleri uzun dar şeklindedir, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç badem ufak ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 2-10 Mart, çiçeklenme sonu 12-27 Mart, çiçeklenme periyodu 19-24 gün.</p>
	<p>Yavuzeli 28: Sert kabuklu meyveleri kalp şeklinde, çok sert kabuklu ve ufaktır. İç badem orta iri ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 29 Şubat-9 Mart, çiçeklenme sonu 11-26 Mart, çiçeklenme periyodu 12-24 gün.</p>
<p>Yavuzeli 29: Sert kabuklu meyveleri kalp şeklinde, çok sert kabuklu ve orta iriliktir. İç badem orta iri ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 29 Şubat-08 Mart, çiçeklenme sonu 13-26 Mart, çiçeklenme periyodu 12-24 gün.</p>	
	
	

Çizelge 3.2 Materyal olarak kullanılan tipler (Yılmaz 2017) (devam)

Materyal görünümü	Çiçeklenme ve meyve özellikleri
	Yavuzeli 102: Sert kabuklu meyveleri kalp şeklinde, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç badem orta iri ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 29 Şubat-04 Mart, çiçeklenme sonu 10-17 Mart, çiçeklenme periyodu 18 gün.
	Yavuzeli 103: Sert kabuklu meyveleri kalp şeklinde, çok sert kabuklu ve orta iridir. İç badem ufak ve az tüylüdür. İlk çiçeklenme 1-6 Mart, çiçeklenme sonu 10-19 Mart, çiçeklenme periyodu 16-19 gün

3.2 Yöntem

3.2.1 Örnek alımı ve bitki yetiştirme

Tezde kullanılan badem materyalleri, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü (Gaziantep) merkez bahçesi ile aynı enstitünün havaalanı bölgesinde yer alan koleksiyon parsellerinden temin edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Sırasıyla Enstitü (Gaziantep) merkez bahçesi ile aynı enstitünün havaalanı bölgesinde yer alan koleksiyon parselinden bir görünüm

Tezde materyal olarak Çizelge 3.1’de belirtilen badem çeşit ve genotiplerine ait çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Bölgedeki hava sıcaklıkları takip edilerek, Ocak ayı sonu itibarı ile hava sıcaklıklarının yükselmeye ve çiçek tomurcuklarının patlayıp sürmeye başladığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle örnek alımları bölgedeki uygun sıcaklık koşulları dikkate alınarak 18 Şubat 2016 ve 30 Ocak 2017 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir

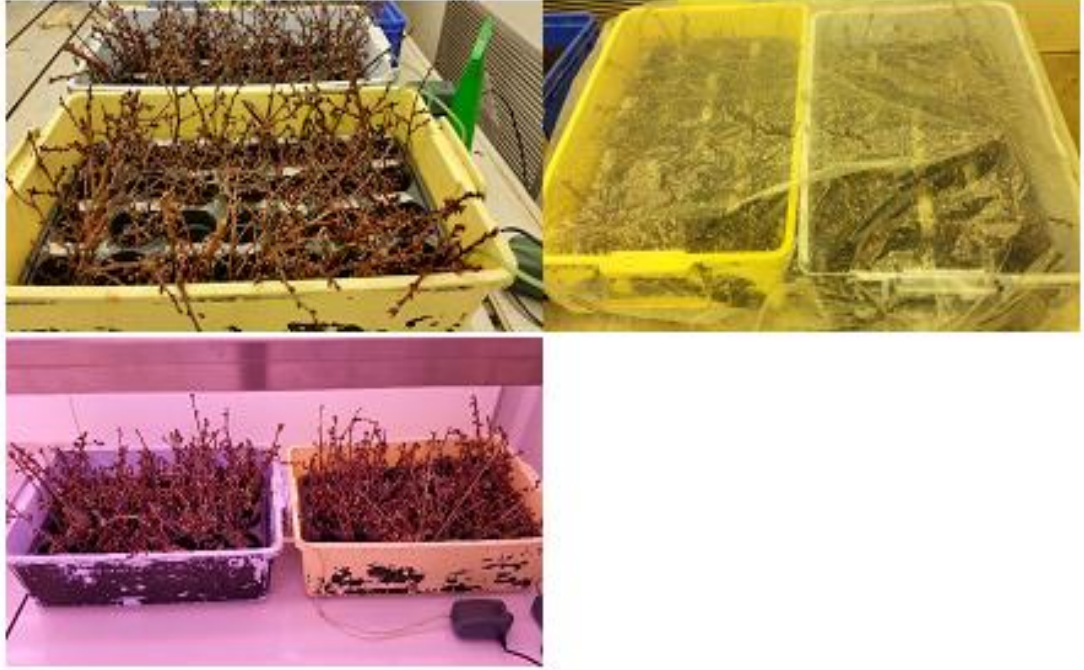
Tezde kullanılan çeşit, tür ve genotiplere ait sağlıklı gelişme gösteren ağaçlardan, üzerinde henüz sürmemiş durumdaki çiçek tomurcuklarını bulunduran 1-2 yaşlı dallar toplanarak, nemini kaybetmeyecek şekilde, vakit kaybedilmeden Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü’ne getirilmiştir. Dallar, üzerlerinde çiçek tomurcuklarını taşıyıcı halde 20 cm’lik dal çelikleri şeklinde hazırlanmış (Şekil 3.7) ve iletim demetlerini tıkayan kallus oluşumunu önlemek amacıyla hava üfleyicilerle sürekli olarak havalandırılan Hoagland besin solüsyonu (Çizelge 3.3) içerisine konularak, iklim odası koşullarında 25°C’de 16/8 saat gündüz-gece fotoperiyotta sürmeye bırakılmıştır (Şekil 3.8-3.9).



Şekil 3.7 Denemede kullanılan bazı badem çeşit ve genotiplerine ait görünüm
(sırasıyla Araban 129, Araban 17 genotipleri ve Ferraduel çeşidi)



Şekil 3.8 Sürdürmeye alınmadan önce çeliklerin hazırlanışı



Şekil 3.9 İklim odasında sürmeye alınan çeliklerin görünüşleri

Çizelge 3.3 Hoagland Besin Solusyonu'nda bulunan makro ve mikro elementler

Makro Elementler (10×)	(g/l)	Mikro Elementler (1×)	(g/l)
K_2SO_4	15.7	H_3BO_3	0.124
KH_2PO_4	2.7	$MnSO_4$	0.066
$MgSO_4.7H_2O$	24	$CuSO_4.5H_2O$	0.100
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	47.23	NH_4Mo	0.048
KCl	0.0746	$ZnSO_4.7H_2O$	0.155
(FeEDTA (1000×): 365 g/l)			

3.2.2 Çiçeklenme zamanı örnekleme

İklim odasına alınan tüm çeşit ve genotiplerin herbirinde, pembe tomurcuk safhasına kadar günlük gözlemler yapılarak en uygun pembe tomurcuk dönemleri yakalanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Geç çiçeklenme değerlendirilmesinde kullanılan pembe tomurcukların görünümü

Yerli ve yabancı standart çeşitlerin, yabancı türlerin ve seleksiyon materyallerinin iklim odasında pembe tomurcuk açma zamanları ise Şekil 3.11’de belirtilmiştir. Doğadan selekte edilen genotiplerin çiçeklenme zamanı yeşil renk, yerli ve yabancı standart çeşitlerin çiçeklenme zamanları ise pembe renk ile gösterilmiştir (Şekil 3.11).

Çeşitler	Şubat											Mart										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>A. orientalis</i>																						
Hacıalibey																						
Nurlu																						
<i>A. webbii</i>																						
<i>A. arabica</i>																						
Bozkurt																						
Ne Plus Ultra																						
Halitbey																						
Nonpareil																						
17-4																						
Teksas																						
Akbadem																						
Bertina																						
Yaltinski																						
Gülcan 1																						
Gülcan 2																						
48-1																						
Supernova																						
Ferradual																						
Ferragnes																						
Moncayo																						
Guara																						
Primorski																						
Garrigues																						
Araban 10																						
Araban 17																						
Araban 94																						
Araban 95																						

Şekil 3.11 Yerli ve yabancı standart çeşitlerin, yabancı türlerin ve seleksiyon materyallerinin iklim odasında pembe tomurcuk açma zamanları



Çeşitler	Şubat														Mart											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22				
<u>Arabacı 96</u>																										
<u>Arabacı 125</u>																										
<u>Arabacı 126</u>																										
<u>Arabacı 129</u>																										
<u>Arabacı 136</u>																										
<u>Arabacı 146</u>																										
<u>Arabacı 164</u>																										
<u>Yavuzeli 19</u>																										
<u>Yavuzeli 24</u>																										
<u>Yavuzeli 26</u>																										
<u>Yavuzeli 28</u>																										
<u>Yavuzeli 29</u>																										
<u>Yavuzeli 51</u>																										
<u>Yavuzeli 102</u>																										
<u>Yavuzeli 103</u>																										

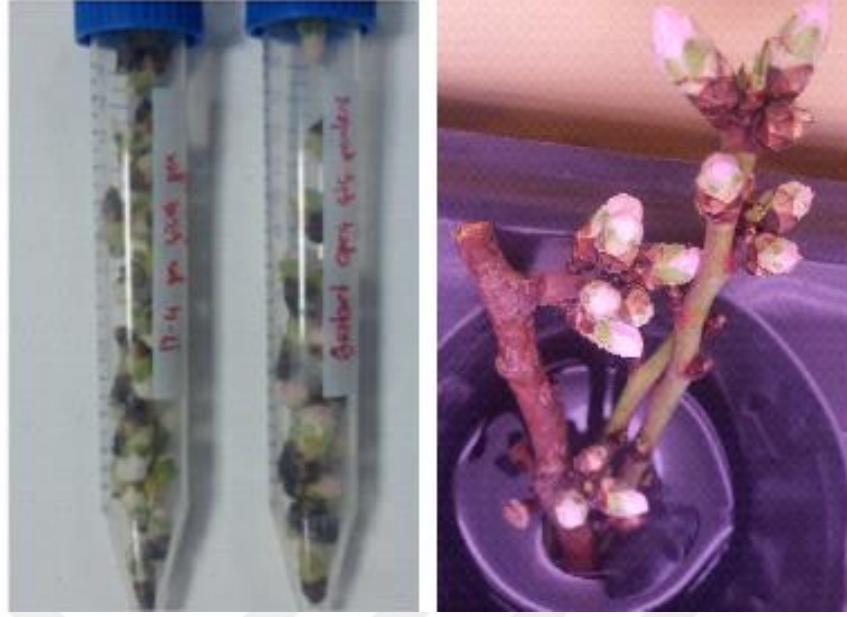
Şekil 3.11 Yerli ve yabancı standart çeşitlerin, yabancı türlerin ve seleksiyon materyallerinin iklim odasında pembe tomurcuk açma zamanları (devam)

Geç çiçeklenme değerlendirmeleri için kullanılacak tomurcuk materyalleri; tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü, her tekerrürde 4-5 çiçek tomurcuğu olacak şekilde toplanmıştır. Geç çiçeklenme kontrolü (0. gün) olarak her çeşit/genotipten (3 tekerrürlü) sürmemiş tomurcuklar alınarak 15 ml'lik falkon tüplere konulmuş ve RNA izolasyonu için -80 °C'de muhafazaya alınmıştır (Şekil 3.12). Ayrıca, iklim odasında tomurcukları pembe tomurcuk dönemine ulaşan her çeşit/genotipten 3 tekerrür olmak üzere pembe tomurcuklar toplanmış ve RNA izolasyonu için -80 °C'de muhafazaya alınmıştır. Bu örnekler aynı zamanda soğuk uygulamalarının kontrolüdür (Şekil 3.13).

Referans çeşitlerde belirlenen zaman aralığı (iklim odasına alınmasından pembe tomurcuk dönemine kadar geçen zaman) daha sonra tüm materyallerin ifade analizlerinde zaman aralığı olarak kullanılmıştır. Bu aşamada, Real time PCR kontollerinde 0. günde alınan çeşit/genotiplere ait tomurcuklar kullanılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin kontrol (0. gün) örneklerinden bir görünüm



Şekil 3.13 Geç çiçeklenme değerlendirmesine ait ve soğuk uygulamalarının kontrolü olan pembe tomurcuklar

3.2.3 Soğuk stresi örnekleme ve uygulaması

Soğuk uygulamaları kapsamında; her bir çeşit/genotipten 3 tekerrürlü olarak toplanan pembe tomurcuklar -2°C 'de 1., 1,5., 3., 6. ve 12. saatlerde soğuğa maruz bırakılmıştır. Soğuk uygulaması tamamlanan tomurcuklar RNA izolasyonu amacı ile -80°C koşullarında muhafazaya alınmıştır (Şekil 3.14).



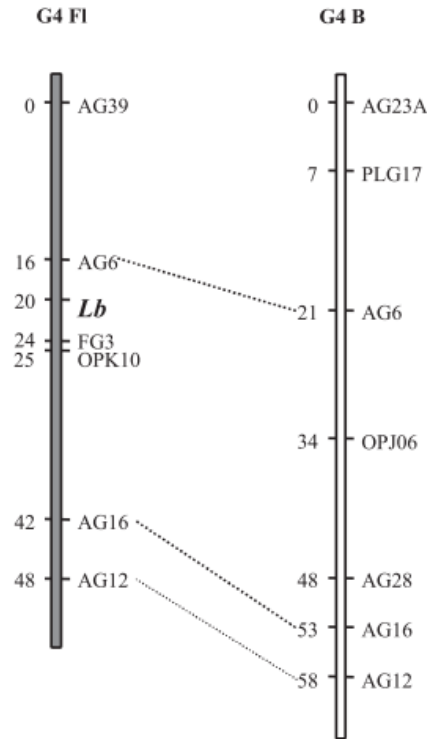
Şekil 3.14 Soğuk stresine alınan tomurcuklardan ve soğutma cihazından bir görünüm

Referans çeşitlerde soğuğa toleransla ilişkili *CBF1* ve *CBF2* genlerinin gen ifade analizleri ön analizler ile incelenmiş ve her iki gen bölgesi için gen ifadesinin en yüksek olduğu (Ct değerinin en düşük olduğu) 6. saat zaman aralığı olarak seçilmiş, çiçeklenme zamanında son günde toplanan pembe tomurcuklar (Soğuk stresi uygulamalarında 0. saat) kontrol örnekleri olarak kullanılmıştır (Şekil 3.13). Böylelikle araştırmanın iki basamağında (geç çiçeklenme ve soğuk gen ifade analizlerinde) kontrollü bir bağlantı sağlanmıştır.

Tüm genotiplerin tomurcukları soğuk uygulaması kapsamında 3 tekerrürlü olarak kağıt peçetelerde muhafaza edilerek -2 °C’de 6 saat soğuğa maruz bırakılmıştır. Tüm örneklerde soğuğa toleransla ilişkili *CBF1* ve *CBF2* genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir.

3.2.4 Geç çiçeklenmeye yönelik MAS (Markır Assisted Selection-Markıra Dayalı Seleksiyon) markır uygulamaları

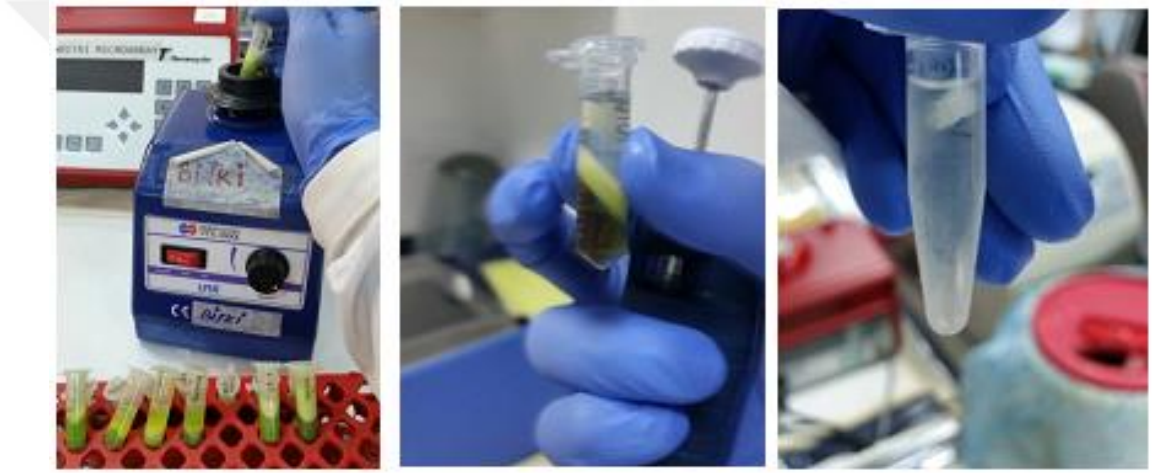
Geç çiçeklenme özelliğinin gen ifadesinin tüm genotiplerde Real Time PCR uygulamasıyla tespit edilmesinin yanı sıra, tüm genotipler bu özellik ile ilişkili RAPD ve SSR markırlarıyla da taranmıştır. Taramada, bademle ilgili literatürde (Ballester vd. 2001) yer alan *Lb* genine yönelik tespit edilen OPK10 RAPD (5’-GTGCAACGTG-3’) geç çiçeklenme markır (Şekil 3.15) ve Rasouli vd. (2014) tarafından tespit edilen SSR markırları (UDP96003, EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035) olmak üzere toplam 5 markır kullanılmıştır.



Şekil 3.15 OPK10 markırının-*Lb* harita üzerinde görünüşü (Ballester vd. 2001)

3.2.4.1 DNA izolasyonu

İklim odasındaki çeliklerden süren tüm çeşit ve genotiplere ait genç yapraklardan yaprak örnekleri alınmıştır. Tüm materyallerde DNA izolasyonları (Şekil 3.16) Doyle ve Doyle (1987)'nin tanımladığı Lefort vd. (1998) yöntemine göre (Çizelge 3.4) yapılırken, DNA kalite ve miktar ölçümleri % 1'lik agaroz jel elektroforezi ve Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm genotiplere ait DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü Araştırma Bulguları bölümünde verilmektedir.



Şekil 3.16 DNA izolasyon aşamaları (supernatant kısmı ve izo-propanol ile çöktürme)

Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyon solüsyonu içeriği

<i>Son konsantrasyon</i>	<i>50 ml</i>
50 mM TRIS pH 8.0	2 ml 1 M TRIS pH 8.0
50 mM EDTA pH 8.0	4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
0.4 M LiCl	10 ml LiCl 4 M
1 % CTAB	1 g CTAB
2 % PVP	2 g PVP
0.5 % TWEEN 20	0.5 ml TWEEN 20

DNA izolasyon metot aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

- ✓ Her çeşit/genotipe ait 100 mg yaprak dokusuna 1 ml DNA ekstraksiyon solusyonu eklenmiştir (örnek başına 10 µl 2-Merkaptoetanol içermiştir).
- ✓ Örnekler su banyosunda 65°C'de 25 dk tutulmuştur, 10 dk aralarla karıştırılmıştır.
- ✓ Oda sıcaklığında 5 dk. soğutulmuştur.
- ✓ Her örnek üzerine 0.7 ml klorofom/izoamil alkol (24:1) eklenerek 20-25 defa sallanılmıştır. Ardından örnekler 30 dk boyunca buz (+4°C) üzerine bekletilmiştir.
- ✓ Bu örnekler 20 dk. boyunca 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Elde edilen süpernatant veya üst sıvı (0.7 ml) yeni bir tüpe aktarılmıştır ve üzerine 0.8 ml isopropanol eklenmiştir.
- ✓ Ardından örnekler 15-20 dk buz üzerinde (Tercihen gece boyu -20 °C) bekletilmiştir.
- ✓ Ardından örnekleri 10 dk. 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve üst sıvı atılmıştır.
- ✓ Altta kalan katı (pellet) üzerine 1 ml %70lik etanol eklenmiştir ve 2 dk 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Etanol uzaklaştırılarak elde edilen pelletler kurutulmuştur.
- ✓ 50-60 µl nucleaz içermeyen H₂O' da çözülmüştür (pipetle pellet oynatılmıştır, gece boyu 4 °C'de tutularak DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır).
- ✓ 100 µl DNA için 10 µl RNase eklenmiş olup, 37 °C de 20 dk bekletilmiştir.

3.2.4.2 PCR reaksiyonlarının hazırlanması ve PCR

Bademde çiçeklenme zamanına yönelik literatürde (Rasouli vd. 2014) önerilen UDP96003, EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 4 SSR primeri kullanılmıştır. Primerlere ait baz dizileri, kullanılan floresan boya, beklenen bant büyüklüğü ve kaynak bilgileri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5 SSR lokuslarına ait primer bilgileri

No	Lokus adı	Primer dizileri (5'...3')	Floresan İşaretleme boyası	Beklenen bant büyüklüğü (bp)	Kaynak
1	UDP96003-F	TTGCTCAAAA GTGTCGTTGC	-	143	Cipriani vd. 1999, Rasouli vd. 2014
	UDP96003-R	ACACGTAGTG CAACACTGGC	-		
2	EPPCU2584-F	TTCAGCTCATC TAGTTTCATCA CC	Yeşil	128-133	Rasouli vd. 2014
	EPPCU2584-R	CACGGTTCGA ACAACATCTG			
3	CPPCT008-F	GAGCTCTCAC GCATTAGTTT	Yeşil	153-161	Rasouli vd. 2014
	CPPCT008-R	TTTGACTGCAT AACAAAACG			
4	BPPCT035-F	TGAAGGATGG CTCTGATACC	Mavi	113-126	Rasouli vd. 2014
	BPPCT035-R	AATTCATCTAC TTCTTCCTCAA GC			

3.2.4.3 RAPD markırı

OPK10 RAPD markırı tahmini geç çiçeklenme genine (*Lb*) 5 cM yakınlıkta olup, geç çiçeklenme özelliğine ilişkin güvenilir sonuç verdiği belirtilmiştir (Ballester vd. 2001). Bu markırın beklenen ayırım bandının uzunluğu (bp) 1350 olarak verilmiştir. Literatürden alınan veriye dayanarak, çalışmamızda OPK10 RAPD markırı kullanılmış ve tüm materyallerde RAPD PCR uygulamaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 RAPD-MAS markırı optimizasyon koşulu

İçerik	Miktar
DNA (200ng)	4 µl
Buffer (5X)	5 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3.5 µl
Primer (20 pmol)	3 µl
Taq Polimeraz (5 ünite)	0.3 µl
ddH ₂ O	7.2 µl
Toplam	25 µl

RAPD PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı :

- ✓ 94 °C' de 5 dk,
- ✓ 94 °C' de 45 sn.
- ✓ 32 °C' de 45sn.
- ✓ 72 °C' de 1 dk 20 sn.
- ✓ 72°C' de 10 dk olmak üzere toplam 41 döngü olarak uygulanmıştır.

3.2.4.4 Kapiller elektroforez ve allel görüntülerinin alınması

Tezde kapiller elektroforez amacıyla Beckman CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.17). Çeşitlere ait genotiplerin PCR ürünleri işaretlemeye kullanılan floresan (Prologo, wellred işaretli primerler, Fransa) boyalara göre değişik oranlarda (1:5, 1:10 gibi) 20 µl SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltilmiştir. Üzerlerine 0,4 µl size standart-400 eklendikten sonra CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi'nde elektroforez edilmiştir. Daha sonra her bir lokusa ait pikler; tipleri ve renkleri göz önüne alınarak heterozigot ve homozigot olarak görüntülenmiştir. Reaksiyonlar gerekli görüldüğü zaman yeterli sayıda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.17 Beckman CEQTM 8800 kapiller elektroforez sistemi

3.2.4.4.1 SSR markırları

Çiçeklenme zamanına yönelik kullanılan SSR primerlerine ait veriler, Real time PCR uygulamalarında çiçeklenme ile ilişkili genlerin özellikle varlığına ön bulgu olarak kullanılmıştır. UDP96003 SSR markırının literatürde genotipler arasında çiçeklenme zamanı ile ilgili ayırım yaptığı belirtilmiştir. Ancak bu markırdan elde edilen bantların olup olmama, kodominat (çift bant) gösterip göstermeme durumu değerlendirildiğinde çiçeklenme zamanı ile ilgili doğru bir ayırım sağlamadığı tespit edilmiştir. Daha sonrasında bir literatür (Sánchez-Pérez vd. 2007) bilgisinde bu markırın tahmini *Lb* genine çok uzak (40 cM) olduğu anlaşılmıştır. Bu durum Rasouli vd. (2014) makalesinde de teknik detay verilmeden vurgulanmıştır. Ancak EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 SSR markırlarının genotiplerde çiçeklenme zamanının ayırt etmede UDP96003 SSR markırına göre daha etkili olduğu bilgisi de sunulmuştur. O nedenle çalışmamızda EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 SSR markırlarının kullanımına gidilmiştir.

PCR sonrası lokuslara ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek ilgili bant profilleri belirlenmiştir. UDP96003, EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 markırlarının PCR optimizasyonu Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 UDP96003, EPPCU2584, CPPCT008 ve BPPCT035 SSR markırlarının PCR optimizasyon koşulu

İçerik	Miktar
DNA (200ng)	6 µl
Buffer (5X)	3 µl
dNTP (0.5 mM)	1.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.1 µl
Primer Forward (5 pmol)	0.75 µl
Primer Reverse (5 pmol)	0.75 µl
Taq Polimeraz (5 ünite)	0.3 µl
ddH ₂ O	0.6 µl
Toplam	15 µl

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı (Touch-down PCR):

- ✓ 94 °C' de 3 dk,
- ✓ 94 °C' de 1 dk
- ✓ 63°C'de 1 dk 45sn
- ✓ 72 °C' de 2 dk
- ✓ 72°C'de 10 dk olmak üzere toplam 21 döngü olarak uygulanmıştır.

Her PCR reaksiyonuna bir adet negatif kontrol (DNA içermeyen örnek) da eklenerek marköre ait reaksiyonlarda kontaminasyon olup/olmadığı kontrol edilmiştir. PCR sonrası lokuslara ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek ilgili bant profilleri belirlenmiştir.

3.2.4.5 Gen ifade analizleri

3.2.4.5.1 Örnek ezimi

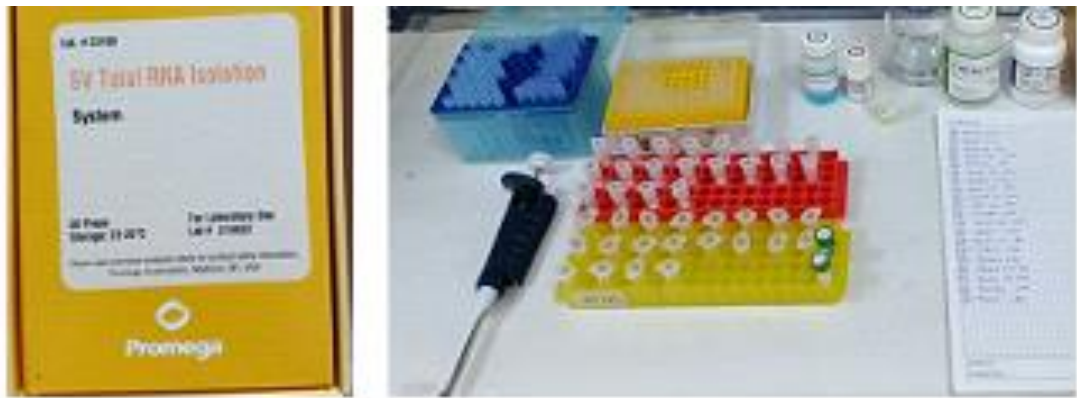
RNA izolasyonu öncesi geç çiçeklenme değerlendirmesinin kontrol örneklerinde sırasıyla tomurcuk pullarının ayrılması ve sıvı azot yardımıyla tomurcukların havan içinde ezilmesi tamamlanmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Tomurcuklarda pul ayrımı ve örnek ezimi

3.2.4.5.2 RNA izolasyonu

SV Total RNA İzolasyon kiti (Promega-Cat no:Z3100) kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.19). RNA kalite ve miktar ölçümleri, % 1'lik agaroz jel elektroforezi ve Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu tekrar gerektiren örneklerde yenilenmiştir.



Şekil 3.19 SV Total RNA izolasyon Promega kiti (Cat no:Z3100)

RNA izolasyon metot aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

- ✓ Bitki doku örneği sıvı azot ile porselan havanda ezilmiştir
- ✓ 30 mg ezilmiş doku örneğine 175µl RNA lysis buffer eklenmiştir. Üzerine 350 µl RNA dilüsyon buffer eklenmiştir. Tüp votekslenmiştir.
- ✓ Karışım maximum hızda oda koşulunda 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Pellete dokunmadan üst faz yeni temiz 1.5'luk tüpe aktarılmıştır.
- ✓ Üzerine 200 µl % 95'lik ethanol eklenmiş, 3-4 kez pipetaj yapılmıştır.
- ✓ Karışım Spin kolona aktarılmış ve 12000-14000 rpm'de spin kolon tüpleri santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Alt sıvı dökülmüştür. Bu aşamadan sonra DNase mix'nin hesaplanmasına geçilmiştir. Her bir örnek başına 40 µl yellow core buffer, 5 µl 0.09M MnCl₂ ve 5 µl DNase olacak şekilde mix 1.5'luk tüpte hazırlanmıştır.
- ✓ Her bir filtrenin üzerine 50 µl olacak şekilde bu karışım eklenmiştir. Bu aşamada karışım filtreye dokunmadan eklenmelidir. Tüpler oda sıcaklığında, 25 dakika bekletilmiştir.
- ✓ Bekleme süresi sonrasında, tüplerin üzerine 200 µl SV DNase Stop solution fitrelerin üzerine eklenmiştir.
- ✓ 12000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı dökülmüştür.
- ✓ Filtrelerin üzerine 600 µl Wash solution eklenmiştir.
- ✓ 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı dökülmüştür.
- ✓ Filtrelerin üzerine 250 µl Wash solution eklenmiştir.
- ✓ Maximum hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı dökülmüştür. Alt tüpler bu basamakta atılmıştır.
- ✓ Yeni 1.5'luk tüpler alınmıştır. Bu tüplerin üzerine fitreler yerleştirilmiştir. Fitrelerin üzerine 30 µl RNase Free water eklenmiştir. Oda sıcaklığında tüpler 5 dakika bekletilmiştir.
- ✓ 12000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı artık RNA'dır. Bu sıvı alınmış, tekrar filtreye konulmuştur ve bu sefer 2 dakika beklenmiştir.
- ✓ 12000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı artık RNA'dır. Buzdan ayırmadan agaroz jelde kontrol edilmiş, porsiyonlanarak -80 °C'ye kaldırılmıştır.

- ✓ Her çeşit/genotipe ait 100 mg yaprak dokusuna 1 ml DNA ekstraksiyon solusyonu eklenmiştir (örnek başına 10 µl 2-Merkaptoetanol içermiştir).
- ✓ Örnekler su banyosunda 65°C'de 25 dk. tutulmuştur, 10 dk. aralarla karıştırılmıştır.
- ✓ Oda sıcaklığında 5 dk. soğutulmuştur.
- ✓ Her örnek üzerine 0.7 ml klorofom/izoamil alkol (24:1) eklenerek 20-25 defa sallanılmıştır. Ardından örnekler 30 dk. boyunca buz (+4°C) üzerine bekletilmiştir.
- ✓ Bu örnekler 20 dk. boyunca 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Elde edilen süpernatant veya üst sıvı (0.7 ml) yeni bir tüpe aktarılmıştır ve üzerine 0.8 ml isopropanol eklenmiştir.
- ✓ Ardından örnekler 15-20 dk. buz üzerinde (Tercihen gece boyu -20 °C) de bekletilmiştir.
- ✓ Ardından örnekleri 10 dk. 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve üst sıvı atılmıştır.
- ✓ Altta kalan katı (pellet) üzerine 1 ml % 70'lik etanol eklenmiştir ve 2 dk. 4 °C'lik soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Etanol uzaklaştırılarak elde edilen pelletler kurutulmuştur.
- ✓ 50-60 µl nucleaz içermeyen H₂O' da çözülmüştür.
- ✓ 100 µl DNA için 10 µl RNase eklenmiş olup, 37 °C de 20 dk. bekletilmiştir

3.2.4.5.3 Real time PCR uygulamaları

Real time PCR uygulamaları kapsamında belirlenen aday genlere primerlerin oluşturulması, bu primerlerin homolog gen bölgelerinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezinde kontrolü, çoğaltımı sağlanan PCR ürünlerinin pürifikasyonu, PCR ürünlerinde dizi analizi ve dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real time PCR primerlerinin oluşturulması basamakları yürütülmüştür.

3.2.4.5.3.1 Kullanılan aday genlere ve primerlere ait bilgiler

Real time PCR uygulamalarında kullanılan çiçeklenme zamanı ve soğuk stresi toleransı ile ilişkili belirlenen aday genlere ait bilgiler Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8 Kullanılan aday genlere ait bilgiler

Konu	Gen (Tür), Literatür
Çiçeklenme zamanı genleri	<i>PabSOC1</i> (Kayısı), Trainin vd. 2013 <i>PpFT</i> (Şeftali), Silva vd. 2005
Soğuk tolerans genleri	<i>PdCBF1</i> (Badem), <i>PdCBF2</i> (Badem), Barros vd. 2012

Bu aday genlere yönelik primerler ise Primer 3 programı ile dizayn edilmiştir. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Bu aday genlerin mRNA dizilerine yönelik primerler ise Primer 3 programı ile Metabion International AG firması tarafından dizayn edilmiştir.

Geç çiçeklenme ile ilişkili *PpFT* ve *PabSOC1*, soğuğa toleransla ilişkili *PdCBF1* ve *PdCBF2* primerleri kullanılmıştır. Genlere ait dizayn edilen primer dizileri Araştırma Bulguları kısmında (4.6.2 Kullanılan primerler, Çizelge 4.14) verilmiştir.

3.2.4.5.3.2 Homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) PCR’da çoğaltılması

Çiçeklenme zamanıyla ilişkili, şeftaliden *PpFT*, kayısıdan *PabSOC1* ve bademden *PbAct*, soğuğa toleransla ilişkili bademden *PdCBF1* ve *PdCBF2* gen bölgelerinin mRNA dizilimlerine yönelik dizayn edilen primerler ile çeşitli ön PCR optimizasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda kullanılan PCR protokolü Çizelge 3.9’da yer almaktadır.

Çizelge 3.9 Homolog gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR koşulları

İçerik	Miktar (µl)
DNA (200ng)	6
Buffer (5X)	5
dNTP (0.5 mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
Primer Forward (10 pmol)	2
Primer Reverse (10pmol)	2
Taq Polimeraz	0.3
ddH ₂ O	6.2
Toplam	25

PpFT, PabSOC1, PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin PCR reaksiyonu için Touch-down 65 PCR programı kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı (Touch-down 65 PCR):

- ✓ 94 °C' de 3 dk.
- ✓ 94 °C' de 1 dk.
- ✓ Lokusa bağlı olarak 65°C- 56°C değişen sıcaklık aralıklarında 1 dk. 45sn
- ✓ 72 °C' de 2 dk.
- ✓ 72°C' de 10 dk. olmak üzere toplam 25 döngü olarak uygulanmıştır.

3.2.4.5.3.3 PCR reaksiyonu sonrası homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri (25 µl) % 2'lik agaroz jel elektroforezinde 100 bç DNA Ladder (Solis Biodyne-100bç Ladder) eşliğinde, 2 saat yürütülmüştür ve beklenen bantların iyice açılması sağlanmıştır. Yürüme sonunda her bir gen bölgesine ait beklenen büyüklüğe sahip bantlar UV görüntüleme sistemi altında steril bisturi yardımıyla kesilmiş, darası alınan 1.5 ml'lik ependorf tüplere konulmuş ve sonrasında, PCR pürifikasyon aşamasına geçilmiştir. PabSOC1, PdCBF2, PpFT, PdCBF1 primerlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezinde PCR amplifikasyonları Araştırma Bulguları kısmında (4.6.4 PCR reaksiyonu sonrası homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) agaroz jel elektroforezi, Şekil 4.22) verilmiştir.

3.2.4.5.3.4 PCR ürünlerinin pürifikasyonu

Promega (Cat No: A9280); "Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System" ile aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır.

- ✓ Jelden alınan bantların ağırlıkları ölçülmüştür.
- ✓ Üzerlerine 1:1 oranında (ağırlık: hacim) “membran binding” solüsyonundan eklenmiştir ve 65 °C de eritilmiştir.
- ✓ Kolonlar temiz tüpe yerleştirilmiş, üzerlerine örnekler eklenmiştir ve 1 dk. beklenmiştir.
- ✓ 14000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dk. santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Alt solusyonları dökülmüştür.
- ✓ Kolonlara 700µl “Membran Wash” solüsyonu eklenmiştir.
- ✓ 14000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dk. santrifüj yapılmış ve alt solusyon dökülmüştür.
- ✓ “Membran Wash” solüsyonundan 500µl eklenerek 14000 rpm’de 5 dak. santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Kolonlar temiz tüplere takılmıştır.
- ✓ 25µl nükleaz içermeyen su membrana değmeden membranın tam ortasına bırakılmıştır ve 1 dk. bekletilmiştir.
- ✓ 14000 rpm’de, oda sıcaklığında, 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Kolonlar atılıp, tüplerin kapakları kapatılmıştır ve +4°C’de saklanmıştır.

PCR ürünlerinin pürifikasyonu sonrasında saflaştırılmış PCR ürünleri % 1.5'luk agaroz jel elektroforezinde görsel olarak tekrar kontrol edilmiş, miktar ve saflık tayinleri ise, Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre cihazında belirlenmiştir. Kontrol edilen pürifiye PCR ürünlerinde dizi analizi hizmeti alımı (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara) şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5.3.5 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real Time PCR primerlerinin oluşturulması

Elde edilen dizilerden primer programı ile yeniden primer dizaynı yapılarak, badem spesifik Real Time PCR primeleri oluşturulmuştur. Primer dizaynı NCBI Blast yardımı

ile Primer Designing Tool programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer tasarımına örnek görüntüler Araştırma Bulguları kısmında (4.6.6 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real Time PCR primerlerinin oluşturulması, Şekil 4.28-4.31) verilmiştir. Dizi analizi sonucu badem spesifik oluşturulan Real Time PCR primerlerine ait bilgiler ise Çizelge 4.16'da (Araştırma Bulguları, 4.6.6 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real Time PCR primerlerinin oluşturulması) sunulmuştur.

3.2.4.5.3.6 Real Time PCR reaksiyonları

3.2.4.5.3.6.1 cDNA sentezi

Real Time PCR uygulamalarının ilk aşaması olarak, izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için Eurx NG Dart RT marka (Cat no:E0801) cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Çizelge 3.10'da kitin içerdiği komponentlerle belirtilen reaksiyon koşullarında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmış ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde de kontrol edilmiştir. Real Time PCR aşamasını takip eden ikinci aşamada ise geç çiçeklenme ve soğuğa toleransla ilişkili dizayn edilen primerlerin Real Time PCR'da ön optimizasyonu reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.10 cDNA sentez koşulu ve reaksiyon programı

İçerik	Hacim (µl)	Reaksiyon Koşulları
RNA	14	55 °C 30 dk 85°C 5 dk 10°C forever
Oligo(dt) ₂₀ primer	1	
5x NG cDNA Buffer	4	
NG dART RT Mix	1	
Toplam	20	

3.2.4.5.3.7 Real Time reaksiyonlarına ait primer optimizasyonu ve standart eğrilerin oluşturulması

Oluşturulan badem spesifik primerlerin optimizasyonu için ön Real Time PCR denemeleri kurulmuştur. Kurulan reaksiyon denemelerinde uygun primer ile referans çeşitlere ait cDNA konsantrasyonları taranmış ve optimum bağlanma gösteren (bağlanma sıcaklığı, cDNA ve Primer miktarı vb.) reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 5 primerde (PdAct-Housekeeping, PpFT, PabSOC1, PdCBF1, PdCBF2), SYBR Green kullanılarak ön optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Primerlere göre optimize edilen içerik miktarları ve Real Time PCR programında kullanılan bağlanma sıcaklığı dereceleri (TM) Çizelge 3.11-3.15'te verilmiştir.

Real Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, her bir primer (gen bölgesine) yönelik standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla uygulamalara ait hem soğuk hem de geç çiçeklenme uygulamalarından ayrı seçilen bir kontrol cDNA'sından 6 logaritmik konsantrasyon olmak üzere; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında Real Time PCR cihazına ait analiz programı ile her bir primer için optimize edilen koşullar kullanılarak ayrı ayrı standart eğriler çizilmiştir. Uygun standart eğri grafiği çizilebilmesi için, en az 1 logaritmik konsantrasyonun standart eğri üzerinden geçmesi ve standart eğrinin etkinlik değerinin 1.7 ile 2 arasında, Slope (eğim) değerinin ise -3.3'e yakın olması istenmektedir. Etkinlik değeri 2'ye yaklaştıkça standart eğri grafiğinin güvenilirliği de artmaktadır.

Çizelge 3.11 PdAct (Housekeeping) primer optimizasyon koşulları (TM: optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

İçerik	Hacim (V/V, µl)
cDNA	1
İleri Primeri (10 pmol)	0.75
Geri Primeri (10 pmol)	0.75
SyberGreen	2.5
TM	58 °C
Toplam Hacim	5

Çizelge 3.12 PpFT primer optimizasyon koşulları (TM: optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

İçerik	Hacim (V/V, µl)
Cdna	1.5
İleri Primeri (10 pmol)	1
Geri Primeri (10 pmol)	1
SyberGreen	2.5
TM	56 °C
Toplam Hacim	6

Çizelge 3.13 PabSOC1 primer optimizasyon koşulları (TM: optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

İçerik	Hacim (V/V, µl)
cDNA	1
İleri Primeri (10 pmol)	0.75
Geri Primeri (10 pmol)	0.75
SyberGreen	2.5
TM	57 °C
Toplam Hacim	5

Çizelge 3.14 PdCBF1 primer optimizasyon koşulları (TM: optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

İçerik	Hacim (V/V, µl)
cDNA	1.25
İleri Primeri (10 pmol)	1
Geri Primeri (10 pmol)	1
SyberGreen	2.5
TM	52 °C
Toplam Hacim	5.75

Çizelge 3.15 PdCBF2 primer optimizasyon koşulları (TM: optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

İçerik	Hacim (V/V, µl)
cDNA	1
İleri Primeri (10 pmol)	1
Geri Primeri (10 pmol)	1
SyberGreen	2.5
TM	50 °C
Toplam Hacim	5.5

Referans çeşitlerde soğuk uygulamasının her iki primer açısından en geniş Ct değerleri baz alınarak 6. saat seçilmiştir. Erken ve geç çiçeklenen çeşitler açısından en geniş Ct aralığının seçilmesi, gen ifadesinin anlamlandırılmasında daha etkili olacağından ve literatürlerde badem genotiplerine uygulanan soğuk uygulamasının 8. saat sonrasında gen ifadesinin arttığı ifade edildiğinden (Barros vd. 2012, Guo vd. 2014) tüm genotiplerin 6.saat soğuk uygulaması seçilmiştir.

3.2.4.5.3.8 Örneklerin qRT-PCR cihazında yürütülmesi

Her bir primere ait örnekleri içeren cDNA'lar ile SYBR Green Master Kit içerikleri karışımı qRT-PCR cihazına ait 384'lük platalere yerleştirilerek plate 1500 rpm'de 2 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında sealing foil ile plate kaplanarak Roche Light Cycler 480 cihazında (Şekil 3.20) her bir primer için optimize edilen sıcaklık ve ilgili optimize Real Time PCR programı seçilerek örnekler yürütülmüştür. Cihazda kullanılan temel Real Time PCR programı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.16). Her bir primere ait örnekler 3 teknik tekrarlı olarak yürütülmüş olup, gerekli görülen reaksiyonlar yeterli sayıda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.20 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarı- Roche Light Cycler 480 cihazı

Çizelge 3.16 Real Time PCR programı (TM: optimize edilen primer bağlanma sıcaklığına göre değişim göstermektedir)

Program	Cycles		Analysis Mode	
Pre incubation	Acquisition Mode	Cycle	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate
	None	1	00:02:00	4.8
Amplification	Acquisition Mode	Cycle	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate
95° C	None	40	00:00:15	4.8
TM° C	None		00:01:00	2.5
72° C	Single		00:01:00	4.8
Melting	Acquisition Mode	Cycle	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate
95° C	None	1	00:00:30	4.8
TM° C	None		00:00:30	2.5
99° C	Continuous		-	0.11
Cooling	Acquisition Mode	Cycle	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate
40 °C	None		00:00:10	2.5

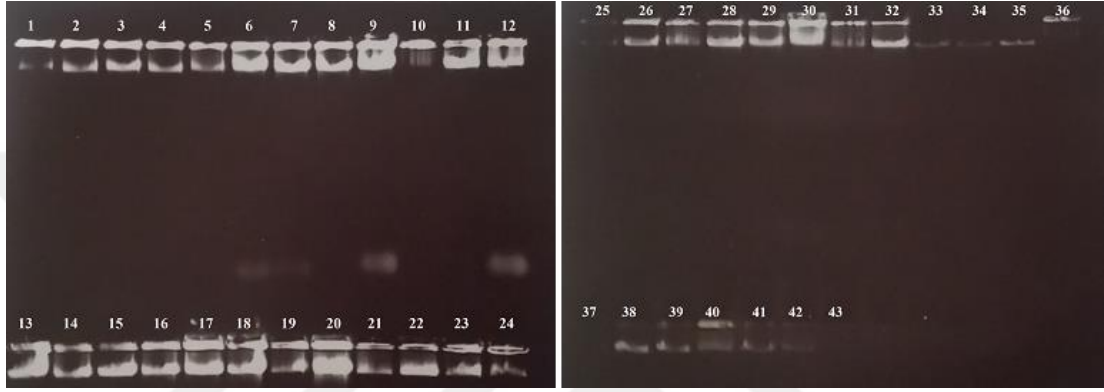
3.2.4.5.3.9 Elde edilen Real Time verilerine ait istatistik analizleri

Nispi ifade seviyeleri; $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (delta delta-Ct veya ddct) algoritmasına göre REST 2009 software yazılımı kullanılarak, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde hesaplanmıştır. Güven Aralıkları (C.I.) % 95 olarak kabul edilmiştir. *PdAct*, *PpFT*, *PabSOC1*, *PdCBF1*, *PdCBF2* genlerinin ifade seviye sonuçları $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemini kullanarak, *Actin* (*PdAct*) kontrol geninin ifade değeri ile normalize edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 DNA izolasyonu

Araştırmada kullanılan genotiplere ait DNA'ların, agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1'de, spektrofotometrik değerleri ise Çizelge 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların, agaroz jel (% 1) görüntüleri

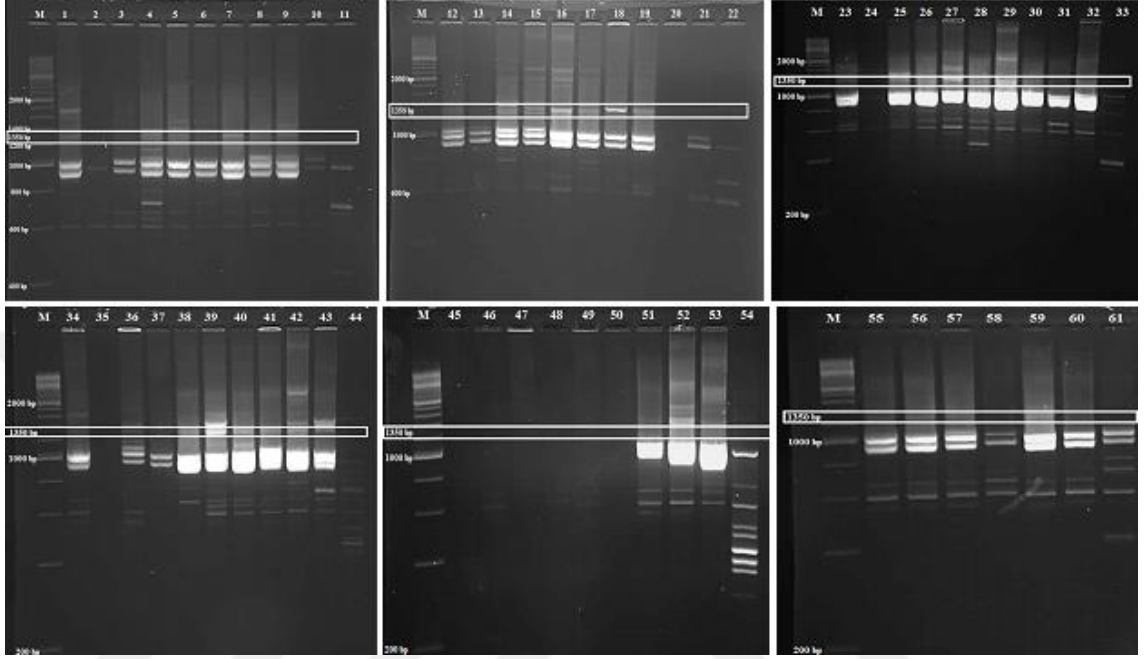
1. Yavuzeli 102, 2. Araban 17, 3. Primorski, 4. Ferraduel, 5. Moncayo, 6. Araban 129, 7. Araban 164, 8. Nonpareil, 9. Yaltinski, 10. Yavuzeli 19, 11. Araban 96, 12. Halitbey, 13. Yavuzeli 24, 14. Gülcan1, 15. Araban 94, 16. Yavuzeli 29, 17. Yavuzeli 51, 18. Yavuzeli 103, 19. Araban 146, 20. Araban 125, 21. Yavuzeli 26, 22. Nurlu, 23. Garrigues, 24. Gülcan 2, 25. Supernova, 26. Guara, 27. Yavuzeli 28, 28. Araban 136, 29. Araban 10, 30. Araban 95, 31. Araban 126, 32. Akbadem, 33. Bozkurt, 34. *A.webbii*, 35. Ferragnes, 36. 17-4, 37. Bertina, 38. Hacılibey, 39. *A.orientalis*, 40. *A.arabica*, 41. Teksas, 42. Ne Plus Ultra, 43. 48-1

Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan tür, çeşit ve genotiplere ait DNA'ların spektrofotometrik değerleri

DNA No	Tür/Çeşit/ Genotip	Miktar ng/µl	A260	A280	Safılık 260/280
1	Yavuzeli 102	1255,27	25,105	11,414	2,20
2	Araban 17	1875,76	37,515	17,342	2,16
3	Primorski	3601,86	72,037	33,110	2,18
4	Ferraduel	2358,92	47,178	21,628	2,18
5	Moncayo	1133,58	22,672	10,508	2,16
6	Araban 129	2786,88	55,738	25,729	2,17
7	Araban 164	4989,41	99,788	49,905	2,00
8	Nonpareil	4219,70	84,394	39,774	2,12
9	Yaltinski	4735,83	94,717	48,116	1,97
10	Yavuzeli 19	1478,11	29,562	13,528	2,19
11	Araban 96	3477,60	69,552	32,353	2,15
12	Halitbey	5750,70	115,014	83,416	1,38
13	Yavuzeli 24	3438,76	68,775	32,668	2,11
14	Gülcan 1	2185,27	43,705	19,812	2,21
15	Araban 94	3775,82	75,516	35,000	2,16
16	Yavuzeli 29	2091,02	41,820	19,023	2,20
17	Yavuzeli 51	2541,73	50,835	23,615	2,15
18	Yavuzeli 103	3321,47	66,429	30,608	2,17
19	Araban 146	1653,20	33,064	15,118	2,19
20	Araban 125	3871,86	77,437	36,425	2,13
21	Yavuzeli 26	1328,62	26,572	12,109	2,19
22	Nurlu	2451,31	49,026	22,207	2,21
23	Garrigues	1613,79	32,276	14,647	2,20
24	Gülcan 2	1775,94	35,519	16,160	2,20
25	Supernova	1329,08	26,582	12,050	2,21
26	Guara	2295,10	45,902	20,982	2,19
27	Yavuzeli 28	1540,03	30,801	13,994	2,20
28	Araban 136	2401,55	48,031	21,659	2,22
29	Araban 10	1610,16	32,203	14,733	2,19
30	Araban 95	2115,31	42,306	19,982	2,12
31	Araban 126	1334,90	26,698	12,191	2,19
32	Akbadem	3031,24	60,625	27,759	2,18
33	Bozkurt	555,12	11,102	7,301	1,52
34	<i>Amygdalus webbii</i>	601,96	12,039	7,344	1,64
35	Ferragnes	2165,60	43,313	20,050	2,16
36	17-4	844,96	16,899	9,206	1,84
37	Bertina	1138,32	22,766	11,852	1,92
38	Hacialibey	756,57	15,131	8,058	1,88
39	<i>Amygdalus orientalis</i>	805,94	16,119	8,439	1,91
40	<i>Amygdalus arabica</i>	971,68	19,434	10,374	1,87
41	Teksas	528,51	10,570	6,773	1,56
42	Ne Plus Ultra	523,18	10,464	6,877	1,52
43	48-1	2303,30	46,066	21,84	2,11

4.2 RAPD markırına ait PCR reaksiyonu

RAPD lokusuna ait PCR sonrası örnek jel görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 OPK10 RAPD markırına ait RAPD-PCR reaksiyonlarına ait bant profilleri
(M: Markır)

M: DNA markır (200 bç), **1.** Yaltinski, **2.** Bozkurt, **3.** Hacılibey, **4.** Supernova, **5.** Araban 94, **6.** Araban 164, **7.** Primorski, **8.** Yavuzeli 51, **9.** Yavuzeli 103, **10.** Ferragnes, **11.** NK, **12.** Yavuzeli 24, **13.** *A.orientalis*, **14.** Araban 146, **15.** Yavuzeli 28, **16.** Yavuzeli 19, **17.** Gülcan 2, **18.** Araban 136, **19.** Araban 126, **20.** Teksas, **21.** Bertina, **22.** NK, **23.** 48-1, **24.** Nurlu, **25.** Garrigues, **26.** Yavuzeli 29, **27.** Araban 96, **28.** Akbadem, **29.** Yavuzeli 26, **30.** *A.webbii*, **31.** *A.arabica*, **32.** Yavuzeli 102, **33.** NK, **34.** Araban 17, **35.** Ne Plus Ultra, **36.** Halitbey, **37.** Araban 125, **38.** Araban 10, **39.** Moncayo, **40.** Ferraduel, **41.** Araban 129, **42.** Nonpareil, **43.** Guara, **44.** NK, **45.** Bozkurt, **46.** Ferragnes, **47.** Teksas, **48.** Bertina, **49.** Nurlu, **50.** Ne Plus Ultra, **51.** 17-4, **52.** Araban 95, **53.** Gülcan 1, **54.** NK, **55.** Bozkurt, **56.** Ferragnes, **57.** Teksas, **58.** Bertina, **59.** Nurlu, **60.** Ne Plus Ultra, **61.** NK

OPK10 RAPD markırı geç çiçeklenme özelliği açısından genotipler arasında ayırım sağlamıştır. Buna göre; *Amygdalus webbii*, 17-4, Akbadem, Araban 10, Araban 94, Araban 96, Araban 126, Araban 129, Araban 136, Araban 146, Garrigues, Gülcan 2, Guara, Ferragnes, Ferraduel, Moncayo, Nonpareil, Nurlu, Primorski, Teksas, Yaltinski,

Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102 ve Yavuzeli 103 genotiplerinde OPK10 primeri (1350 bç) beklenen bölgede bant vermiştir (Şekil 4.2). OPK10 primerinin geç çiçeklenme geni *Lb*'ye uzaklığı çok yakın olarak belirlendiğinden (Ballester vd. 2001), bu primerin geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Beklenen bölgede bant veren genotiplerin geç çiçeklenmeyle ilişkili olduğu beklenmektedir (Çizelge 4.2). İncelenen 43 genotip arasından geç çiçeklenmesini beklediğimiz 14 adet çeşidin sadece 9 tanesi (% 64.29) bant vermiştir.

Çizelge 4.2 RAPD markırı değerlendirilmesi

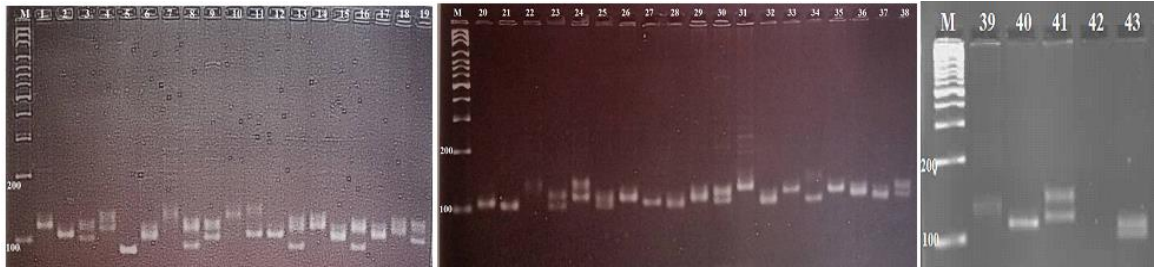
No	Tür / Çeşit / Genotip	OPK10 markırı (1350 bç) (- Bant yok, + Bant var)
1	Yaltinski	+
2	Bozkurt	-
3	Hacialibey	-
4	Supernova	-
5	Araban 94	+
6	Araban 164	-
7	Primorski	+
8	Yavuzeli 51	+
9	Yavuzeli 103	+
10	Ferragnes	+
12	Yavuzeli 24	+
13	<i>Amygdalus orientalis</i>	-
14	Araban 146	+
15	Yavuzeli 28	+
16	Yavuzeli 19	+
17	Gülcan 2	+
18	Araban 136	+
19	Araban 126	+
20	Teksas	+
21	Bertina	-
23	48-1	-
24	Nurlu	+
25	Garrigues	+
26	Yavuzeli 29	+
27	Araban 96	+
28	Akbadem	+
29	Yavuzeli 26	+
30	<i>Amygdalus webbii</i>	+
31	<i>Amygdalus arabica</i>	-
32	Yavuzeli 102	+

Çizelge 4.2 RAPD markırı değerlendirmesi (devam)

No	Tür / Çeşit / Genotip	OPK10 markırı (1350 bç) (- Bant yok, + Bant var)
34	Araban 17	-
35	Ne Plus Ultra	-
36	Halitbey	-
37	Araban 125	-
38	Araban 10	+
39	Moncayo	+
40	Ferraduel	+
41	Araban 129	+
42	Nonpareil	+
43	Guara	+
51	17-4	+
52	Araban 95	-
53	Gülcan 1	-

4.3 SSR lokuslarının PCR reaksiyonu ve allel görüntülerinin alınması

UDP96003 markırına ait PCR sonrası örnek jel görüntüleri Şekil 4.3'te verilmektedir. Badem çeşitlerinin SSR markırlarındaki (EPPCU2584, BPPCT035, CPPCT008) allel büyüklükleri ise Çizelge 4.3'te verilmektedir.

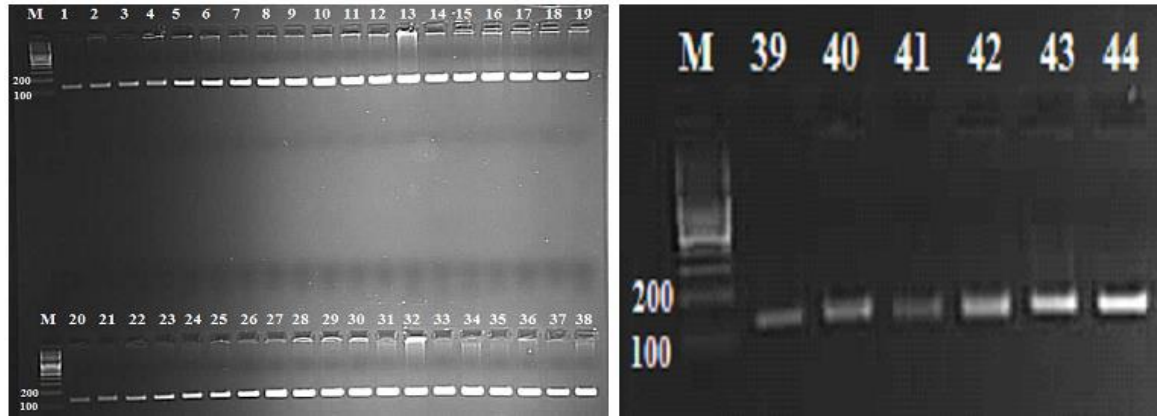


Şekil 4.3 UDP96003 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri

M: DNA markır (100 bç), **1.** *A.arabica*, **2.** Yavuzeli 103, **3.** Supernova, **4.** Bozkurt, **5.** Araban 10, **6.** Garrigues, **7.** Araban 95, **8.** Gülcan 2, **9.** Ferraduel, **10.** Araban 96, **11.** Yavuzeli 19, **12.** Araban 126, **13.** Yavuzeli 26, **14.** Halitbey, **15.** Moncayo, **16.** Yavuzeli 28, **17.** Nurlu, **18.** Teksas, **19.** Yavuzeli 28, **20.** Yavuzeli 51, **21.** Araban 52, **22.** Araban 94, **23.** Ferragnes, **24.** Yavuzeli 29, **25.** Guara, **26.** *A. webbii*, **27.** Yavuzeli 24, **28.** Bertina, **29.** Hacıalibey, **30.** Primorski, **31.** Gülcan 1, **32.** Araban 146, **33.** 17-4, **34.** Araban 129, **35.** Akbadem, **36.** Yaltinski, **37.** Ne Plus Ultra, **38.** Nonpareil, **39.** Araban 94, **40.** 48-1, **41.** *A.orientalis*, **42.** NK, **43.** Guara

UDP96003 markırına göre heterozigot allel profil gösteren genotipler Supernova, Bozkurt, Garrigues, Gülcan 2, Ferraduel, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Ferragnes, Yavuzeli 29, Guara, Primorski, Nonpareil ve *A.orientalis* olurken; homozigot profil gösteren genotipler *A.arabica*, Yavuzeli 103, Araban 10, Araban 95, Araban 96, Araban 126, Halitbey, Moncayo, Nurlu, Teksas, Yavuzeli 51, Araban 52, Araban 94, *A.webbii*, Yavuzeli 24, Bertina, Hacıalibey, Gülcan 1, Araban 146, 17-4, Araban 129, Akbadem, Yaltinski, Ne Plus Ultra, Araban 94 ve 48-1'dir (Şekil 4.3). Geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşitten 8 adedi heterozigot profile sahip bulunurken (% 57.14), 6 adedi homozigot profil (% 42.86) sergilemiştir (Şekil 4.3).

EPPCU2584 markırına ait PCR sonrası örnek jel görüntüleri Şekil 4.4'te verilmektedir.



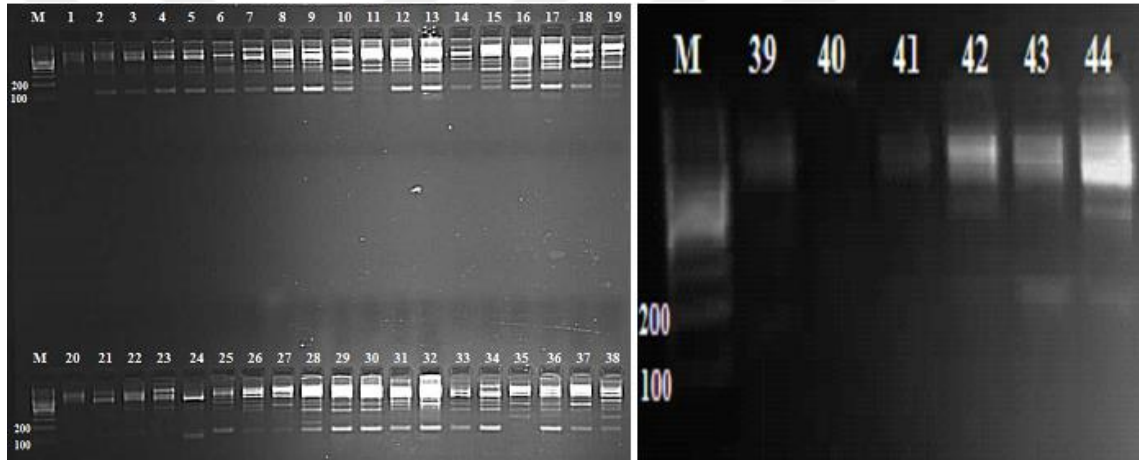
Şekil 4.4 EPPCU2584 SSR markırınının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri

M: DNA markır (100 bç), **1.** Araban 10, **2.** Araban 17, **3.** Araban 94, **4.** Araban 95, **5.** Araban 96, **6.** Araban 125, **7.** Araban 126, **8.** Araban 129, **9.** Araban 136, **10.** Araban 146, **11.** Araban 164, **12.** Yavuzeli 19, **13.** Yavuzeli 24, **14.** Yavuzeli 26, **15.** Yavuzeli 28, **16.** Yavuzeli 29, **17.** Yavuzeli 51, **18.** Yavuzeli 102, **19.** Yavuzeli 103, **20.** Halitbey, **21.** Hacıalibey, **22.** Nonpareil, **23.** Akbadem, **24.** *A.orientalis*, **25.** 17-4, **26.** Primorski, **27.** Supernova, **28.** Gülcan 2, **29.** Moncayo, **30.** Garrigues, **31.** Halitbey, **32.** Yaltinski, **33.** Ne Plus Ultra, **34.** *A.webbii*, **35.** Bozkurt, **36.** Guara, **37.** Ferraduel, **38.** Teksas, **39.** Gülcan 1, **40.** *A.arabica*, **41.** Bertina, **42.** Ferragnes, **43.** 48-1, **44.** Nurlu

EPPCU2584 markırına göre heterozigot profil gösteren genotipler Araban 94, Araban 96, Araban 125, Araban 129, Araban 136, Araban 146, Araban 164, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, Halitbey,

Hacılibey, Nonpareil, *A.orientalis*, Supernova, Yaltinski, Bozkurt, Gülcan 1, *A.arabica*, Bertina, Ferragnes ve 48-1 olmuştur (Çizelge 4.3). EPPCU2584 markırına ait allel heterozigotluğunun geç çiçeklenme özelliği açısından genotipler arasında ayırım yaptığı Rasouli vd. (2014) tarafından ifade edilmektedir. Geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşitten (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979, Yılmaz 2017) 8 adedi heterozigot profil gösterirken (% 57.14) 6 adedi homozigot profil (% 42.85) göstermiştir. Çalışmamızda, EPPCU2584 markırına göre heterozigotluğun geç çiçeklenme açısından genotipler arasında iyi bir ayırım yaptığı (% 58.14) belirlenmiştir.

BPPCT035 markırına ait PCR sonrası örnek jel görüntüleri Şekil 4.5'te verilmektedir.

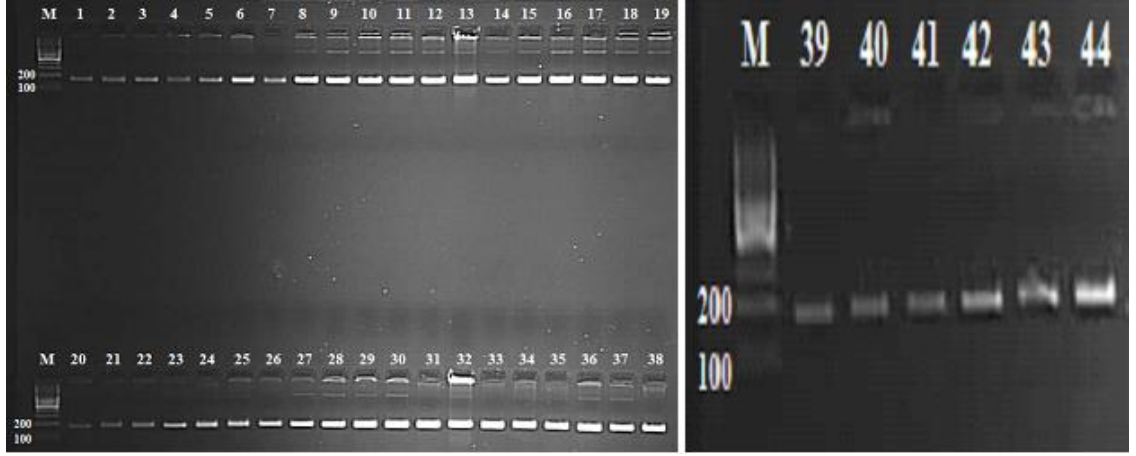


Şekil 4.5 BPPCT035 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri

M: DNA markır (100 bç), **1.** Araban 10, **2.**Araban 17, **3.** Araban 94, **4.** Araban 95, **5.** Araban 96, **6.** Araban 125, **7.** Araban 126, **8.** Araban 129, **9.** Araban 136, **10.** Araban 146, **11.** Araban 164, **12.** Yavuzeli 19, **13.** Yavuzeli 24, **14.** Yavuzeli 26, **15.** Yavuzeli 28, **16.** Yavuzeli 29, **17.** Yavuzeli 51, **18.** Yavuzeli 102, **19.** Yavuzeli 103, **20.** Halitbey, **21.** Hacılibey, **22.** Nonpareil, **23.** Akbadem, **24.** *A.orientalis*, **25.** 17-4, **26.** Primorski, **27.** Supernova, **28.** Gülcan 2, **29.** Moncayo, **30.** Garrigues, **31.** Halitbey, **32.** Yaltinski, **33.** Ne Plus Ultra, **34.** *A.webbii*, **35.** Bozkurt, **36.** Guara, **37.** Ferraduel, **38.** Teksas, **39.** Gülcan 1, **40.** *A.arabica*, **41.** Bertina, **42.** Ferragnes, **43.** 48-1, **44.** Nurlu

BPPCT035 markırına göre heterozigot profil gösteren genotipler Yavuzeli 26 ve Yavuzeli 103 olmuştur (Çizelge 4.3). Çeşitlerin çoğunda (% 95.34) bu SSR primeri homozigot profil göstermiştir. Bu markırın tüm çeşitler arasında iyi bir ayırım yapmadığı görülmüştür.

CPPCT008 markırına ait PCR sonrası örnek jel görüntüleri Şekil 4.6'da verilmektedir



Şekil 4.6 CPPCT008 SSR markırının agaroz jelde (% 2) allel görüntüleri

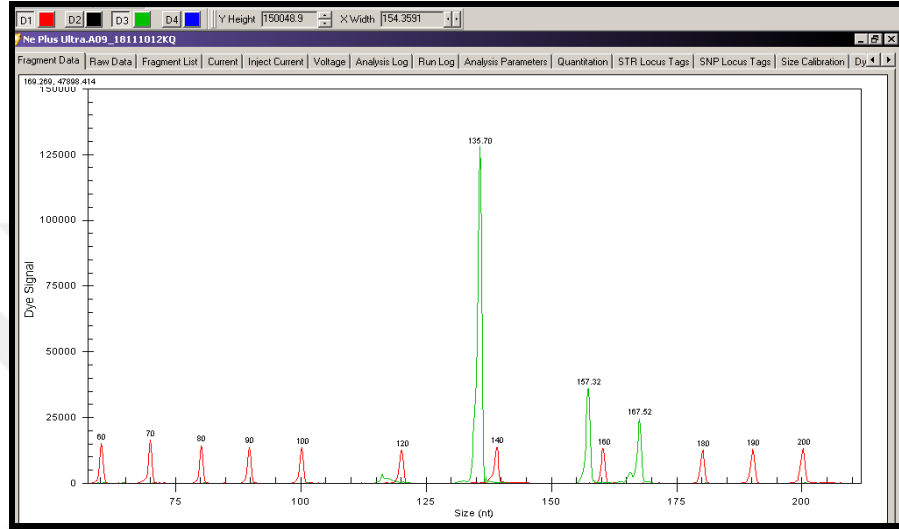
M: DNA markır (100 bç), **1.** Araban 10, **2.** Araban 17, **3.** Araban 94, **4.** Araban 95, **5.** Araban 96, **6.** Araban 125, **7.** Araban 126, **8.** Araban 129, **9.** Araban 136, **10.** Araban 146, **11.** Araban 164, **12.** Yavuzeli 19, **13.** Yavuzeli 24, **14.** Yavuzeli 26, **15.** Yavuzeli 28, **16.** Yavuzeli 29, **17.** Yavuzeli 51, **18.** Yavuzeli 102, **19.** Yavuzeli 103, **20.** Halitbey, **21.** Hacıalibey, **22.** Nonpareil, **23.** Akbadem, **24.** *A.orientalis*, **25.** 17-4, **26.** Primorski, **27.** Supernova, **28.** Gülcan 2, **29.** Moncayo, **30.** Garrigues, **31.** Halitbey, **32.** Yaltinski, **33.** Ne Plus Ultra, **34.** *A.webbii*, **35.** Bozkurt, **36.** Guara, **37.** Ferraduel, **38.** Teksas, **39.** Gülcan1, **40.** *A.arabica*, **41.** Bertina, **42.** Ferragnes, **43.** 48-1, **44.** Nurlu

CPPCT008 markırına göre heterozigot allel profil gösteren genotipler Araban 17, Araban 126, Araban 129, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, Hacıalibey, Nonpareil, *A.orientalis*, 17-4, Primorski, Yaltinski, Supernova, Moncayo, Garrigues, Ne Plus Ultra, *A.webbii*, Bozkurt, Guara, Ferraduel, Gülcan 1, Bertina, Ferragnes, 48-1 ve Nurlu olmuştur (Çizelge 4.3). CPPCT008 markırında heterozigotluğun geç çiçeklenme açısından genotipler arasında ayırım yaptığı Rasouli vd. (2014) tarafından ifade edilmektedir. Geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşitten 11 tanesi heterozigot profil gösterirken 3 tanesi homozigot profil göstermiştir. CPPCT008 markırına ait heterozigotluğun geç çiçeklenme açısından genotipler arasında iyi bir ayırım yaptığı (% 69.77) belirlenmiştir.

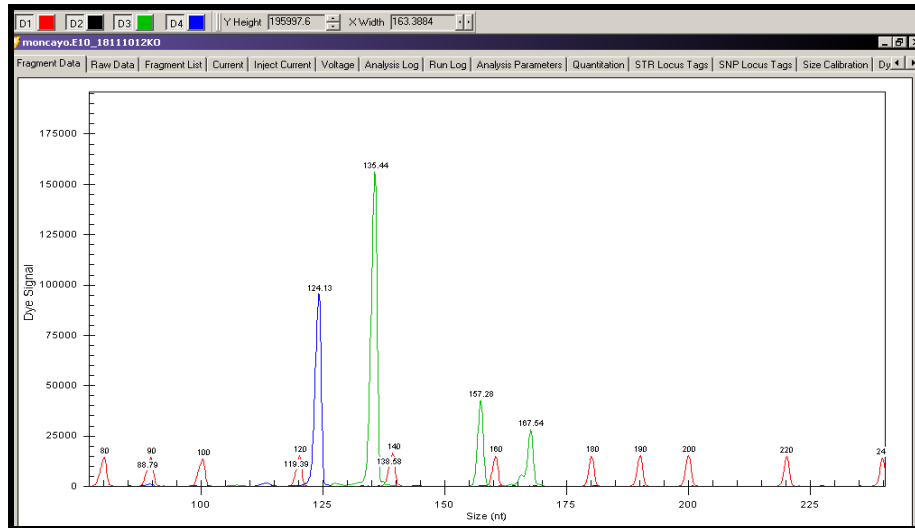
Çizelge 4.3 Badem çeşitlerinin 3 SSR markırındaki allel büyüklükleri (bç)

No	Tür / Çeşit / Genotip	EPCU2584		CPPCT008		BPPCT035	
1	Araban 10	135	135	165	165	123	123
2	Araban 17	133	133	157	165	123	123
3	Araban 94	133	135	167	167	123	123
4	Araban 95	135	135	167	167	125	125
5	Araban 96	133	135	167	167	123	123
6	Araban 125	133	135	157	157	125	125
7	Araban 126	135	135	157	165	123	123
8	Araban 129	133	135	165	169	123	123
9	Araban 136	133	135	165	165	123	123
10	Araban 146	123	133	165	165	125	125
11	Araban 164	133	135	167	167	123	123
12	Yavuzeli 19	133	135	165	169	123	123
13	Yavuzeli 24	133	135	165	175	123	123
14	Yavuzeli 26	135	135	165	169	125	135
15	Yavuzeli 28	133	135	165	169	123	123
16	Yavuzeli 29	133	135	165	169	123	123
17	Yavuzeli 51	135	135	165	169	125	125
18	Yavuzeli 102	133	135	165	169	123	123
19	Yavuzeli 103	127	135	165	169	123	135
20	Halitbey	133	135	169	169	123	123
21	Hacialibey	127	135	167	169	123	123
22	Nonpareil	125	133	165	169	125	125
23	Akbadem	135	135	165	165	123	123
24	<i>Amygdalus orientalis</i>	127	135	157	165	123	123
25	17-4	135	135	165	171	125	125
26	Primorski	135	135	165	169	125	125
27	Supernova	127	135	165	169	125	125
28	Gülcan 2	133	133	165	165	125	125
29	Moncayo	133	133	157	167	125	125
30	Garrigues	135	135	157	167	123	123
31	Halitbey	133	135	169	169	123	123
32	Yaltinski	133	135	165	169	123	123
33	Ne Plus Ultra	135	135	157	167	125	125
34	<i>Amygdalus webbii</i>	133	133	165	177	125	125
35	Bozkurt	133	135	165	169	123	123
36	Guara	135	135	157	167	123	123
37	Ferraduel	135	135	165	169	125	125
38	Teksas	135	135	169	169	125	125
39	Gülcan 1	125	133	165	167	125	125
40	<i>Amygdalus arabica</i>	127	135	169	169	123	123
41	Bertina	127	133	165	169	125	125
42	Ferragnes	127	135	165	167	125	125
43	48-1	133	135	165	169	125	125
44	Nurlu	135	135	163	169	125	125

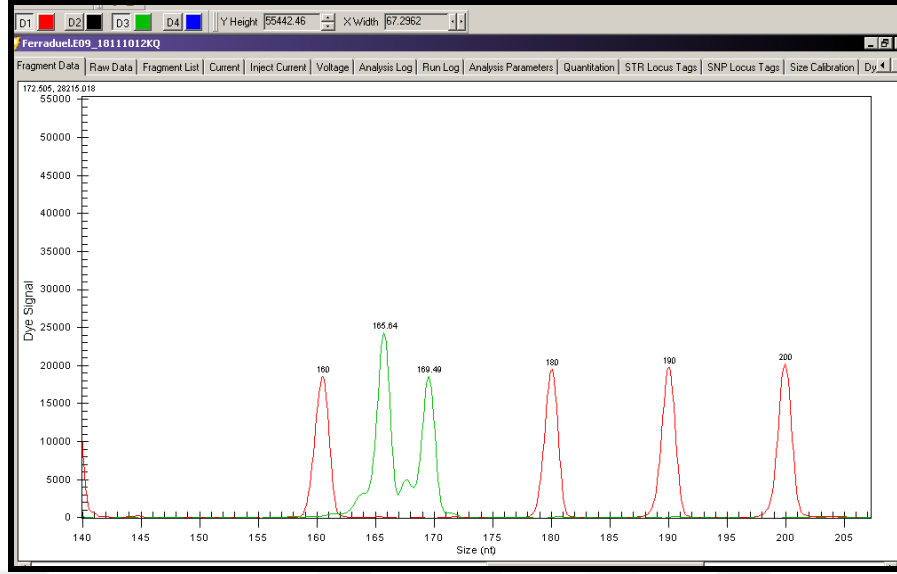
UDP96003 lokusunun allel büyüklüğü agaroz jel koşullarında belirlendiği için allel olup olmamasına bakılmış, allel ayırımına gerek duyulmamıştır. Her lokustaki allel büyüklükleri pik verisi olarak cihazın fragment analiz programı ile belirlenmiştir. Locus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verilmektedir.



Şekil 4.7 EPCU2584 SSR-(yeşil) lokusuna ait örnek homozigot allel pik profili



Şekil 4.8 EPCU2584 SSR-(yeşil) lokusuna ait homozigot ve heterozigot allel pik profilleri ile BPPCT035 SSR-(mavi) lokusuna ait örnek homozigot allel pik profili



Şekil 4.9 CPPCT008 SSR- (yeşil) lokusuna ait örnek heterozigot allel pik profili

PCR aşamalarında (Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6) elde edilen net bant görüntüleri ile markıra (lokusa) ait allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9) rahat görüntülenebilen pikleri metot aşamalarında belirtilen optimizasyonların iyi olduğunun göstergesi olup, tüm lokuslardaki allel tiplerinin (homozigot ve heterozigot) ve büyüklüklerinin başarılı bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamıştır.

4.3.1 SSR lokusların genetik analizleri

Tezde kullanılan 3 SSR markırına (lokusuna) ait allel büyüklükleri baz çifti (bç) olarak Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Ayrıca Ferragnes, Nurlu, Bertina ve 48-1 çeşitleri de referans çeşit olarak örneklerle beraber analiz edilmiştir.

Genotiplerin geç çiçeklenme özelliğini taşıyıp taşımadıkları BPPCT035, CPPCT008, EPCU2584 ve UDP96003 SSR markırlarıyla belirlenmiştir. BPPCT035 markırının allel büyüklükleri genotipler arasında 123 ile 125 bç; CPPCT008 markırının allel büyüklükleri 157 ile 177 bç ve EPCU2584 markırının allel büyüklükleri 125 ile 135 bç arasında değişmiştir (Çizelge 4.3). EPPCU2584 markırında 5 allel, CPPCT008 markırında 7 allel ve BPPCT035 markırında 2 allel bulunmuştur.

EPPCU2584 markırında (lokusunda) heterozigot profil gösteren genotipler Araban 94, Araban 96, Araban 125, Araban 129, Araban 136, Araban 146, Araban 164, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, Halitbey, Hacıalibey, Nonpareil, *A.orientalis*, Primorski, Supernova, Yaltinski, Bozkurt, Gülcan 1, *A.arabica*, Bertina, Ferragnes ve 48-1 olmuştur (Çizelge 4.3). EPPCU2584 markırında gözlemlenen heterozigotluğun, geç çiçeklenme açısından genotipler arasında iyi bir ayırım yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuç Rasouli vd. (2014)'ün çalışmasıyla uyumlu bulunmuştur.

BPPCT035 markırında (lokusunda) heterozigot profil gösteren genotipler Yavuzeli 26 ve Yavuzeli 103 olmuştur (Çizelge 4.3). Bu markırda allel sayısının az gözlemlenmesi nedeni ile bu markırın genotipler arasında iyi bir ayırım yapmadığı belirlenmiştir. Genotiplerin genelinde bu primer homozigot allel profil göstermiştir. CPPCT008 markırına göre heterozigot allel profil gösteren genotipler; Araban 17, Araban 126, Araban 129, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, Hacıalibey, Nonpareil, *A.orientalis*, 17-4, Primorski, Yaltinski, Supernova, Moncayo, Garrigues, Ne Plus Ultra, *A.webbii*, Bozkurt, Guara, Ferraduel, Gülcan 1, Bertina, Ferragnes, 48-1 ve Nurlu olmuştur (Çizelge 4.3). CPPCT008 markırına göre geç çiçeklenme açısından genotipler arasında heterozigot alleller göstererek iyi bir ayırım yaptığı belirlenmiştir. Heterozigot allelleri çok sayıda göstermesi nedeni ile CPPCT008 en polimorfik markır olarak tespit edilmiştir. Rasouli vd. (2014)'nin çalışmasında da EPPCU2584 ve CPPCT008 markırlarının genotipleri ayırmada en etkili markırlar oldukları belirtilmiştir.

EPCU2584 ve CPPCT008 markırları birlikte değerlendirildiğinde, heterozigotluk gösteren genotiplerin bir diğer deyişle, geç çiçeklenme özelliğine sahip genotiplerin Araban 129, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, Hacıalibey, Nonpareil, *A.orientalis*, Primorski, Supernova, Yaltinski, Gülcan 1, Bertina, Ferragnes, 48-1 olabileceği belirlenmiştir.

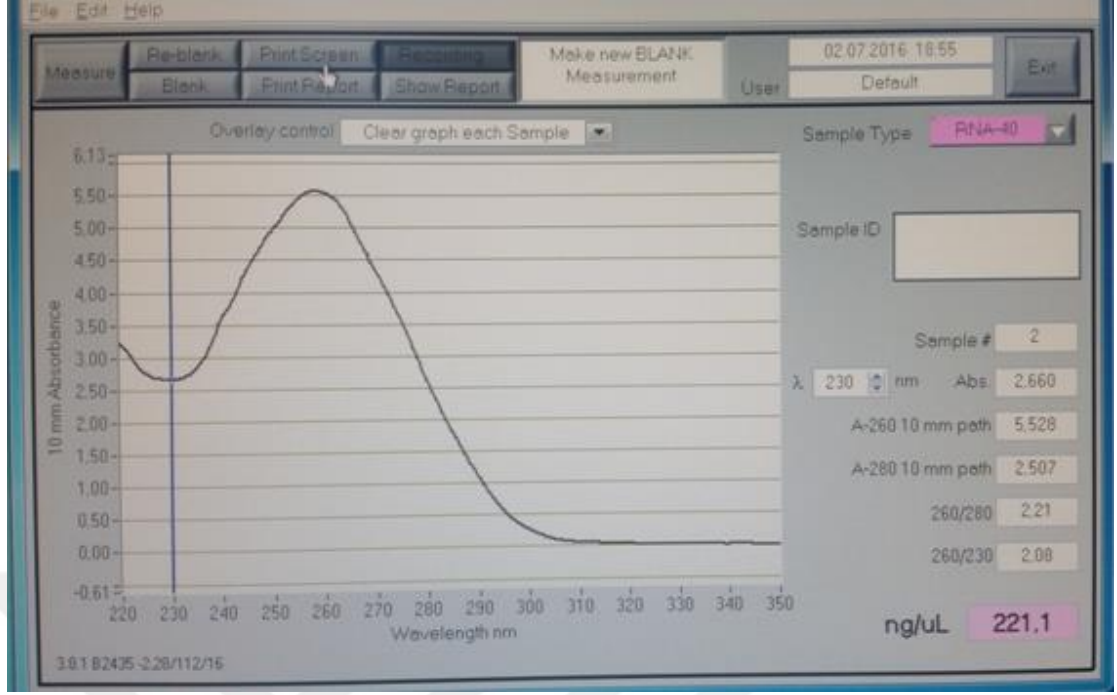
UDP96003 markır (lokusu) değerlendirildiğinde ise, referans çeşitlerden erken çiçeklendiği bilinen Nurlu ve 48-1 çeşitlerinde (Küden vd. 2014) homozigotluk

görülürken, geç çiçeklendiğini bildiğimiz Ferragnes çeşidinde heterozigotluk görülmüştür. Geç çiçeklenme gösteren genotiplerde SSR allel profillerinin heterozigot olduğu ve bu durumun geç çiçeklenmeyle ilişkili olabileceği Rasouli vd. (2014) tarafından bildirilmiştir. Heterozigot profil gösteren genotiplerin geç çiçeklenmeyle ilişkili olabileceği, çalışmamızdaki sonuçlarla da uyumluluk göstermiştir. UDP96003 markırına göre, geç çiçeklenme özelliği taşıyan genotiplerin Supernova, Bozkurt, Garrigues, Gülcan 2, Ferraduel, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Ferragnes, Yavuzeli 29, Guara, Primorski, Nonpareil, *A. orientalis* olabileceği belirlenmiştir.

Tüm markırlar birlikte değerlendirildiğinde, Supernova, Primorski, Nonpareil ve Yavuzeli 28 genotiplerinin heterozigot profil gösterdikleri belirlenmiştir. Tüm markırlar açısından bu genotiplerin geç çiçeklenmeyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Beklenen şekilde sonuç göstermeyen çeşitlerin; kullanılan markırın ilgili genle bağlantısının zayıflığından veya genetik haritalamanın yapıldığı markırların geliştirildiği badem populasyonları ile tezde kullanılan çeşitler arasında yakın bağlantıların görülmemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.4 RNA izolasyonu

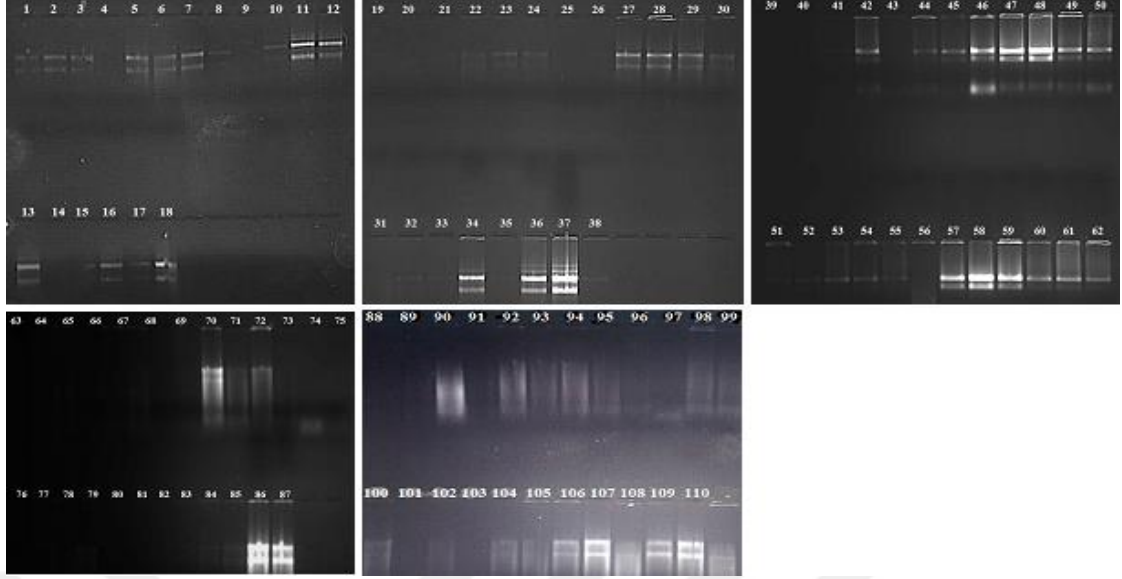
Tezde hem geç çiçek uygulaması hem de soğuk uygulamasına ait kontrol ve stres örneklerinin her birinde 3 tekerrür olacak şekilde RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lara ait örnek spektrofotometrik ölçüm görüntüsü Şekil 4.10'da verilmektedir.



Şekil 4.10 İzole edilen RNA'ya ait örnek spektrofotometrik ölçüm örnek (Nanodrop-ND-1000) görüntüsü

4.4.1 Geç çiçeklenme değerlendirilmesinin kontrol örneklerinde RNA izolasyonu

Geç çiçeklenme uygulaması kontrol örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri Şekil 4.11'de, kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri ise Çizelge 4.4'te verilmektedir.



Şekil 4.11 Geç çiçeklenme uygulaması bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri (tek:tekerrür)

1. Moncayo 1.tek., 2. Garrigues 1.tek., 3. Ferraduel 1. tek., 4. Nonpareil 1. tek., 5. Hacıalibey 1.tek., 6. Ne Plus Ultra 1.tek., 7. Teksas 2. tek., 8. Akbadem 3.tek., 9. Gülcan1 3. tek., 10. Yaltinski 1. tek., 11. Supernova 2. tek., 12. 17-4 1. tek., 13. Primorski 2. tek., 14. Guara 2. tek., 15. Akbadem 1. tek., 16. Bozkurt 3. tek., 17. Yaltinski 2. tek., 18. Gülcan1 1. tek., 19. *A.webbii* 2.tek., 20. Hacıalibey 2.tek., 21. Hacıalibey 3. tek., 22. Ne Plus Ultra 2.tek., 23. Ne Plus Ultra 3.tek., 24. Bozkurt 1.tek., 25. Nonpareil 3.tek., 26. Halitbey 1.tek., 27. Halitbey 2. tek., 28. Halitbey 3.tek., 29. *A.arabica* 1. tek., 30. Gülcan2 1. tek., 31. Gülcan2 2. tek., 32. Gülcan2 3. tek., 33. Akbadem 2. tek., 34. Supernova 1. tek., 35. Ferraduel 2. tek., 36. Ferraduel 3. tek., 37. Garrigues 2.tek., 38. Guara 1.tek., 39. Yavuzeli 51 1.tek., 40. Araban 136 1.tek., 41. Yavuzeli 24 1. tek., 42. Yavuzeli 19 1. tek., 43. Yavuzeli 102 3.tek., 44. Araban 96 3. tek., 45. Yavuzeli 103 3. tek., 46. Araban 146 1. tek., 47. Yavuzeli 29 2. tek., 48. *A.orientalis* 1. tek., 49. Araban 96 1. tek., 50. Yavuzeli 29 1. tek., 51. Yavuzeli 51 2. tek., 52. *A.orientalis* 2. tek., 53. Araban 94 1. tek., 54. Yavuzeli 24 2. tek., 55. Yavuzeli 28 1. tek., 56. Araban 95 3. tek., 57. Araban 164 2. tek., 58. Araban 126 3. tek., 59. Araban 125 2. tek., 60. 48-1 2. tek., 61. Yavuzeli 29 1. tek., 62. Yavuzeli 51 2. tek., 63. Araban 10 3.tek., 64. 48-1 3.tek., 65. Yavuzeli 26 1. tek., 66. Araban 126 1. tek., 67. Yavuzeli 51 3.tek., 68. Araban 125 1. tek., 69. Araban 10 2.tek., 70. Yavuzeli 103 1. tek., 71. Yavuzeli 26 3. tek., 72. 48-1 1. tek., 73. Araban 146 2. tek., 74. Araban 136 2. tek., 75. Yavuzeli 19 3. tek., 76. Yavuzeli 26 2. tek., 77. Araban 164 3. tek., 78. Araban 94 3. tek., 79. Yavuzeli 102 2. tek., 80. Yavuzeli 29 3. tek., 81. Araban 125 3.tek., 82. *A.orientalis* 3. tek., 83. Araban 17 3.tek., 84. Araban 17 2. tek., 85. Yavuzeli 28 2.tek., 86. Yavuzeli 28 3.tek., 87. Araban 94 2.tek., 88. Yavuzeli 19 2.tek., 89. Araban 17 1. tek., 90. Yavuzeli 103 2. tek., 91. Araban 126 2.tek., 92. 17-4 3. tek., 93. Araban 164 1.tek., 94. Araban 95 1. tek., 95. Yavuzeli 102 1. tek., 96. Araban 96 2. tek., 97. Yavuzeli 24 3. tek., 98. Araban 146 3. tek., 99. Araban 10 1. tek., 100. Araban 136 3. tek., 101. Araban 164 1. tek., 102. Gülcan 1 2. tek., 103. Yavuzeli 103 3. tek., 104. 17-4 2. tek., 105. Araban 164 3.tek., 106. Araban 129 2. tek., 107. *A.webbii* 3.tek., 108. Araban 129 1. tek., 109. Araban 95 2.tek., 110. Araban 129 3.tek.

Çizelge 4.4 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
15	Akbadem-1. tek	30,49	0,762	0,350	2,18
33	Akbadem-2. tek.	22,03	0,551	0,310	1,77
8	Akbadem-3. tek	41,71	0,293	0,165	1,77
29	<i>Amygdalus arabica</i> -1. tek.	105,69	2,642	1,203	2,20
*	<i>Amygdalus arabica</i> - 2. tek.	187,23	33,745	15,604	2,16
*	<i>Amygdalus arabica</i> - 3. tek.	235,28	20,706	9,184	2,25
48	<i>Amygdalus orientalis</i> -1. tek.	476,98	11,924	5,654	2,11
52	<i>Amygdalus orientalis</i> -2. tek.	65,06	1,626	0,716	2,27
82	<i>Amygdalus orientalis</i> -3. tek.	41,61	1,040	0,479	2,17
*	<i>Amygdalus webbii</i> -1. tek.	259,15	41,183	18,92	2,18
19	<i>Amygdalus webbii</i> -2. tek.	104,08	0,352	0,178	1,97
107	<i>Amygdalus webbii</i> -3. tek.	359,33	8,983	4,154	2,16
99	Araban 10-1. tek	743,08	18,577	8,352	2,22
69	Araban 10-2. tek	678,97	16,974	7,620	2,23
63	Araban 10-3. tek	347,41	8,685	3,994	2,17
89	Araban 17-1. tek	962,89	24,072	10,656	2,26
84	Araban 17-2. tek	523,02	13,026	5,852	2,23
83	Araban 17-3. tek	1016,09	25,402	11,356	2,24
53	Araban 94-1. tek.	249,88	6,247	2,905	2,15
87	Araban 94-2.tek	67,43	1,686	0,790	2,13
78	Araban 94-3. tek	35,03	0,876	0,487	1,80
94	Araban 95-1. tek	80,52	0,263	0,116	2,27
109	Araban 95-2. tek	363,29	9,082	4,146	2,19
56	Araban 95-3. tek.	373,51	9,338	4,557	2,05
49	Araban 96-1. tek	234,09	5,852	2,838	2,06
96	Araban 96-2. tek	80,36	0,009	0,013	0,68
44	Araban 96-3. tek	93,30	2,333	1,111	2,10
68	Araban 125-1. tek	316,98	7,925	3,754	2,11
59	Araban 125-2. tek	511,51	12,788	5,917	2,16
81	Araban 125-3. tek	32,55	0,814	0,371	2,20
66	Araban 126-1. tek	200,20	5,005	2,272	2,20
91	Araban 126-2. tek.	210,41	5,260	2,365	2,22
58	Araban 126-3. tek.	657,71	16,443	7,534	2,18
108	Araban 129-1. tek	222,12	5,553	2,533	2,19
106	Araban 129-2. tek	480,77	12,019	5,271	2,28
110	Araban 129-3. tek	246,83	6,171	2,814	2,19
40	Araban 136-1. tek.	280,47	0,712	0,541	1,32
74	Araban 136-2. tek	32,44	0,811	0,441	1,84
100	Araban 136-3. tek	58,18	0,455	0,210	2,16
46	Araban 146-1. tek	292,92	7,323	3,434	2,13
73	Araban 146-2. tek	74,02	1,851	0,865	2,14

Çizelge 4.4 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
98	Araban 146-3. tek.	70,41	0,185	0,107	1,73
101	Araban 164-1. tek	169,67	4,242	1,919	2,21
57	Araban 164-2. tek	299,80	7,495	3,501	2,14
77	Araban 164-3. tek	140,49	0,362	0,179	2,03
24	Bozkurt-1. tek	27,66	0,691	0,325	2,13
*	Bozkurt-2. tek.	166,26	4,156	2,179	1,91
16	Bozkurt-3. tek.	89,90	2,248	1,027	2,19
3	Ferraduel-1. tek.	40,90	1,022	0,456	2,24
35	Ferraduel-2. tek.	373,22	27,464	12,628	2,17
36	Ferraduel-3. tek.	357,67	8,942	4,046	2,21
2	Garrigues-1. tek.	47,24	1,181	0,546	2,16
37	Garrigues-2. tek	766,12	19,153	8,490	2,26
*	Garrigues-3. tek.	377,1	9,428	4,579	2,06
38	Guara-1. tek.	25,78	0,644	0,319	2,02
14	Guara-2. tek.	70,66	0,191	0,095	2,03
*	Guara-3. tek.	175,58	29,39	13,425	2,19
18	Gülcan 1-1. tek.	150,24	3,756	1,684	2,23
102	Gülcan 1-2. tek.	179,05	4,476	2,010	2,23
9	Gülcan 1-3. tek	40,91	0,123	0,090	1,37
30	Gülcan 2-1. tek	56,05	1,401	0,675	2,08
31	Gülcan 2-2. tek	33,65	0,841	0,403	2,09
32	Gülcan 2-3. tek	23,02	0,575	0,298	1,93
5	Hacıalibey-1. tek	62,72	1,568	0,700	2,24
20	Hacıalibey-2. tek.	200,10	0,503	0,262	1,92
21	Hacıalibey-3. tek.	150,76	0,394	0,210	1,88
26	Halitbey-1. tek	120,45	0,311	0,158	1,97
27	Halitbey-2. tek	136,50	3,413	1,567	2,18
28	Halitbey-3. tek	114,64	2,866	1,328	2,16
1	Moncayo-1. tek	24,67	0,617	0,292	2,11
*	Moncayo-2. tek.	217,25	30,431	15,795	1,93
*	Moncayo-3. tek	266,99	6,675	3,203	2,08
6	Ne Plus Ultra-1. tek	44,80	1,120	0,511	2,19
22	Ne Plus Ultra-2. tek	28,00	0,700	0,329	2,13
23	Ne Plus Ultra-3. tek	33,37	0,834	0,406	2,06
4	Nonpareil-1. tek	30,85	0,096	0,030	3,22
*	Nonpareil-2. tek.	45,60	0,096	0,030	3,22
25	Nonpareil-3. tek	30,65	0,091	0,068	1,34
*	Primorski-1. tek.	241,11	6,028	2,834	2,13
13	Primorski-2. tek	131,80	3,295	1,489	2,21
93	Primorski-3. tek.	108,41	2,71	1,226	2,21
34	Supernova-1. tek	285,20	7,129	3,226	2,21

Çizelge 4.4 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

11	Supernova-2. tek	167,89	4,197	1,909	2,20
*	Supernova-3. tek.	248,18	31,204	15,797	1,98
*	Teksas-1. tek.	221,78	42,436	22,517	1,88
7	Teksas-2. tek.	48,97	1,224	0,564	2,17
*	Teksas-3. tek.	215,27	40,305	21,425	1,88
10	Yaltinski-1. tek.	54,62	0,366	0,185	1,97
17	Yaltinski-2. tek.	47,38	0,435	0,217	2,00
*	Yaltinski-3. tek.	222,21	42,444	22,392	1,90
42	Yavuzeli 19-1. tek	334,43	8,361	3,866	2,16
88	Yavuzeli 19 2. tek	70,48	1,762	0,792	2,22
75	Yavuzeli 19-3. tek	213,37	5,334	2,426	2,20
41	Yavuzeli 24-1. tek.	140,81	0,370	0,164	2,26
54	Yavuzeli 24-2. tek	265,92	6,648	3,157	2,11
97	Yavuzeli 24-3. tek	13,73	0,343	0,164	2,10
65	Yavuzeli 26-1. tek	169,32	4,233	1,897	2,23
76	Yavuzeli 26-2. tek	198,53	4,963	2,238	2,22
71	Yavuzeli 26-3. tek	221,06	5,527	2,487	2,22
55	Yavuzeli 28-1. tek	109,16	2,729	1,235	2,21
85	Yavuzeli 28-2. tek	110,09	0,277	0,134	2,08
86	Yavuzeli 28-3. tek.	60,72	0,168	0,065	2,57
50	Yavuzeli 29-1. tek	217,48	5,437	2,534	2,15
47	Yavuzeli 29-2. tek	283,43	7,086	3,252	2,18
80	Yavuzeli 29-3. tek	160,32	0,408	0,195	2,09
39	Yavuzeli 51-1. tek	224,66	24,493	11,290	2,17
62	Yavuzeli 51-2. tek.	159,75	3,994	1,853	2,16
67	Yavuzeli 51-3. tek	34,01	0,850	0,423	2,01
95	Yavuzeli 102-1. tek	100,44	0,261	0,106	2,47
79	Yavuzeli 102-2. tek	33,61	0,840	0,396	2,12
43	Yavuzeli 102-3. tek	90,93	0,248	0,148	1,68
70	Yavuzeli 103-1. tek	256,77	6,419	2,998	2,14
90	Yavuzeli 103-2. tek	227,35	24,547	9,842	2,49
103	Yavuzeli 103-3. tek.	161,81	4,045	1,834	2,21
12	17-4-1. tek	105,18	2,630	1,205	2,18
104	17-4-2. tek	96,13	2,403	1,092	2,20
92	17-4-3. tek.	89,62	2,241	1,034	2,17

Çizelge 4.4 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin bazı kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

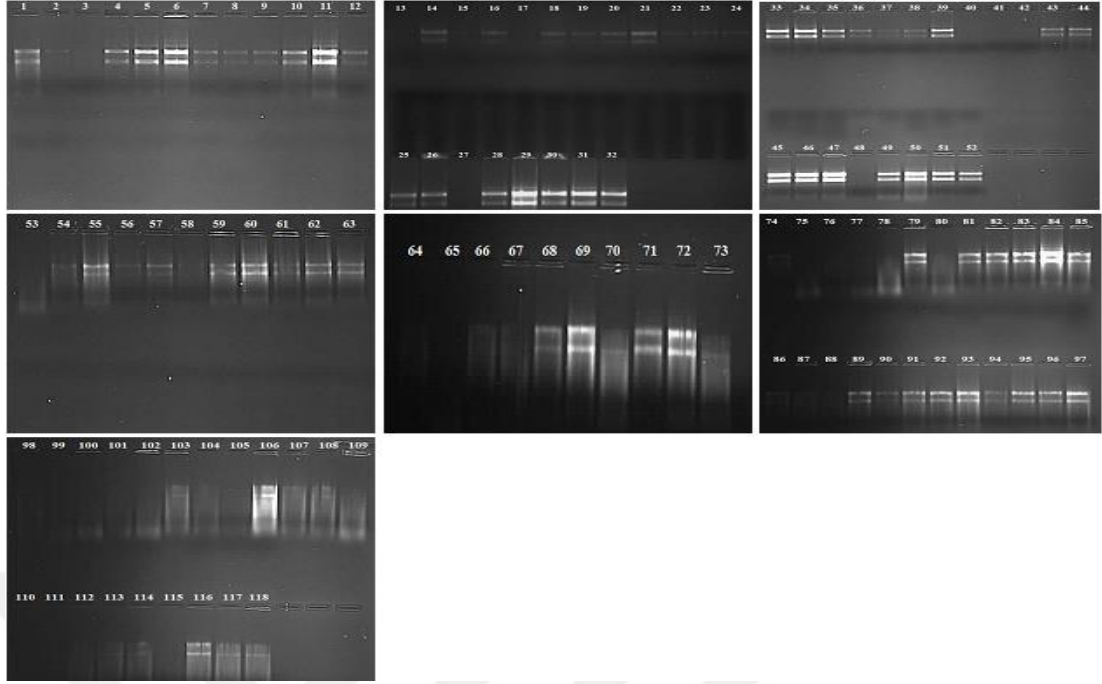
72	48-1-1. tek	52,63	1,316	0,600	2,19
60	48-1-2. tek	165,39	4,135	1,918	2,16
64	48-1-3. tek	131,08	3,277	1,527	2,15
* Şekil 4.11'de yer almamaktadır.					

Real Time PCR amaçlı izole edilen RNA'ların saflık (260/280) oranının yaklaşık 1.8-2.0 olması istenmektedir. Bu oran 1.8'den düşük olduğunda ortamda protein varlığı, 2.0'dan büyük olduğunda ise (örneğin kloroform veya fenol ile) kontamine olma durumu söz konusudur.

Geç çiçeklenme değerlendirmesinin kontrol örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri sonuçlarında (Çizelge 4.4) RNA'larda saflık oranlarının genel olarak istenilen sınırlar içinde olması, istenilen kalitede RNA izolasyonunun gerçekleştiğinin göstergesidir. Elde edilen RNA'ların miktarlarının yaklaşık 200 ng/µl olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

4.4.2 Geç çiçeklenme değerlendirmesinin stres örneklerinde RNA izolasyonu

Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri Şekil 4.12'de verilmektedir. Örneklerin çift banda sahip olmaları, RNA'larının net bir şekilde gözlemlendiğini ifade etmektedir.



Şekil 4.12 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri (tek:tekerrür)

1. 17-4 3.tek., 2. Hacılibey 2.tek., 3. Hacılibey 3. tek., 4. Nonpareil 3. tek., 5. Halitbey 3.tek., 6. *A.arabica* 3. tek., 7. Yaltinski 3.tek., 8. Gülcan2 3. tek., 9. Akbadem 3. tek., 10. Ferraduel 3. tek., 11. Teksas 3. tek., 12. Primorski 3. tek. 13. Primorski 1.tek., 14. *A.arabica* 2.tek., 15. Akbadem 2. tek., 16. Halitbey 2. tek., 17. Primorski 2.tek., 18. Halitbey 1. tek., 19. Gülcan2 2.tek., 20. Gülcan2 1. tek., 21. *A.arabica* 1. tek., 22. Nonpareil 2. tek., 23. Ferraduel 2. tek., 24. Hacılibey 1. tek., 25. Ferraduel 1. tek., 26. 17-4 1. tek., 27. Akbadem 1. tek., 28. Yaltinski 2. tek., 29. Yaltinski 1. tek., 30. 17-4 2. tek., 31. Ne Plus Ultra 1. tek., 32. Ne Plus Ultra 2. tek., 33. Bozkurt 1.tek., 34. Bozkurt 2.tek., 35. Bozkurt 3.tek., 36. Nonpareil 1. tek., 37. Moncayo 1.tek., 38. Moncayo 2.tek., 39. Ne Plus Ultra 3.tek., 40. *A.orientalis* 1. tek., 41. *A.orientalis* 2. tek., 42. Gülcan1 1. tek., 43. Supernova 1. tek., 44. Supernova 2.tek., 45. *A.webbii* 1.tek., 46. *A.webbii* 2.tek., 47. *A.webbii* 3. tek., 48. *A.orientalis* 3. tek., 49. Moncayo 3. tek., 50. Supernova 3. tek., 51. Teksas 1. tek., 52. Teksas 2.tek., 53. 48-1 1.tek., 54. 48-1 2.tek., 55. 48-1 3.tek., 56. Guara 1. tek., 57. Guara 2.tek., 58. Guara 3.tek., 59. Gülcan1 2.tek., 60. Gülcan1 3. tek., 61. Garrigues 1.tek., 62. Garrigues 2.tek., 63. Garrigues 3. tek. 64. Araban 164 1.tek., 65. Araban 164 2. tek., 66. Yavuzeli 26 3. tek., 67. Yavuzeli 28 2. tek., 68. Araban 164 3. tek., 69. Araban 129 2.tek., 70. Yavuzeli 28 1.tek., 71. Araban 17 3.tek., 72. Araban 95 2.tek., 73. Araban 17 1.tek., 74. Araban 126 2. tek., 75. Araban 129 1. tek., 76. Yavuzeli 28 3. tek., 77. Araban 146 1. tek., 78. Yavuzeli 103 3. tek., 79. Araban 126 3. tek., 80. Yavuzeli 26 2. tek., 81. Yavuzeli 103 1. tek., 82. Yavuzeli 26 1. tek., 83. Araban 95 3. tek., 84. Araban 126 1. tek., 85. Araban 129 3. tek., 86. Yavuzeli 103 2. tek., 87. Araban 136 2. tek., 88. Yavuzeli 19 3. tek., 89. Yavuzeli 24 2. tek., 90. Araban 17 2. tek., 91. Yavuzeli 102 2. tek., 92. Araban 10 3. tek., 93. Araban 94 2. tek., 94. Araban 96 1. tek., 95. Araban 94 3. tek., 96. Yavuzeli 19 1. tek., 97. Araban 94 1. tek., 98. Yavuzeli 29 3. tek., 99. Araban 125 1. tek., 100. Araban 10 2.tek., 101. Yavuzeli 29 2.tek., 102. Yavuzeli 24 3.tek., 103. Araban 125 2.tek., 104. Yavuzeli 51 3.tek., 105. Araban 95 1.tek., 106. Yavuzeli 24 1.tek., 107. Yavuzeli 51 2.tek., 108. Yavuzeli 51 1.tek., 109. Araban 96 3.tek., 110. Yavuzeli 19 2.tek., 111. Yavuzeli 102 3.tek., 112. Yavuzeli 29 1.tek., 113. Araban 125 3.tek., 114. Araban 136 1.tek., 115. Yavuzeli 102 1. tek., 116. Araban 10 1.tek., 117. Araban 136 3.tek., 118. Araban 96 2.tek.

Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.5'te verilmektedir.

Çizelge 4.5 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
27	Akbadem-1. tek.	120,70	0,317	0,188	1,69
15	Akbadem-2. tek.	44,47	1,112	0,562	1,98
9	Akbadem-3. tek.	22,38	0,560	0,284	1,97
21	<i>Amygdalus arabica</i> -1. tek.	143,51	3,588	1,685	2,13
14	<i>Amygdalus arabica</i> -2. tek.	335,20	8,380	3,843	2,18
6	<i>Amygdalus arabica</i> -3. tek.	218,62	5,466	2,493	2,19
40	<i>Amygdalus orientalis</i> -1. tek.	26,18	0,655	0,472	1,39
41	<i>Amygdalus orientalis</i> -2. tek.	20,20	0,505	0,392	1,29
48	<i>Amygdalus orientalis</i> -3. tek.	16,49	0,412	0,338	1,22
45	<i>Amygdalus webbii</i> -1. tek.	158,66	3,966	1,830	2,17
46	<i>Amygdalus webbii</i> -2. tek.	188,00	4,700	2,159	2,18
47	<i>Amygdalus webbii</i> -3. tek.	150,35	0,384	0,342	1,12
116	Araban 10-1. tek.	258,94	6,473	2,931	2,21
100	Araban 10-2. tek.	233,89	5,847	2,645	2,21
92	Araban 10-3. tek.	187,17	4,679	2,126	2,20
73	Araban 17-1. tek.	246,83	6,171	2,814	2,19
90	Araban 17-2. tek.	72,70	1,818	0,824	2,21
71	Araban 17-3. tek.	222,12	5,553	2,533	2,19
97	Araban 94-1. tek.	231,83	5,796	2,611	2,22
93	Araban 94-2. tek.	274,36	6,859	3,127	2,19
95	Araban 94-3. tek.	121,28	3,032	1,368	2,22
105	Araban 95-1. tek.	323,32	26,466	12,278	2,16
72	Araban 95-2. tek.	363,29	9,082	4,146	2,19
83	Araban 95-3. tek.	258,01	6,450	2,915	2,21
94	Araban 96-1. tek.	31,34	0,783	0,324	2,41
118	Araban 96-2. tek.	196,63	4,916	2,232	2,20
109	Araban 96-3. tek.	259,43	6,486	2,939	2,21
99	Araban 125-1. tek.	205,15	5,129	2,288	2,24
103	Araban 125-2. tek.	252,86	6,322	2,846	2,22
113	Araban 125-3. tek.	229,32	5,733	2,556	2,24
84	Araban 126-1. tek.	571,69	14,292	6,218	2,30
74	Araban 126-2. tek.	228,60	5,715	2,579	2,22
79	Araban 126-3. tek.	300,57	7,514	3,422	2,20
75	Araban 129-1. tek.	296,68	7,417	3,342	2,22
69	Araban 129-2. tek.	480,77	12,019	5,271	2,28
85	Araban 129-3. tek.	360,50	9,012	4,190	2,15

Çizelge 4.5 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
114	Araban 136-1. tek.	212,48	5,312	2,400	2,21
87	Araban 136-2. tek.	227,89	5,697	2,580	2,21
117	Araban 136-3. tek.	223,24	5,581	2,527	2,21
77	Araban 146-1. tek.	142,83	3,571	1,656	2,16
*	Araban 146-2. tek.	216,68	40,334	21,424	1,88
*	Araban 146-3. tek.	253,84	41,077	21,721	1,89
64	Araban 164-1. tek.	169,67	4,242	1,919	2,21
65	Araban 164-2. tek.	179,05	4,476	2,010	2,23
68	Araban 164-3. tek.	167,38	4,184	1,874	2,23
33	Bozkurt-1. tek.	171,78	4,295	2,095	2,05
34	Bozkurt-2. tek.	165,22	4,130	2,027	2,04
35	Bozkurt-3. tek.	83,12	2,078	1,220	1,70
25	Ferraduel-1. tek.	188,51	4,713	2,212	2,13
23	Ferraduel-2. tek.	47,44	1,186	0,589	2,01
10	Ferraduel-3. tek.	94,87	2,372	1,091	2,17
61	Garrigues-1. tek.	89,88	2,247	1,009	2,23
62	Garrigues-2. tek.	98,33	2,458	1,115	2,20
63	Garrigues-3. tek.	75,31	1,883	0,845	2,23
56	Guara-1. tek.	70,11	0,178	0,089	2,00
57	Guara-2. tek.	60,66	0,517	0,245	2,10
58	Guara-3. tek.	90,86	0,247	0,193	1,28
42	Gülcan 1-1. tek.	26,99	0,675	0,494	1,39
59	Gülcan 1-2. tek.	92,21	2,305	1,045	2,21
60	Gülcan 1-3. tek.	171,15	4,279	1,920	2,23
20	Gülcan 2-1. tek.	82,62	2,066	0,989	2,09
19	Gülcan 2-2. tek.	61,75	1,544	0,742	2,08
8	Gülcan 2-3. tek.	27,81	0,695	0,363	1,92
24	Hacılibey-1. tek.	46,33	1,158	0,598	1,94
2	Hacılibey-2. tek.	18,91	0,473	0,259	1,82
3	Hacılibey-3. tek.	15,63	0,391	0,230	1,70
18	Halitbey-1. tek.	93,73	2,343	1,117	2,10
16	Halitbey-2. tek.	170,97	4,274	1,985	2,15
5	Halitbey-3. tek.	131,29	3,282	1,502	2,19
*	Moncayo-1. tek.	275,02	41,5	22,466	1,85
38	Moncayo-2. tek.	32,04	0,801	0,529	1,51
49	Moncayo-3. tek.	74,72	1,868	0,952	1,96
31	Ne Plus Ultra-1. tek.	293,19	7,330	3,402	2,15
32	Ne Plus Ultra-2. tek.	210,67	5,267	2,421	2,18
39	Ne Plus Ultra-3. tek.	71,08	1,777	0,955	1,86

Çizelge 4.5 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
*	Nonpareil-1. tek.	275,81	6,895	3,349	2,06
22	Nonpareil-2. tek.	40,49	1,012	0,511	1,98
4	Nonpareil-3. tek.	66,68	1,667	0,794	2,10
13	Primorski-1. tek.	47,74	1,193	0,628	1,90
17	Primorski-2. tek.	29,98	0,749	0,419	1,79
12	Primorski-3. tek.	38,61	0,965	0,472	2,04
43	Supernova-1. tek.	95,80	2,395	1,461	1,64
44	Supernova-2. tek.	57,23	1,431	0,815	1,76
50	Supernova-3. tek.	129,22	3,230	1,509	2,14
51	Teksas-1. tek.	85,93	2,148	1,059	2,03
52	Teksas-2. tek.	63,27	1,582	0,837	1,89
11	Teksas-3. tek.	286,01	7,150	3,262	2,19
29	Yaltinski-1. tek.	508,00	12,700	5,659	2,24
28	Yaltinski-2. tek.	174,47	4,362	2,017	2,16
7	Yaltinski-3. tek.	25,70	0,643	0,330	1,94
96	Yavuzeli 19-1. tek.	128,59	3,215	1,439	2,23
110	Yavuzeli 19-2. tek.	105,38	2,634	1,175	2,24
88	Yavuzeli 19-3. tek.	69,89	1,747	0,786	2,22
106	Yavuzeli 24-1. tek.	267,51	6,688	2,973	2,25
89	Yavuzeli 24-2. tek.	252,86	6,321	2,841	2,22
102	Yavuzeli 24-3. tek.	226,56	5,664	2,491	2,27
82	Yavuzeli 26-1. tek.	237,96	5,949	2,721	2,19
80	Yavuzeli 26-2. tek.	140,62	3,515	1,598	2,20
66	Yavuzeli 26-3. tek.	161,81	4,045	1,834	2,21
70	Yavuzeli 28-1. tek.	359,33	8,983	4,154	2,16
67	Yavuzeli 28-2. tek.	96,13	2,403	1,092	2,20
76	Yavuzeli 28-3. tek.	79,32	1,983	0,923	2,15
112	Yavuzeli 29-1. tek.	314,49	7,862	3,538	2,22
101	Yavuzeli 29-2. tek.	144,17	3,604	1,611	2,24
98	Yavuzeli 29-3. tek.	233,17	5,829	2,647	2,20
108	Yavuzeli 51-1. tek.	186,20	4,655	2,097	2,22
107	Yavuzeli 51-2. tek.	159,82	3,995	1,778	2,25
104	Yavuzeli 51-3. tek.	87,99	2,200	0,971	2,27
115	Yavuzeli 102-1. tek.	230,03	0,751	0,332	2,26
91	Yavuzeli 102-2. tek.	170,50	4,262	1,946	2,19
111	Yavuzeli 102-3. tek.	26,55	0,664	0,294	2,26
81	Yavuzeli 103-1. tek.	184,88	4,622	2,067	2,24
86	Yavuzeli 103-2. tek.	200,76	5,019	2,249	2,23
78	Yavuzeli 103-3. tek.	318,67	7,967	3,631	2,19
26	17-4-1. tek.	131,82	3,295	1,583	2,08
30	17-4-2. tek.	207,41	5,185	2,411	2,15
1	17-4-3. tek.	100,32	2,508	1,150	2,18

Çizelge 4.5 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı stres örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

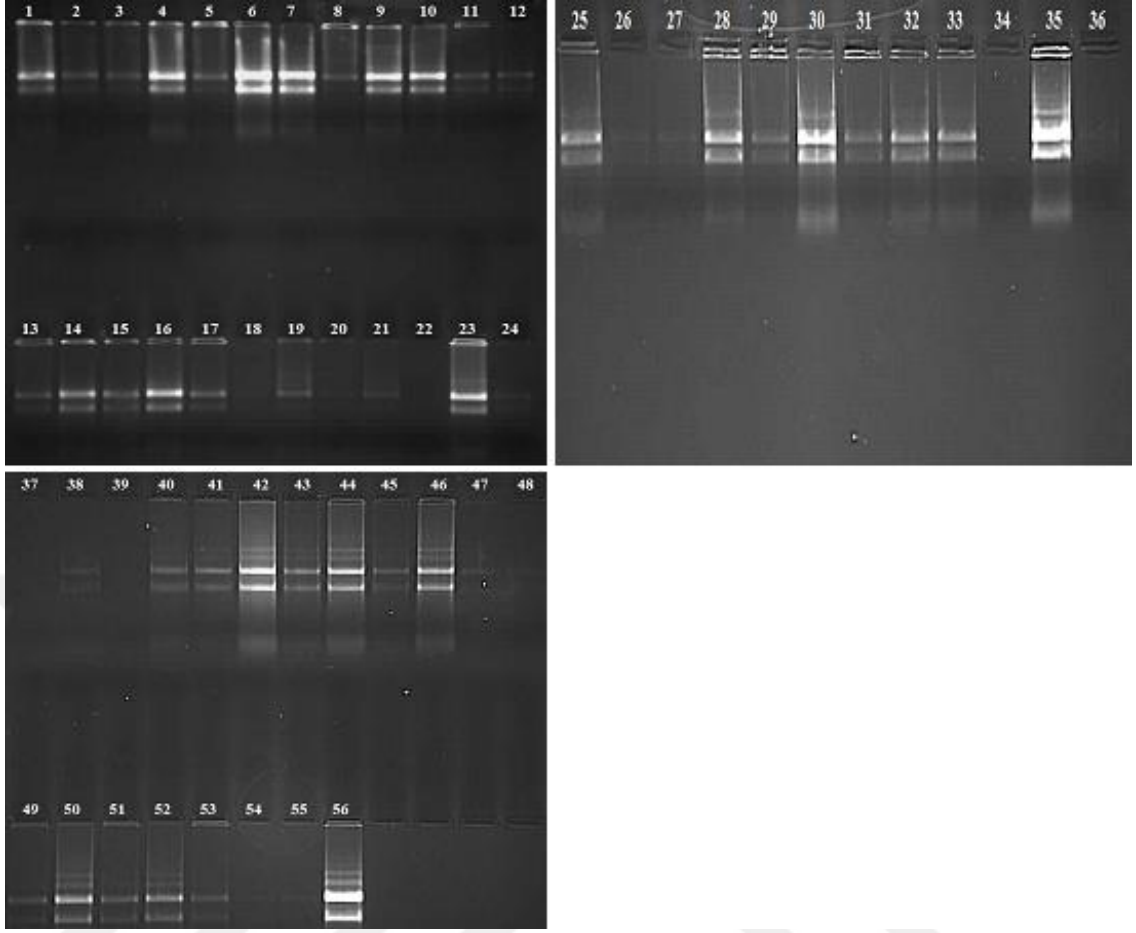
RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
53	48-1-1. tek.	45,80	1,145	0,590	1,94
54	48-1-2. tek.	44,87	1,122	0,531	2,11
55	48-1-3. tek.	184,15	4,604	2,093	2,20
* Şekil 4.12'de yer almamaktadır.					

Real Time PCR amaçlı izole edilen geç çiçeklenme stres örneklerine ait RNA'ların safılık (260/280) oranının yaklaşık 2.2 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5). Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ise 15,63 ile 571,69 ng/µl aralığında değişmektedir (Çizelge 4.5). Bu sonuçlar, elde edilen RNA konsantrasyonlarının (Çizelge 4.5) ve agaroz jel (% 1) elektroforez görüntülerinin (Şekil 4.12) cDNA sentezi için yeterli olduğu anlamına gelmektedir.

4.4.3 Soğuğa tolerans uygulamasına ilişkin RNA izolasyonu

4.4.3.1 Referans çeşitlerin RNA izolasyonu

Soğuğa tolerans uygulamalarına ilişkin olarak kullanılan referans çeşitlerin RNA'ları Şekil 4.13'te verilmektedir.



Şekil 4.13 Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) bazı referans çeşitlerine ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri

1. 48-1 12.saat. 1.tek, **2.** 48-1 1.saat 1.tek., **3.** 48-1 3.saat 1.tek., **4.** 48-1 1.5 saat 1.tek., **5.** 48-1 6.saat 1.tek., **6.** Nurlu 1.5 saat 1.tek., **7.** Nurlu 3.saat 1.tek., **8.** Nurlu 12.saat 1.tek., **9.** Nurlu 6.saat 1.tek., **10.** Nurlu 1.saat 2.tek., **11.** Ferragnes 1.5 saat 1.tek., **12.** Ferragnes 6. saat 3.tek **13.** Ferragnes 3. saat 3.tek **14.** Ferragnes 1. saat 1.tek., **15.** Ferragnes 1. saat 2.tek., **16.** Bertina 12. saat 2.tek., **17.** Bertina 3. saat 1.tek., **18.** Bertina 12. saat 1.tek., **19.** Bertina 1. saat 1.tek., **20.** Bertina 3. saat 2.tek., **21.** Bertina 6. saat 1.tek., **22.** Bertina 6. saat 3.tek., **23.** Nurlu 12. saat 3.tek., **24.** 48-1 1.5 saat 3.tek., **25.** 48-1 3.saat. 2.tek., **26.** Ferragnes 3..saat 2.tek., **27.** 48-1 3.saat 3.tek., **28.** 48-1 12. saat 2.tek., **29.** Ferragnes 1.5.saat 3.tek., **30.** Ferragnes 1.5.saat 2.tek., **31.** Ferragnes 12.saat 2.tek., **32.** Ferragnes 1.saat 3.tek., **33.** Bertina 1.5.saat 3.tek., **34.** Bertina 3.saat 3.tek., **35.** Bertina 12.saat 3.tek., **36.** Bertina 1.5.saat 2.tek., **37.** Bertina 6.saat 2.tek., **38.** Bertina 1.saat 2.tek., **39.** Bertina 1.saat 3.tek., **40.** Nurlu 1.5. saat 3.tek., **41.** Nurlu 12.saat 2.tek., **42.** Nurlu 1.saat 3.tek., **43.** Nurlu 3.saat 3.tek., **44.** Nurlu 3.saat 2.tek., **45.** Nurlu 6.saat 2.tek **46.** Nurlu 1.saat 1.tek., **47.** 48-1 12.saat 3.tek., **48.** 48-1 6.saat 2.tek., **49.** 48-1 6.saat 3.tek., **50.** 48-1 1.saat 3.tek., **51.** 48-1 1.saat 2.tek., **52.** 48-1 1.5 saat 2.tek., **53.** Nurlu 6. saat 3.tek., **54.** 48-1 12. 1.saat 3.tek., **55.** Bertina 1.5 saat 2.tek., **56.** Nurlu 1.5 saat 2.tek.

Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) referans çeşitlerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6 Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) bazı referans çeşitlerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
19	Bertina 1. saat-1. tek	48,88	1,222	0,562	2,17
38	Bertina 1.saat-2. tek	135,97	3,399	1,568	2,17
39	Bertina 1.saat-3. tek	180,04	0,201	0,082	2,45
55	Bertina 1.5 saat-2. tek	90,81	0,245	0,105	2,33
36	Bertina 1.5.saat-2. tek	60,90	0,173	0,061	2,84
33	Bertina 1.5.saat-3. tek	27,93	0,698	0,339	2,06
17	Bertina 3. saat-1. tek	27,54	0,689	0,290	2,37
20	Bertina 3. saat-2. tek	160,12	0,403	0,229	1,76
34	Bertina 3.saat-3. tek	170,38	0,434	0,180	2,41
21	Bertina 6. saat-1. tek	200,51	0,513	0,272	1,89
37	Bertina 6.saat-2. tek	190,12	0,228	0,053	4,27
22	Bertina 6. saat-3. tek	160,49	0,412	0,196	2,11
18	Bertina 12. saat-1. tek	90,73	0,243	0,140	1,74
16	Bertina 12. saat-2. tek	126,03	3,151	1,396	2,26
35	Bertina 12.saat-3. tek	217,84	5,446	2,543	2,14
14	Ferragnes 1. saat-1. tek	79,24	1,981	0,857	2,31
15	Ferragnes 1. saat-2. tek	86,54	2,164	1,009	2,14
32	Ferragnes 1.saat-3. tek	62,89	1,572	0,763	2,06
11	Ferragnes 1.5 saat-1. tek	130,22	0,755	0,321	2,35
30	Ferragnes 1.5.saat-2. tek	111,40	2,785	1,308	2,13
29	Ferragnes 1.5.saat-3. tek	130,45	0,086	0,047	1,83
*	Ferragnes 3. saat-1. tek	146,43	42,929	22,657	1,89
26	Ferragnes 3.saat-2. tek	40,02	0,100	0,026	3,82
13	Ferragnes 3. saat-3. tek	22,08	0,552	0,199	2,77
*	Ferragnes 6. saat-1. tek	30,34	0,434	0,180	2,41
*	Ferragnes 6. saat-2. tek	24,15	0,698	0,339	2,06
12	Ferragnes 6. saat-3. tek	15,55	0,389	0,161	2,41
*	Ferragnes 12.saat-1. tek	126,23	0,403	0,229	1,76
31	Ferragnes 12.saat-2. tek	80,01	0,200	0,110	1,82
*	Ferragnes 12.saat-3. tek	102,56	0,513	0,272	1,89
46	Nurlu 1.saat-1. tek	347,21	8,680	3,997	2,17
10	Nurlu 1.saat-2. tek	195,03	4,876	2,164	2,25
42	Nurlu 1.saat-3. tek	603,77	15,094	6,684	2,26
6	Nurlu 1.5 saat-1. tek	463,21	11,58	5,307	2,18
56	Nurlu 1.5 saat-2. tek	375,62	9,390	4,329	2,17
40	Nurlu 1.5. saat-3. tek	449,27	11,232	5,234	2,15
7	Nurlu 3.saat-1. tek	324,42	8,111	3,674	2,21

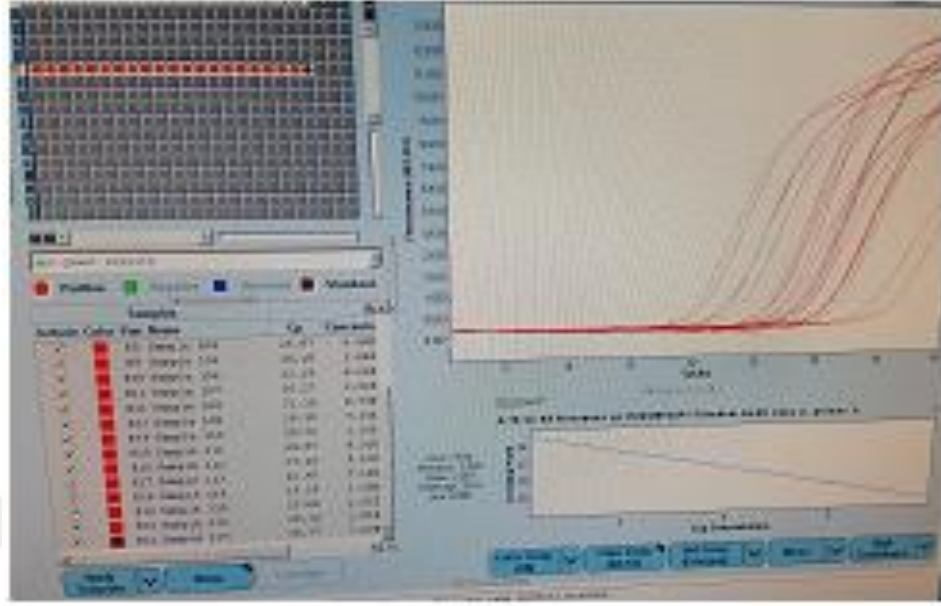
Çizelge 4.6 Soğuk uygulamaları (1., 1.5., 3., 6. ve 12. saat) bazı referans çeşitlerine ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
44	Nurlu 3.saat-2. tek	443,20	11,080	5,180	2,14
43	Nurlu 3.saat-3. tek	209,13	5,228	2,359	2,22
9	Nurlu 6.saat-1. tek	282,37	7,059	3,271	2,16
45	Nurlu 6.saat-2. tek	66,68	1,667	0,801	2,08
53	Nurlu 6. saat-3. tek	75,19	0,180	0,094	1,91
8	Nurlu 12.saat-1. tek	94,88	2,372	1,112	2,13
41	Nurlu 12.saat-2. tek	243,63	6,091	2,795	2,18
23	Nurlu 12. saat-3. tek	374,23	9,356	4,261	2,20
2	48-1 1.saat-1. tek	108,06	2,701	1,239	2,18
51	48-1 1.saat-2. tek	33,00	0,825	0,394	2,09
50	48-1 1.saat-3. tek	197,69	4,942	2,265	2,18
4	48-1 1.5 saat-1. tek	316,55	7,914	3,618	2,19
52	48-1 1.5 saat-2. tek	75,63	1,891	0,873	2,17
24	48-1 1.5 saat-3. tek	220,12	0,803	0,391	2,05
3	48-1 3.saat-1. tek	43,97	1,099	0,496	2,22
25	48-1 3.saat-2. tek	73,23	1,831	0,882	2,08
27	48-1 3.saat-3. tek	90,70	0,243	0,092	2,63
5	48-1 6.saat-1. tek	63,50	1,587	0,700	2,27
48	48-1 6.saat-2. tek	180,97	0,224	0,082	2,73
49	48-1 6.saat-3. tek	220,8	0,570	0,289	1,97
1	48-1 12.saat-1. tek	213,24	5,331	2,424	2,2
28	48-1 12. saat-2. tek	69,10	1,727	0,784	2,20
54	48-1 12.saat-3. tek	213,47	0,337	0,138	2,44
* Şekil 4.13'te yer almamaktadır.					

Soğuğa tolerans uygulamalarına ilişkin olarak kullanılan referans çeşitlerin RNA spektrofotometrik ölçümleri sonuçlarından elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarının (ng/µl) yaklaşık 50-600 ng/µl aralığında olduğu (Çizelge 4.6) ve Realtime uygulamaları öncesinde elde edilecek cDNA'lar için örneklere ait kullanılan RNA'ların miktar olarak yeterli olduğu görülmektedir.

Soğuğa toleransla ilişkili olarak, PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin qRT-PCR sonuçları karşılaştırıldıktan sonra (Şekil 4.14), referans çeşitlerde soğuğa tolerans bakımından en yüksek gen ifadesi 6. saatte belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). 6. saat soğuk

stresine maruz kalan tüm çeşit, genotip ve yabancı türlerin pembe tomurcuklarında tomurcuk ezimleri ve RNA izolasyonları 3 tekerrürlü olarak tamamlanmıştır.



Şekil 4.14 PdCBF2 primerinin referans çeşitlerdeki tüm saat uygulamalarına ilişkin örnek amplifikasyon ve standart eğri görüntüsü

Çizelge 4.7 Erken çiçeklenen referans çeşitlerde PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin tüm saat uygulamalarına ilişkin Ct değerleri

Tür / Çeşit / Genotip	PdCBF1 Ct değeri	PdCBF2 Ct değeri
48-1 1.saat	31.65	30.32
Nurlu 1. saat	32.21	30.27
48-1 1.5. saat	33.00	35.00
Nurlu 1.5. saat	31.90	31.10
48-1 3.saat	32.69	33.82
Nurlu 3. saat	31.65	29.10
48-1 6.saat	33.55	20.54
Nurlu 6. saat	28.59	30.72
48-1 12.saat	30.06	19.73
Nurlu 12. saat	30.53	28.87
Kontrol-Nurlu	32.25	-

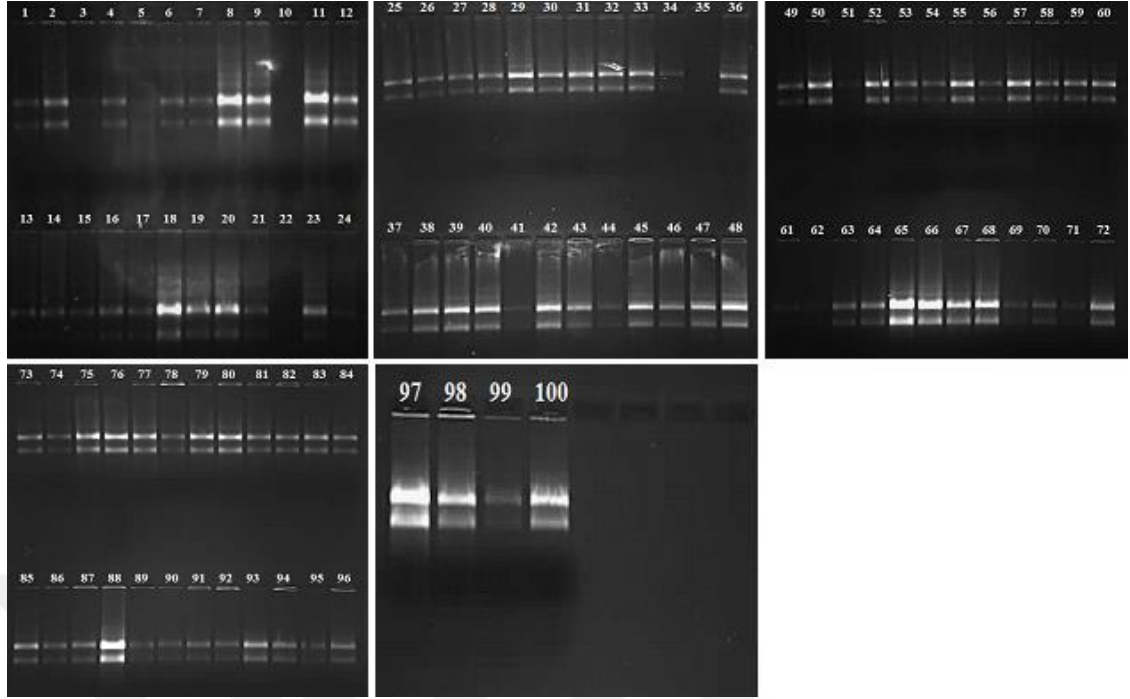
Çizelge 4.8 Geç çiçeklenen referans çeşitlerde PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin tüm saat uygulamalarına ilişkin Ct değerleri

Tür / Çeşit / Genotip	PdCBF1 Ct değeri	PdCBF2 Ct değeri
Bertina 1. saat	31.54	23.46
Ferragnes 1. saat	33.33	27.20
Bertina 1.5. saat	32.08	26.14
Ferragnes 1.5. saat	32.42	22.47
Bertina 3. saat	33.90	26.97
Ferragnes 3. saat	31.66	26.24
Bertina 6. saat	30.95	28.18
Ferragnes 6. saat	33.18	25.89
Bertina 12. saat	32.00	22.29
Ferragnes 12. saat	30.20	28.10
Kontrol-Ferragnes	-	28.77

Erken ve geç çiçeklenen referans çeşitlerde PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerinin soğuk uygulaması amacıyla kullanımında en geniş aralık olarak 6. saat uygulaması uygun bulunmuştur.

4.4.3.2 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan örneklerinin RNA izolasyonu

Soğuk uygulamasına (6. saat) maruz kalan örneklere ait RNA'ların agaroz jel (%1) elektroforez görüntüleri Şekil 4.15'te verilmektedir. Bitkilerde ribozomal RNA alt ve üst birim olmak üzere 2 birimden oluşur. O nedenle agaroz jelde RNA çift bant olarak görülmektedir.



Şekil 4.15 Soğuk uygulamasına (6. saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri

1.Yaltinski 2.tek., 2. Halitbey 1. tek., 3. Guara 2.tek., 4. Akbadem 2.tek., 5. Supernova 2.tek., 6. Yaltinski 1.tek., 7. Araban 10 3.tek., 8. Yavuzeli 26 3.tek., 9. Yavuzeli 28 3.tek., 10. *A.arabica* 1. tek., 11. Araban 126 3.tek., 12. Guara 3.tek., 13. Araban 95 1.tek., 14. Yavuzeli 28 2.tek., 15. Yavuzeli 19 3.tek., 16. Araban 96 2.tek., 17. Moncayo 2.tek., 18. Araban 125 1.tek., 19. Yavuzeli 102 3.tek., 20. Araban 94 3.tek., 21. Yavuzeli 29 3. tek., 22. *A.arabica* 2.tek., 23. Araban 129 1.tek., 24. Yavuzeli 29 2.tek., 25. Araban 146 1.tek., 26. *A.orientalis* 1. tek., 27. Yavuzeli 102 1.tek., 28. Nonpareil 1. tek., 29. Yavuzeli 51 2. tek., 30. Gülcan 2 2. tek., 31. Supernova 1. tek., 32. Yavuzeli 29 1. tek., 33. Yavuzeli 103 1.tek., 34. *A.orientalis* 2. tek., 35. Primorski 1. tek., 36. Araban 10 2. tek., 37. Yavuzeli 51 1.tek., 38. Araban 164 3. tek., 39. Teksas 1. tek., 40. Bozkurt 1. tek., 41. Hacıalibey 3. tek., 42. Teksas 3. tek., 43. Ne Plus Ultra 3. tek., 44. Nonpareil 3. tek., 45. Ne Plus Ultra 1. tek., 46. Gülcan 2 1. tek., 47. Guara 1. tek., 48. Ne Plus Ultra 2. tek., 49. Yavuzeli 24 1.tek., 50. Araban 129 2. tek., 51. Primorski 3.tek., 52. *A.arabica* 3. tek., 53. Araban 164 2. tek., 54. Yavuzeli 19 1.tek., 55. Araban 126 2.tek., 56. Yavuzeli 103 2.tek., 57. Yavuzeli 24 3.tek., 58. 17-4 2. tek., 59. Araban 126 1. tek., 60. Araban 136 2. tek., 61. Araban 95 2.tek., 62. Nonpareil 2. tek., 63. Primorski 2.tek., 64. Yavuzeli 51 3.tek., 65. Hacıalibey 1.tek., 66. Araban 125 3.tek., 67. *A.webbii* 1. tek., 68. Yavuzeli 28 1.tek., 69. Araban 146 2.tek., 70. Halitbey 2.tek., 71. Araban 94 2.tek., 72. *A.webbii* 3. tek., 73. 17-4 3.tek., 74. Yavuzeli 26 1.tek., 75. Bozkurt 3.tek., 76. Akbadem 1.tek., 77. Araban 125 2. tek., 78. Araban 164 1.tek., 79. Yavuzeli 102 2.tek., 80. Gülcan 1 3.tek., 81. Araban 136 1.tek., 82. *A.webbii* 2. tek., 83. Ferraduel 2.tek., 84. Teksas 2.tek., 85. Hacıalibey 2.tek., 86. Yavuzeli 26 2.tek., 87. Yavuzeli 19 2.tek., 88. Araban 10 1.tek., 89. Yavuzeli 24 2.tek., 90. Araban 17 1.tek., 91. Araban 96 3.tek., 92. Araban 95 3.tek., 93. Moncayo 1.tek., 94. 48-1-1.tek., 95. Gülcan 2 3.tek., 96. Araban 96 1.tek., 97. Araban 17 2.tek., 98. Araban 94 1.tek., 99. *A.orientalis* 3.tek., 100. Supernova 3.tek.

RNA spektrofotometrik ölçümleri sonuçlarında (Çizelge 4.9) RNA konsantrasyonlarının 22,03 ile 495,56 ng/µl aralığında değiştiği görülmektedir. RNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri (Şekil 4.15) ve RNA spektrofotometrik değerleri (Çizelge 4.9) cDNA sentezi için yeterli (degrede olmaması, smear görüntü olmaması, çift bant görülmesi gibi) bulunmaktadır.

Çizelge 4.9 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
76	Akbadem-1. tek	381,10	9,528	4,325	2,20
4	Akbadem-2. tek	52,61	1,315	0,584	2,25
*	Akbadem-3. tek.	317,96	7,949	3,947	2,01
10	<i>Amygdalus arabica</i> -1. tek.	50,40	0,135	0,067	2,03
22	<i>Amygdalus arabica</i> -2. tek	70,79	0,195	0,071	2,74
52	<i>Amygdalus arabica</i> -3. tek	301,63	7,541	3,459	2,18
26	<i>Amygdalus orientalis</i> -1. tek	59,96	1,499	0,640	2,34
34	<i>Amygdalus orientalis</i> -2. tek	44,18	1,105	0,493	2,24
99	<i>Amygdalus orientalis</i> -3. tek	22,03	0,551	0,262	2,10
67	<i>Amygdalus webbii</i> 1. tek.	285,9	7,147	3,183	2,25
82	<i>Amygdalus webbii</i> -2. tek	157,98	3,949	1,800	2,19
72	<i>Amygdalus webbii</i> -3. tek.	226,5	5,663	2,527	2,24
88	Araban 10-1. tek	531,10	13,277	5,834	2,28
36	Araban 10-2. tek	138,75	3,469	1,592	2,18
7	Araban 10-3. tek	34,49	0,862	0,380	2,27
90	Araban 17-1. tek	34,97	0,874	0,402	2,17
97	Araban 17-2. tek	238,02	5,950	2,683	2,22
*	Araban 17-3. tek	271,44	41,429	21,923	1,89
98	Araban 94-1. tek	108,38	2,709	1,251	2,17
71	Araban 94-2. tek	36,25	0,906	0,401	2,26
20	Araban 94-3. tek	243,21	6,080	2,714	2,24
13	Araban 95-1. tek	150,49	3,762	1,680	2,24
61	Araban 95-2. tek	30,35	0,759	0,333	2,28
92	Araban 95-3. tek	55,54	1,389	0,645	2,15
96	Araban 96-1. tek	154,16	3,854	1,779	2,17
16	Araban 96-2. tek	133,30	3,332	1,472	2,26
91	Araban 96-3. tek	73,18	1,829	0,844	2,17
18	Araban 125-1. tek	307,39	7,685	3,448	2,23
77	Araban 125-2. tek	254,61	6,365	2,919	2,18
66	Araban 125-3. tek	336,22	8,406	3,803	2,21
59	Araban 126-1. tek	130,04	3,251	1,431	2,27
55	Araban 126-2. tek	202,85	5,071	2,310	2,20

Çizelge 4.9 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
11	Araban 126-3. tek	435,72	10,893	5,006	2,18
23	Araban 129-1. tek.	189,96	4,749	2,116	2,24
50	Araban 129-2. tek.	315,16	7,879	3,590	2,19
*	Araban 129-3. tek	484,24	4,606	2,334	1,97
81	Araban 136-1. tek	156,01	3,900	1,766	2,21
60	Araban 136-2. tek	159,20	3,980	1,766	2,25
*	Araban 136-3. tek	328,36	8,209	3,958	2,07
25	Araban 146-1. tek	108,35	2,709	1,224	2,21
69	Araban 146-2. tek	36,29	0,907	0,414	2,19
*	Araban 146-3. tek	356,53	8,913	4,39	2,03
78	Araban 164-1. tek.	82,90	2,072	0,965	2,15
53	Araban 164-2. tek.	96,65	2,416	1,104	2,19
38	Araban 164-3. tek	227,04	5,676	2,557	2,22
40	Bozkurt-1. tek	160,53	4,013	1,805	2,22
*	Bozkurt-2. tek.	385,93	2,148	1,046	2,05
75	Bozkurt-3. tek	373,01	9,325	4,218	2,21
*	Ferraduel-1.tek.	210,90	24,218	10,951	2,21
83	Ferraduel-2. tek.	183,91	4,598	2,09	2,20
*	Ferraduel-3. tek.	310,17	26,203	11,813	2,22
47	Guara-1. tek.	210,69	5,267	2,412	2,18
3	Guara-2. tek.	117,24	0,431	0,180	2,39
12	Guara-3. tek.	212,41	5,310	2,362	2,25
80	Gülcan 1-3. tek.	287,81	7,195	3,243	2,22
46	Gülcan 2-1. tek.	128,13	3,203	1,463	2,19
30	Gülcan 2-2. tek.	126,37	3,159	1,409	2,24
95	Gülcan 2-3. tek.	79,14	1,979	0,913	2,17
65	Hacılibey-1. tek.	495,56	12,389	5,649	2,19
85	Hacılibey-2. tek.	208,48	5,212	2,345	2,22
41	Hacılibey-3. tek.	25,36	0,634	0,310	2,04
2	Halitbey-1. tek	161,19	4,030	1,761	2,29
70	Halitbey-2. tek	88,62	2,216	0,984	2,25
*	Halitbey-3. tek.	292,16	45,843	24,341	1,88
93	Moncayo-1. tek	166,96	4,174	1,872	2,23
17	Moncayo-2. tek.	102,42	2,561	1,128	2,27
*	Moncayo 3. tek.	385,82	9,645	4,485	2,15
45	Ne Plus Ultra-1. tek.	191,13	4,778	2,182	2,19
48	Ne Plus Ultra-2. tek.	293,51	7,338	3,333	2,20
43	Ne Plus Ultra-3. tek.	98,41	2,460	1,134	2,17
28	Nonpareil-1. tek.	75,63	1,891	0,814	2,32
62	Nonpareil-2. tek.	20,93	0,523	0,233	2,24
44	Nonpareil-3. tek.	29,58	0,740	0,353	2,09

Çizelge 4.9 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
35	Primorski-1. tek.	31,26	0,782	0,359	2,18
63	Primorski-2. tek.	101,43	2,536	1,102	2,30
51	Primorski-3. tek	38,95	0,974	0,452	2,15
31	Supernova-1. tek.	120,68	3,017	1,335	2,26
5	Supernova-2. tek.	60,14	1,503	0,865	1,74
100	Supernova-3. tek.	95,01	2,375	1,071	2,22
39	Teksas-1. tek.	222,53	5,563	2,509	2,22
84	Teksas-2. tek.	141,71	3,543	1,603	2,21
42	Teksas-3. tek.	173,54	4,339	1,948	2,23
6	Yaltinski-1. tek.	48,35	1,209	0,565	2,14
1	Yaltinski-2. tek.	61,81	1,545	0,676	2,29
*	Yaltinski-3. tek.	87,46	1,353	0,642	2,11
54	Yavuzeli 19-1. tek	75,32	1,883	0,895	2,10
87	Yavuzeli 19-2. tek.	109,04	2,726	1,227	2,22
15	Yavuzeli 19-3. tek.	95,09	2,377	1,136	2,09
49	Yavuzeli 24-1. tek.	112,71	2,818	1,279	2,20
89	Yavuzeli 24-2. tek.	54,14	1,353	0,642	2,11
57	Yavuzeli 24-3. tek.	196,26	4,906	2,166	2,26
74	Yavuzeli 26-1. tek.	111,65	2,791	1,238	2,25
86	Yavuzeli 26-2. tek.	95,92	2,398	1,101	2,18
8	Yavuzeli 26-3. tek.	314,45	7,861	3,575	2,20
68	Yavuzeli 28-1. tek.	254,58	6,365	2,855	2,23
14	Yavuzeli 28-2. tek.	155,15	3,879	1,766	2,20
9	Yavuzeli 28-3. tek.	244,76	6,119	2,838	2,16
32	Yavuzeli 29-1. tek.	137,57	3,439	1,545	2,23
24	Yavuzeli 29-2. tek.	89,75	2,244	1,011	2,22
21	Yavuzeli 29-3. tek.	118,42	2,960	1,219	2,43
37	Yavuzeli 51-1. tek.	87,64	2,191	1,000	2,19
29	Yavuzeli 51-2. tek.	171,02	4,276	1,923	2,22
64	Yavuzeli 51-3. tek.	139,59	3,490	1,554	2,25
27	Yavuzeli 102-1. tek.	60,91	1,523	0,664	2,29
79	Yavuzeli 102-2. tek	219,68	5,492	2,494	2,20
19	Yavuzeli 102-3. tek	183,60	4,590	2,037	2,25
33	Yavuzeli 103-1. tek	152,23	3,806	1,718	2,21
56	Yavuzeli 103-2. tek	49,61	1,240	0,552	2,25
*	Yavuzeli 103-3. tek.	176,24	3,879	1,766	2,20
*	17-4-1. tek.	487,39	12,185	5,817	2,09
58	17-4-2. tek.	103,00	2,575	1,136	2,27
73	17-4-3. tek.	266,33	6,658	3,016	2,21

Çizelge 4.9 Soğuk uygulamasına (6 saat) maruz kalan bazı örneklere ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri (tek:tekerrür) (devam)

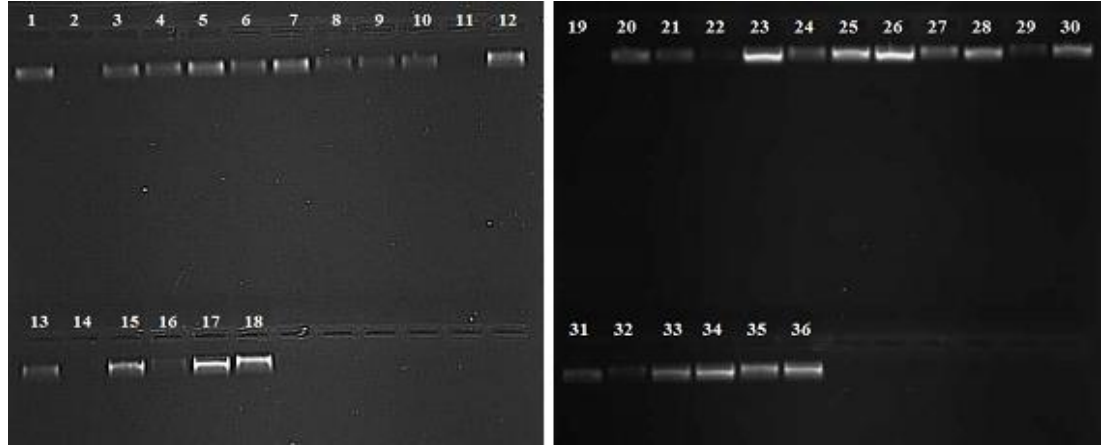
RNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
94	48-1-1. tek.	120,88	3,022	1,379	2,19
*	48-2-2. tek.	156,45	2,960	1,219	2,43
*	48-3-3. tek.	134,15	3,439	1,545	2,23
* Şekil 4.15'te yer almamaktadır.					

4.5 cDNAsentezi

Real time uygulamaları öncesi tüm uygulamalar için örneklere ait RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır.

4.5.1 Geç çiçeklenme değerlendirme kontrol örneklerinde cDNA sentezi

Geç çiçeklenme değerlendirme kontrol örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri Şekil 4.16'da verilmektedir.



Şekil 4.16 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı kontrol örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri

1.Garrigues, 2. Yaltinski, 3. Moncayo, 4. Nurlu, 5. 17-4, 6. Teksas, 7. *A.webbii*, 8. Hacılibey, 9. Ne Plus Ultra, 10. Bozkurt, 11. Nonpareil, 12. Halitbey, 13. *A.arabica*, 14. Akbadem, 15. Ferraduel, 16. Guara, 17. Supernova, 18. 48-1, 19. Yavuzeli 102, 20. Araban 146, 21. Araban 96, 22. Araban 136,23. Araban 10, 24. Yavuzeli 28, 25. Yavuzeli 29, 26. Araban 17, 27. Araban 95, 28. Araban 125, 29. Yavuzeli 102, 30. Yavuzeli 26, 31. Araban 94, 32. Yavuzeli 24, 33. Yavuzeli 19, 34. Araban 126, 35. Yavuzeli 51, 36. Araban 164

Geç çiçeklenme değerlendirmesi kontrol örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.10'da verilmektedir.

Çizelge 4.10 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı kontrol örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri

cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/ul)	A260	A280	Saflık 260/280
1	Garrigues	2226,71	44,534	23,864	1,87
2	Yaltinski	1932,72	38,654	21,017	1,84
3	Moncayo	2067,88	41,358	22,533	1,84
4	Nurlu	2295,72	45,914	24,840	1,85
5	17-4	2148,39	42,968	23,100	1,86
6	Teksas	1964,63	39,293	21,216	1,85
7	<i>Amygdalus webbii</i>	1955,38	39,108	20,958	1,87
8	Hacılibey	1986,95	39,739	21,688	1,83
9	Ne Plus Ultra	1935,20	38,704	21,111	1,83
10	Bozkurt	2155,04	43,101	23,414	1,84

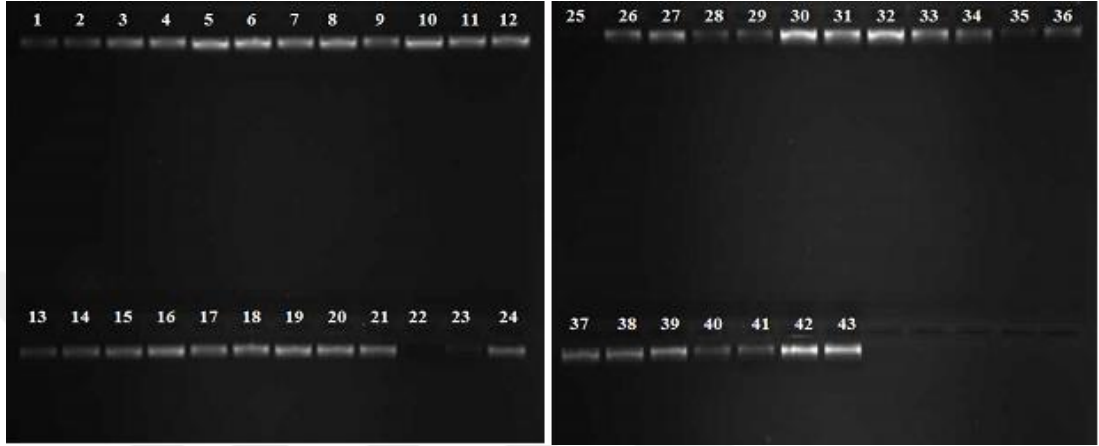
Çizelge 4.10 Geç çiçeklenme değerlendirmesi bazı kontrol örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri (devam)

cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
11	Nonpareil	1926,66	38,533	20,964	1,84
12	Halitbey	2168,85	43,377	23,290	1,86
13	<i>Amygdalus arabica</i>	2027,99	40,560	21,902	1,85
14	Akbadem	2091,84	41,837	22,404	1,87
15	Ferraduel	2053,55	41,071	22,051	1,86
16	Guara	2285,11	45,702	24,861	1,84
17	Supernova	2184,01	43,680	23,541	1,86
18	48-1	2320,23	46,405	25,112	1,85
19	Yavuzeli 102	2286,67	45,733	25,104	1,82
20	Araban 146	1913,21	38,264	20,754	1,84
21	Araban 96	2102,21	42,044	22,698	1,85
22	Araban 136	2011,79	40,236	21,796	1,85
23	Araban 10	2612,63	52,253	27,805	1,88
24	Yavuzeli 28	2163,77	43,275	23,623	1,83
25	Yavuzeli 29	2235,99	44,720	24,042	1,86
26	Araban 17	2529,41	50,588	26,823	1,89
27	Araban 95	2169,86	43,397	23,388	1,86
28	Araban 125	2181,46	43,629	23,498	1,86
29	Yavuzeli 103	2126,96	42,539	22,951	1,85
30	Yavuzeli 26	2153,61	43,072	23,112	1,86
31	Araban 94	2247,10	44,942	24,396	1,84
32	Yavuzeli 24	1982,38	39,648	21,412	1,85
33	Yavuzeli 19	2373,74	47,475	25,599	1,85
34	Araban 126	2336,76	46,735	24,953	1,87
35	Yavuzeli 51	2136,73	42,735	22,987	1,86
36	Araban 164	2219,72	44,394	23,848	1,86

Bu sonuçlara göre, geç çiçeklenme değerlendirmesi kapsamında kontrol örneklerinden sentezlenen cDNA'lar, kullanılan cDNA kitinin etkinliği kapsamında yaklaşık olarak 2000 ng/µl olarak belirlenmiş, Real time uygulamaları için yeterli miktar ve kalitede bulunmuştur (Çizelge 4.10).

4.5.2 Geç çiçeklenme değerlendirilmesi stres örneklerinde cDNA sentezi

Geç çiçeklenme değerlendirilmesi stres örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri Şekil 4.17'de verilmektedir.



Şekil 4.17 Geç çiçeklenme değerlendirilmesi stres örneklerine ait cDNA'ların agaroz jel (% 1) elektroforez görüntüleri

1. Araban 164, 2. Yavuzeli 26, 3. Yavuzeli 103, 4. Yavuzeli 28, 5. Araban 95, 6. Araban 125, 7. Yavuzeli 51, 8. Araban 129, 9. Yavuzeli 19, 10. Araban 126, 11. Yavuzeli 24, 12. Araban 94, 13. Araban 17, 14. Yavuzeli 29, 15. Araban 10, 16. Araban 136, 17. Araban 96, 18. Araban 146, 19. Yavuzeli 102, 20. *A.webbii*, 21. 17-4, 22. *A.orientalis*, 23. Hacıalibey, 24. Ne Plus Ultra, 25. Bertina, 26. Nurlu, 27. Ferragnes, 28. Primorski, 29. Guara, 30. Gülcan 1, 31. Garrigues, 32. Teksas, 33. Ferraduel, 34. Supernova, 35. Akbadem, 36. Gülcan 2, 37. Yaltinski, 38. *A.arabica*, 39. Halitbey, 40. Moncayo, 41. Nonpareil, 42. Bozkurt, 43. 48

Geç çiçeklenme değerlendirilmesi stres örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.11'de verilmektedir.

Çizelge 4.11 Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri

cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
1	Araban 164	2374,22	47,484	25,628	1,85
2	Yavuzeli 26	2523,78	50,476	27,082	1,86
3	Yavuzeli 103	2250,45	45,009	24,188	1,86
4	Yavuzeli 28	2198,52	43,970	23,501	1,87
5	Araban 95	2402,76	48,055	25,533	1,88
6	Araban 125	2214,00	44,280	23,557	1,88
7	Yavuzeli 51	2149,38	42,988	23,068	1,86
8	Araban 129	2319,18	46,384	24,696	1,88
9	Yavuzeli 19	2101,16	42,023	22,549	1,86
10	Araban 126	2334,08	48,682	25,894	1,88
11	Yavuzeli 24	2245,28	44,906	23,923	1,88
12	Araban 94	2202,83	44,057	23,430	1,88
13	Araban 17	2154,46	43,089	23,089	1,87
14	Yavuzeli 29	2254,13	45,083	24,110	1,87
15	Araban 10	2260,54	45,211	24,249	1,86
16	Araban 136	2187,49	43,750	23,401	1,87
17	Araban 96	2031,18	40,624	21,874	1,86
18	Araban 146	2112,75	42,255	22,730	1,86
19	Yavuzeli 102	2188,34	43,767	23,458	1,87
20	<i>Amygdalus webbii</i>	2369,99	47,400	25,744	1,84
21	17-4	2188,79	43,776	23,467	1,87
22	<i>Amygdalus orientalis</i>	2056,83	41,137	22,685	1,81
23	Hacıalibey	2338,62	46,772	25,212	1,86
24	Ne Plus Ultra	2012,28	40,246	21,835	1,84
25	Bertina	1919,13	38,383	20,552	1,87
26	Nurlu	2014,96	40,299	21,491	1,88
27	Ferragnes	2082,49	41,650	22,214	1,87
28	Primorski	2079,82	41,596	22,495	1,85
29	Guara	2046,51	40,930	22,216	1,84
30	Gülcan 1	2117,30	42,346	22,679	1,87
31	Garrigues	2078,62	41,572	22,297	1,86
32	Teksas	2142,38	42,848	23,384	1,83
33	Ferraduel	2100,19	42,004	22,584	1,86
34	Supernova	2091,33	41,827	23,237	1,80
35	Akbadem	2128,46	42,569	23,112	1,84
36	Gülcan 2	2001,44	40,029	21,669	1,85
37	Yaltinski	2169,03	43,381	23,304	1,86
38	<i>Amygdalus arabica</i>	2074,32	41,486	22,335	1,86

Çizelge 4.11 Geç çiçeklenme değerlendirmesi stres örneklerine ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri (devam)

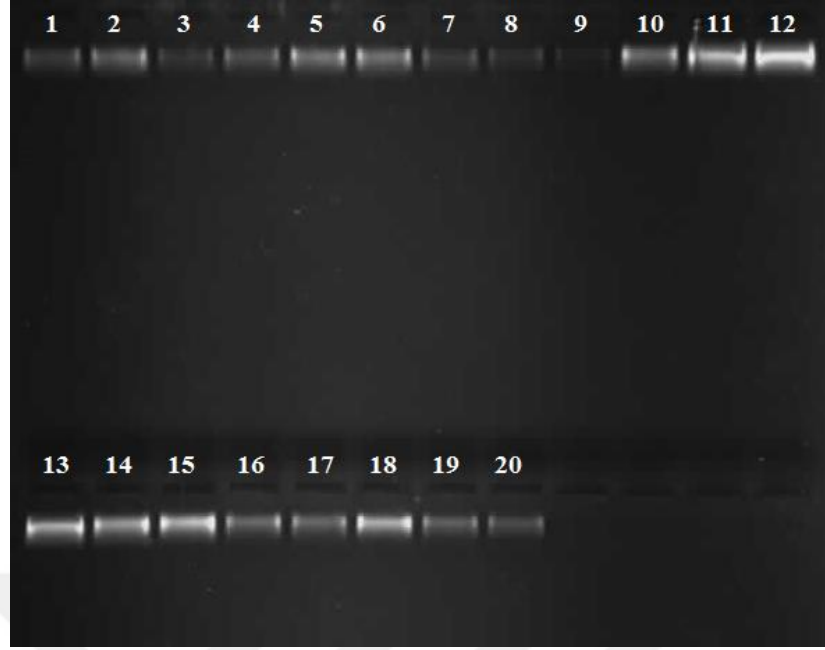
cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
39	Halitbey	2136,49	42,730	22,954	1,86
40	Moncayo	1933,33	38,667	21,350	1,81
41	Nonpareil	1907,59	38,152	20,919	1,82
42	Bozkurt	2061,26	41,225	22,776	1,81
43	48-1	2090,44	41,809	22,463	1,86

cDNA sentezinin kontrolü amacıyla cDNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. cDNA örneklerine ait bu konsantrasyon değerleri aynı zamanda da Real Time PCR reaksiyonlarında cDNA örneklerinin tümünün aynı konsantrasyonda seyreltilmesi bakımından da büyük önem taşımaktadır.

Sentezi gerçekleştirilen cDNA'ların safılık (A260/A280) değerlerinin 1.8 ile 2.1 arasında olduğu gözlemlenirken, konsantrasyonlarının ise yaklaşık 2000 ng/µl civarında olduğu görülmektedir (Çizelge 4.10-11). Bu sonuçlara göre, geç çiçeklenme değerlendirmesi kapsamında stres örneklerinden sentezlenen cDNA'lar realtime uygulamaları için yeterli bulunmuştur. Agaroz jel (% 1) elektroforezindeki cDNA görüntülerinin her örnekte küt uçlu tek bant olarak görülmesi bu durumu destekler niteliktedir (Şekil 4.17).

4.5.3 Soğuğa tolerans uygulamasına ilişkin cDNA sentezi

Soğuğa tolerans ile ilişkili olarak referans çeşitlerin (Ferragnes, Bertina, Nurlu, 48-1) pembe tomurcuk safhasındaki örneklerinde cDNA sentezi görüntüsü Şekil 4.18'de verilmektedir.



Şekil 4.18 Soğuğa tolerans ile ilişkili olarak referans çeşitlerin (Ferragnes, Bertina, Nurlu, 48-1) pembe tomurcuk safhasındaki örneklerinde cDNA sentezi görüntüsü

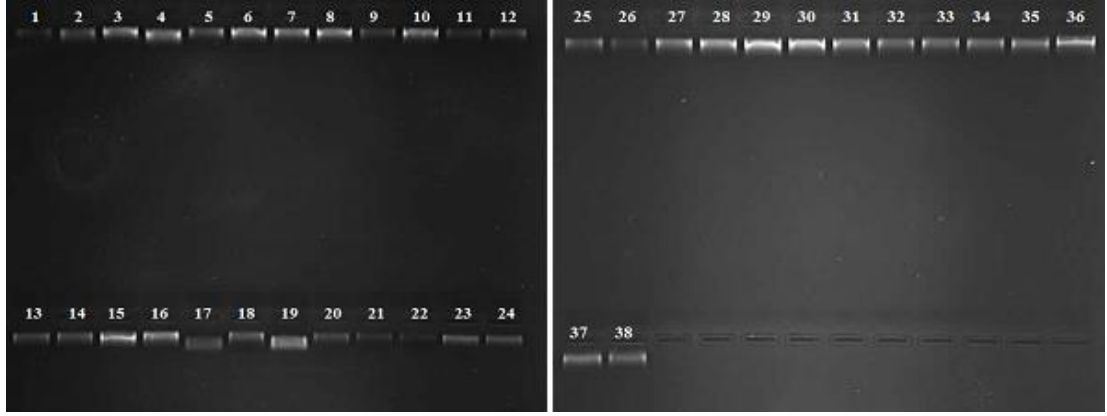
1. 48-1 1. saat, 2. 48-1 1.5 saat, 3. 48-1 3. saat, 4. 48-1 6. saat, 5. 48-1 12. saat,
6. Bertina 1.saat, 7. Bertina 1.5 saat, 8. Bertina 3. saat, 9. Bertina 6. saat,
10. Bertina 12. saat, 11. Nurlu 1. saat, 12. Nurlu 1.5 saat, 13. Nurlu 3. saat,
14. Nurlu 6. saat, 15. Nurlu 12. saat, 16. Ferragnes 1. saat, 17. Ferragnes 1.5 saat,
18. Ferragnes 3. saat, 19. Ferragnes 6. saat, 20. Ferragnes 12. saat

Soğuk uygulaması ile ilişkili olarak referans çeşitlere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.12'de verilmektedir.

Çizelge 4.12 Soğuk uygulaması ile ilişkili olarak referans çeşitlere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri

cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
1	48-1 1. saat	2078,43	41,569	22,655	1,83
2	48-1 1.5. saat	1932,21	38,644	20,771	1,86
3	48-1 3. saat	2062,04	41,241	22,645	1,82
4	48-1 6. saat	2048,60	40,972	22,154	1,85
5	48-1 12. saat	1991,53	39,831	21,448	1,86
6	Bertina 1. saat	1998,79	39,976	21,499	1,86
7	Bertina 1.5. saat	1970,94	39,419	21,373	1,84
8	Bertina 3. saat	1927,86	38,557	20,814	1,85
9	Bertina 6. saat	2007,10	40,142	21,695	1,85
10	Bertina 12. saat	2255,88	45,118	24,145	1,87
11	Nurlu 1. saat	2306,49	46,130	24,527	1,88
12	Nurlu 1.5 saat	2427,55	48,551	25,997	1,87
13	Nurlu 3. saat	2273,76	45,475	24,428	1,86
14	Nurlu 6. saat	2147,87	42,957	23,343	1,84
15	Nurlu 12. saat	2177,32	43,546	23,384	1,86
16	Ferragnes 1. saat	2124,01	42,480	23,590	1,80
17	Ferragnes 1.5. saat	2101,37	42,027	23,156	1,81
18	Ferragnes 3. saat	2031,84	40,637	23,156	1,81
19	Ferragnes 6. saat	2016,22	40,324	22,010	1,83
20	Ferragnes 12. saat	2110,41	42,208	23,366	1,81

Sentezi gerçekleştirilen soğuk uygulaması ile ilişkili olarak referans çeşitlere ait cDNA'ların geç çiçeklenmenin değerlendirilmesi kapsamında sentezlenen cDNA'lara benzer olarak safılık (A260/A280) değerlerinin 1.8 ile 2.1 arasında olduğu gözlemlenirken, konsantrasyonlarının ise 1900-2000 ng/µl civarında olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12). Bu sonuçlara göre, soğuk uygulaması kapsamında referans çeşitlerden sentezlenen cDNA'ların agaroz jel elektroforezinde (% 1) görüntüsü, cDNA'ların realtime uygulamaları için yeterli miktarda ve kalitede bulunduğunu desteklemektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.19 Soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin bazı genotiplerin agaroz jel elektroforezinde (% 1) cDNA görüntüsü

1. Yaltinski, 2. Halitbey, 3. Guara, 4. Akbadem, 5. Supernova, 6. Araban 10, 7. Yavuzeli 26, 8. Yavuzeli 28, 9. *A.arabica*, 10. Araban 126, 11. Araban 95, 12. Yavuzeli 19, 13. Araban 96, 14. Moncayo, 15. Araban 125, 16. Yavuzeli 102, 17. Araban 94, 18. Yavuzeli 29, 19. Araban 129, 20. Araban 146, 21. *A.orientalis*, 22. Nonpareil, 23. Yavuzeli 51, 24. Gülcan 2, 25. Yavuzeli 103, 26. Primorski, 27. Araban 164, 28. Teksas, 29. Bozkurt, 30. Hacıalibey, 31. Ne Plus Ultra, 32. Yavuzeli 24, 33. 17-4, 34. Araban 136, 35. *A.webbii*, 36. Gülcan 1, 37. Ferraduel, 38. Araban 17

Soğuk uygulamasına (6. saat) ilişkin genotiplere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.13'te verilmektedir.

Çizelge 4.13 Soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin bazı genotiplere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri

cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Saflık 260/280
1	Yaltinski	1939,09	38,782	20,839	1,86
2	Halitbey	2045,06	40,901	21,825	1,87
3	Guara	2128,43	42,569	22,669	1,88
4	Akbadem	2057,56	41,151	22,048	1,87
5	Supernova	2024,50	40,490	21,725	1,86
6	Araban 10	2184,04	43,681	23,261	1,88
7	Yavuzeli 26	2091,19	41,824	22,413	1,87
8	Yavuzeli 28	2066,28	41,326	22,268	1,86
9	<i>Amygdalus arabica</i>	1949,66	38,993	21,152	1,84
10	Araban 126	2105,51	42,110	22,531	1,87
11	Araban 95	1975,56	39,511	21,934	1,80

Çizelge 4.13 Soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin bazı genotiplere ait cDNA'ların spektrofotometrik değerleri (devam)

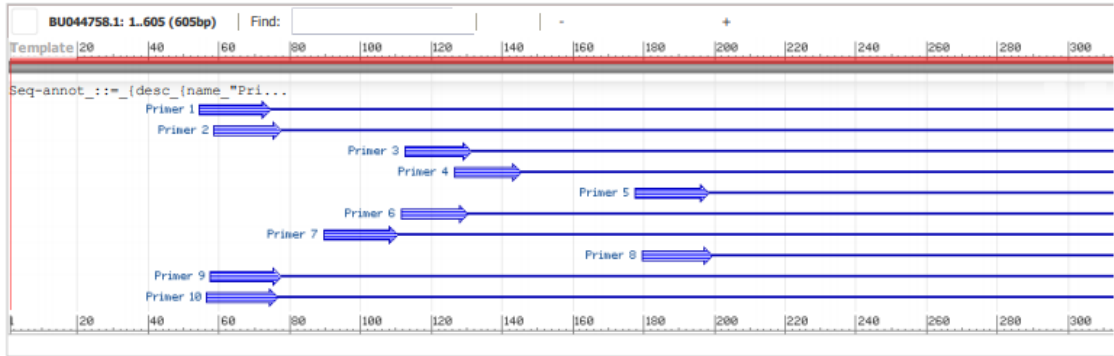
cDNA No	Tür / Çeşit / Genotip	Miktar (ng/µl)	A260	A280	Safılık 260/280
12	Yavuzeli 19	1912,83	38,257	20,675	1,85
13	Araban 96	1956,32	39,126	21,474	1,82
14	Moncayo	2095,08	41,902	22,572	1,86
15	Araban 125	2188,46	43,769	23,600	1,85
16	Yavuzeli 102	2055,94	41,119	21,973	1,87
17	Araban 94	2021,28	40,426	21,973	1,84
18	Yavuzeli 29	2064,59	41,294	22,431	1,84
19	Araban 129	2094,59	41,892	22,551	1,86
20	Araban 146	1941,95	38,839	21,281	1,83
21	<i>Amygdalus orientalis</i>	1926,46	38,529	20,811	1,85
22	Nonpareil	1893,56	37,871	20,710	1,83
23	Yavuzeli 51	1989,64	39,793	21,522	1,85
24	Gülcan 2	2048,42	40,968	22,114	1,85
25	Yavuzeli 103	2142,35	42,847	23,055	1,86
26	Primorski	2028,75	40,575	21,972	1,85
27	Araban 164	2120,43	42,409	22,815	1,86
28	Teksas	2098,96	41,979	22,462	1,87
29	Bozkurt	2343,79	46,876	25,058	1,87
30	Hacıalibey	2169,03	43,381	23,277	1,86
31	Ne Plus Ultra	2096,03	41,921	22,456	1,87
32	Yavuzeli 24	2147,68	42,954	23,08	1,86
33	17-4	2165,18	43,304	23,134	1,87
34	Araban 136	2207,95	44,159	23,774	1,86
35	<i>Amygdalus webbi</i>	2092,88	41,858	22,272	1,88
36	Gülcan1	2017,7	40,354	21,714	1,86
37	Ferraduel	2083,82	41,676	22,324	1,87
38	Araban 17	2155,36	43,107	23,009	1,87

Sentezi gerçekleştirilen soğuk uygulamasına (6.saat) ilişkin genotiplere ait cDNA'ların konsantrasyonlarının ise kullanılan cDNA kitinin etkinliği kapsamında yaklaşık olarak 2000 ng/µl olarak belirlenmiş (Çizelge 4.13), Real Time uygulamaları için yeterli miktar (ng/µl) ve kalitede bulunmuştur (Şekil 4.19).

4.6 Real Time PCR Uygulamaları

4.6.1 Aday genlere oluşturulacak primerler

Aday primerlerin primer dizaynı NCBI Blast yardımı ile Primer Designing Tool programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi öncesi aday genlere oluşturulan primerlerin dizaynına ilişkin örnek görüntü Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20 PpFT aday primer dizaynına ilişkin örnek görüntü

4.6.2 Kullanılan primerler

Geç çiçeklenme ile ilişkili PpFT ve PabSOC1, soğuğa toleransla ilişkili PdCBF1 ve PdCBF2 aday primerleri kullanılmıştır. Genlere ait dizayn edilen aday primer dizileri Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14 PCR'da çoğaltılan genlere ait dizayn edilen aday primer dizileri

Gen Kaynağı	Gen Adı Gen Bankası Kodu	Primer Adı	İleri (5'-3')	Gen bölgesinin uzunluğu (bp)
			Geri (5'-3')	
Şeftali	<i>Prunus persica</i> FT, BU044758.1	PpFT	CCAACGGTGGG GATTCATCG	415
			TGAAAGTGGAG ACGTACGGATG	
Kayısı	<i>Prunus armeniaca</i> SOC1, FJ472817.1	PabSOC1	TCGAGCATGCA GACAACCAT	242
			ACATTGCTCAC GCTCCTCTC	
Kontrol Gen	Housekeeping Actin, KT202283.1	PdAct	AGCGGGAAATT GTCCGTGAT	172
			AAGAGAACTTC TGGGCACCG	
Badem	<i>Prunus dulcis</i> CBF1, JQ317157.1	PdCBF1	ACCCTGTTTATA GGGGCGTG	188
			GGAGTCAGGGA AGTTGAGGC	
Badem	<i>Prunus dulcis</i> CBF2, JQ317158.1	PdCBF2	TTTCAAGGAGA CGAGGCACC	197
			CAAAGTTGAGG CAGGCAAGC	

4.6.3 Homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) PCR'da çoğaltılması

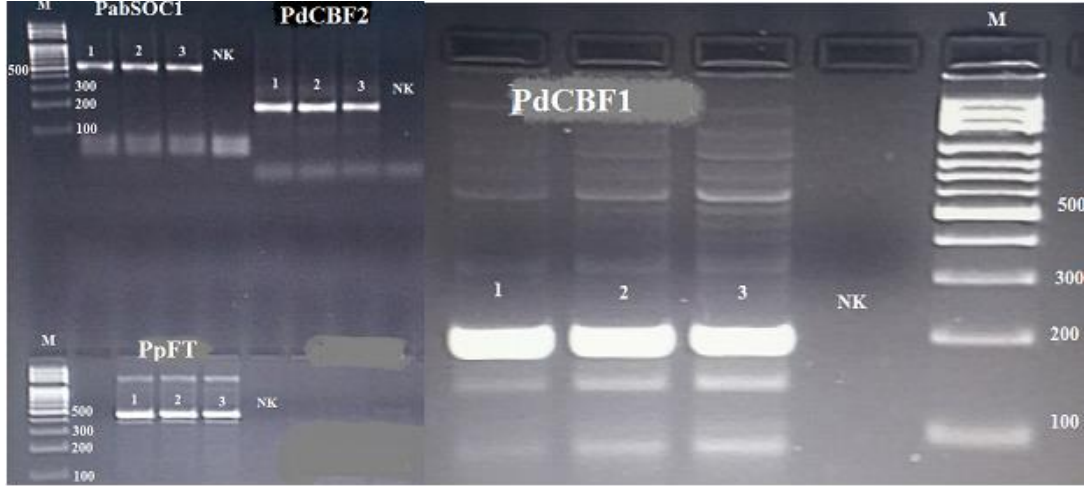
Çiçeklenme zamanıyla ilişkili, şeftaliden *PpFT*, kayısıdan *PabSOC1* ve bademden *PdAct*, soğuğa toleransla ilişkili bademden *PdCBF1* ve *PdCBF2* gen bölgelerine yönelik dizayn edilen primerler ile gerçekleştirilmiş olup, PCR ürünlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezinde yapılmıştır (Şekil 4.21)



Şekil 4.21 PCR’da çoğaltılan PdCBF2 aday primerine ilişkin % 2’lik agaroz jel elektroforezinde örnek görüntü (M: Markır)

4.6.4 PCR reaksiyonu sonrası homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) agaroz jel elektroforezi

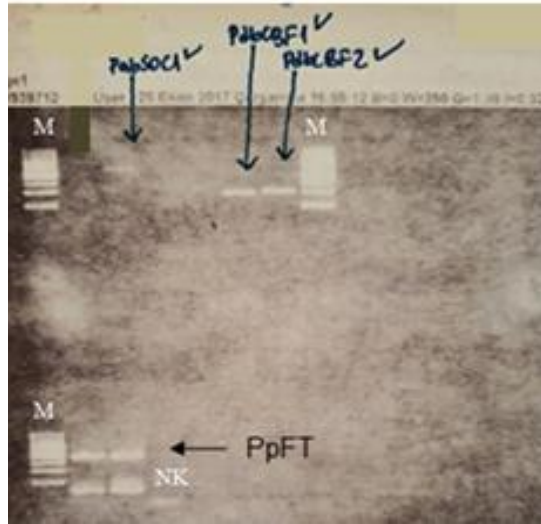
PCR ürünleri (25 µl) % 2’lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.22’de verilmektedir.



Şekil 4.22 Sırasıyla PabSOC1, PdCBF2, PpFT, PdCBF1 aday primerlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezinde PCR amplifikasyonları (M: Markır, NK: Negatif Kontrol)

4.6.5 PCR ürünlerinin pürifikasyonu

PCR ürünlerinin pürifikasyonu sonrasında saflaştırılmış PCR ürünleri % 1.5'luk agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.23'te ve Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre cihazı ölçüm sonuçları ise Çizelge 4.15'te verilmektedir.



Şekil 4.23 PabSOC1, PdCBF1, PdCBF2 ve PpFT aday primerinin pürifikasyonu sonrasında agaroz (% 1.5'luk) jel elektroforez örnek görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif Kontrol)

Çizelge 4.15 Pürifikasyon sonrası PCR ürünlerinin Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre cihazı ölçüm sonuçları

No	Aday Primer Adı	Miktar (ng/µl)	Saflık 260/280
1	PabSOC1	42.9	1.78
2	PpFT	60.2	1.81
3	PdCBF1	31.7	1.83
4	PdCBF2	30.7	1.85

Pürifikasyon sonrasında her bir aday primere ait PCR ürünleri dizi analizi yapılmak üzere hizmet alımı olarak ilgili firmaya (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara) gönderilmiştir. Aday primerlere ait dizi analizi sonuçları Şekil 4.24 ile Şekil 4.27 arasında verilmiştir.

```
TTTTTCGGCATTGGGTAGGCAACAGTGTATGCTCCGGGGTGGCGCCAAACTT
TAATACTAGAGACTTTGCGGAGCTTTACAATCTTGGATTACCGGTATCTGCC
GTCTATTTTAACTGCCAAAGGGAGAGCGGCTCTGGAGGAAGGAGAAGATAA
TTAAGTTTGATATTATTAAGCAGGTTATACTTGTAATATTATTGAGGAAGCT
AGTTAATCTATATATATATATAACGTGGAAACTAATAGTAATAATAATT
AGCTAGCTAGTGTAATCACTCTCCTACTAGCTAGCTAGTCCATGCCGTGGC
ACTAAGGCACTAGGGCACCAGGGCACCAGGGCACCAGGGCACCAGGGCACCAGGGAT
ATATGGTCGTGTGAGAGTACGACACTACGTCCCCACTTTCAAACCTTTCAAAC
C
```

Şekil 4.24 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait örnek dizi analiz sonucu

```
ACAAAAAGGACAACCATACCAACAACAATCCGTTTCCACTGACCAAATA
TGCAGGTGAATTCTTGAAACCATTACCTTTCTTCCAAAATTTGACTGGAGT
GAACTGGCCGCACATTTTGGACCCCTGAACTCTAAACAATCATATGAAAG
TGCATTAGATTTTTCTTCTTGGTTTTCTGATGAGTTTGCATTTGAATTGTT
GTGCAGCACCTGAAGCAAGAATCATCTAGCATGATGAAGCAGATAGAGCTT
CTTGAAGTATCAAACGGTTCATCTGAACTTTTCTTGTATCTTATAACACG
CCGTAGTTGAAATAGTATT
```

Şekil 4.25 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerine ait örnek dizi analiz sonucu

```
AAAGGAAGTGGGTGTGTGAATGAGAGAGCCCAAGAAGACGAAGTCCAGGA
TATGGCTCGGGACTTATCCGACGGCGGAGATGGCTGCTCGTGCCCATGACG
TGGCGGCATTGGCGTTTAGAGGGAAGCTTGCCTGCCTCAACTTCCCTGACTC
CACACCCCTATAA
```

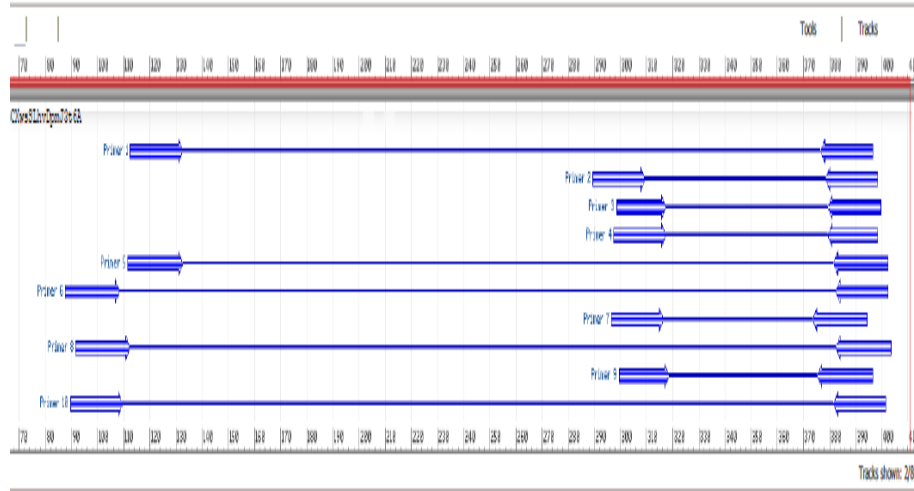
Şekil 4.26 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primerine ait örnek dizi analiz sonucu

```
ACAGTGGGTAGTGTGAGTNTGAGAGAGCCCAACACGAAGAAGTCCAGGAT
ATGGCTCGGGACGTTATCCGACGGCTGAGATGGCTGCTCGTGCCCATGACG
TGGCCGCATTGGCGTTTAGAGGGAAGCTTGCCTGCCTCAACTTTGA
```

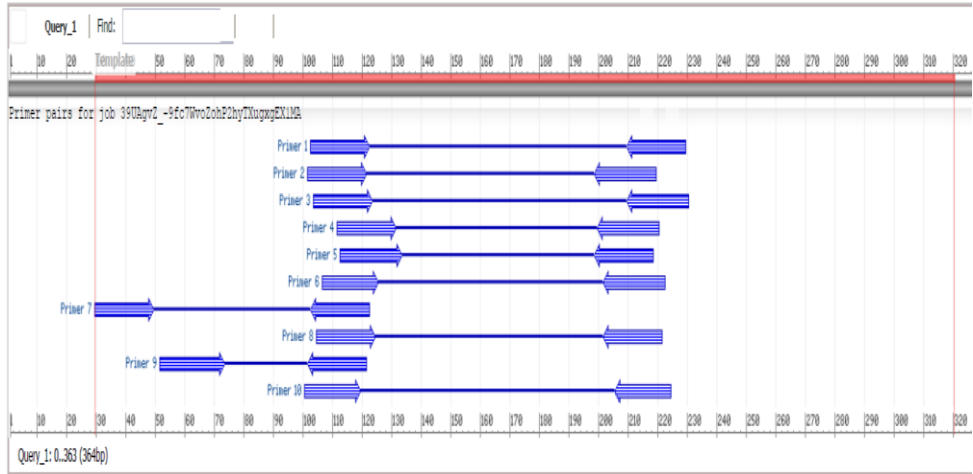
Şekil 4.27 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primerine ait örnek dizi analiz sonucu

4.6.6 Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik Real-time PCR primerlerinin oluşturulması

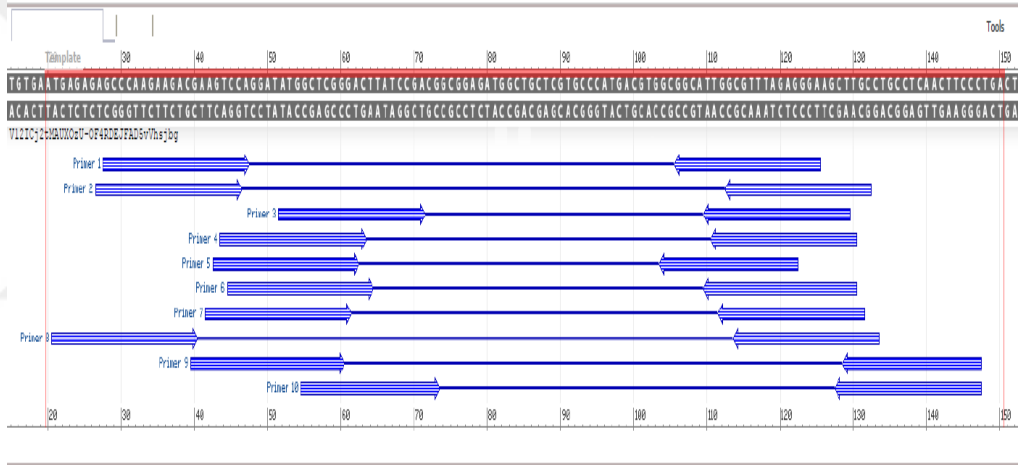
Primer dizaynı NCBI Blast yardımı ile Primer Designing Tool programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer tasarımına örnek görüntüler Şekil 4.28- 4.31’de verilmiştir.



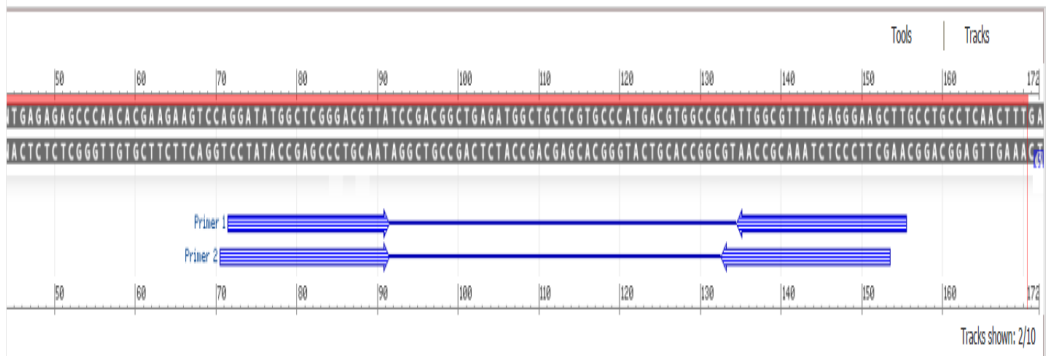
Şekil 4.28 Geç çiçeklenme - PpFT primer dizaynı



Şekil 4.29 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primer dizaynı



Şekil 4.30 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primer dizaynı



Şekil 4.31 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primer dizaynı

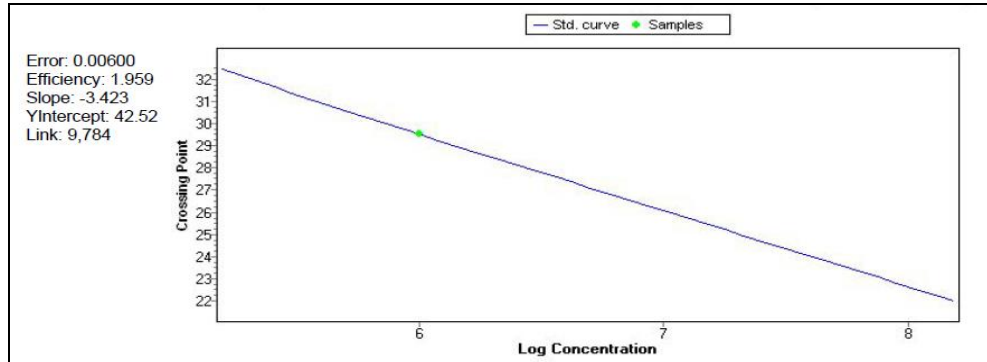
Dizi analizi sonucu badem spesifik oluşturulan Real-Time PCR primerlerine ait dizi bilgileri Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16 Real Time PCR’da kullanılan badem spesifik primerlere ait dizi bilgileri

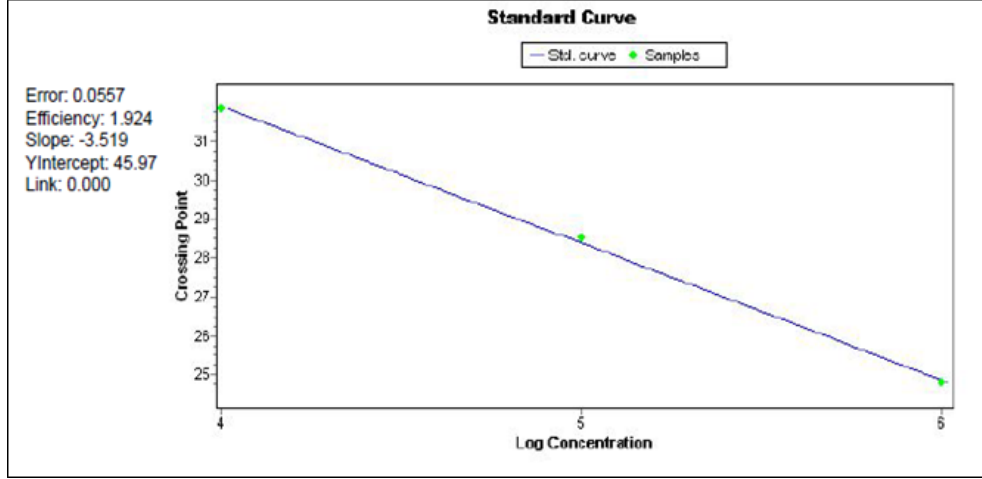
Primer Adı	İleri (5'-3')	Gen bölgesinin uzunluğu (bp)
	Geri (5'-3')	
PpFT	TAAGTCCCAAAGGGAGAGCG	284
	TGGGGACGTAGTGTCTACT	
PabSOC1	TGAAGTGGCCGCACATTTTG	127
	ATTCTTGCTTCAGGTGCTGC	
PdCBF1	GCTCGGGACTTATCCGACG	93
	GGGAAGTTGAGGCAGGCAAG	
PdCBF2	AGGATATGGCTCGGGACGTTA	83
	GCTTCCCTCTAAACGCCAATC	

4.6.7 Gen ifade analizleri için her bir gen bölgesine ait standart eğrinin çizilmesi

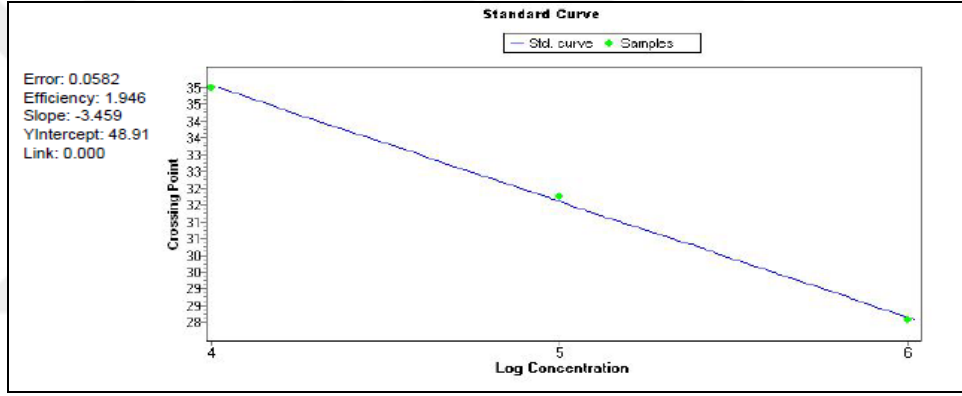
Gen ifade analizleri için geç çiçeklenme - PdActin primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.32’de, PpFT primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.33’te, PabSOC1 primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.34’de verilmektedir. Soğuk uygulaması - PdActin primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.35’te, PdCBF1 primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.36’da ve PdCBF2 primerine ait standart eğri grafiği Şekil 4.37’de verilmektedir. Her bir primere yönelik oluşturulan standart eğrilerin efficiency ve slope değerlerinin beklenen aralıklarda olduğu görülmektedir.



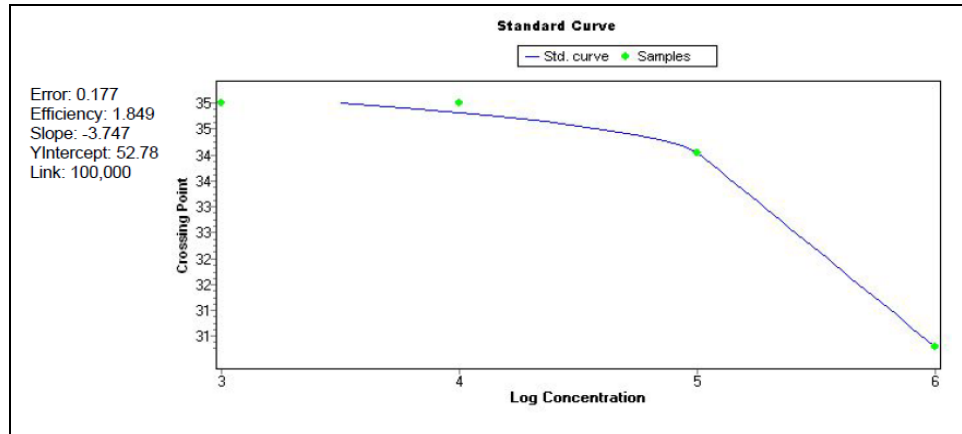
Şekil 4.32 Geç çiçeklenme - PdActin primerine ait standart eğri grafiği



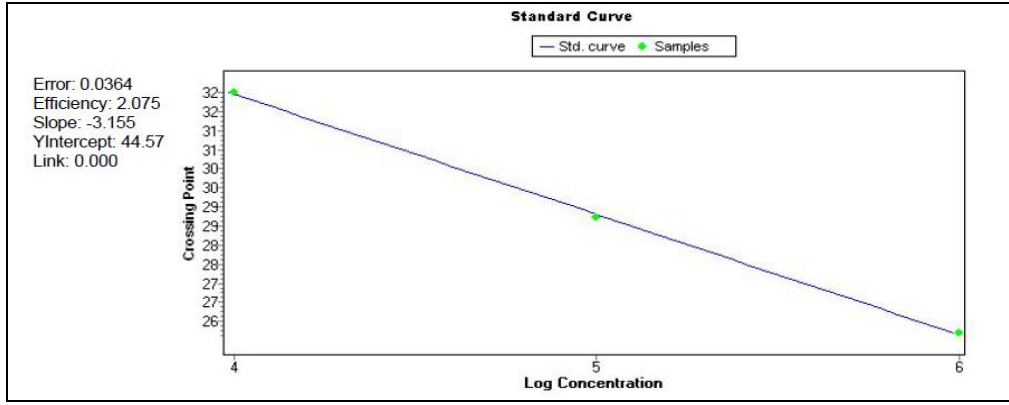
Şekil 4.33 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait standart eğri grafiği



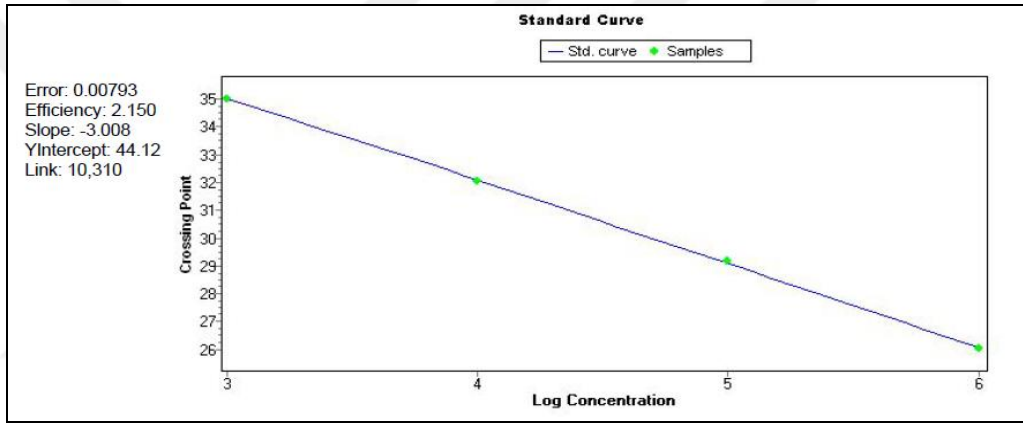
Şekil 4.34 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerine ait standart eğri grafiği



Şekil 4.35 Soğuk uygulaması - PdActin primerine ait standart eğri grafiği



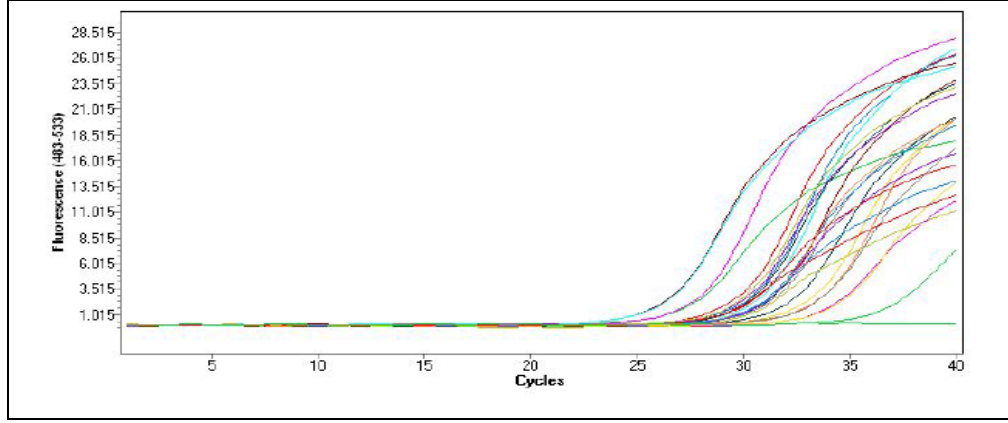
Şekil 4.36 Soğuk uygulaması - PdCBF1 primerine ait standart eğri grafiği



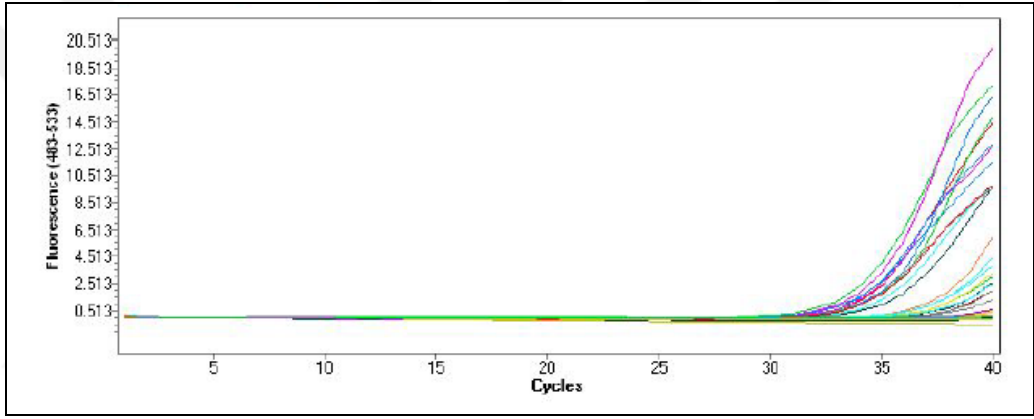
Şekil 4.37 Soğuk uygulaması - PdCBF2 primerine ait standart eğri grafiği

4.6.8 Amplifikasyon eğrisi

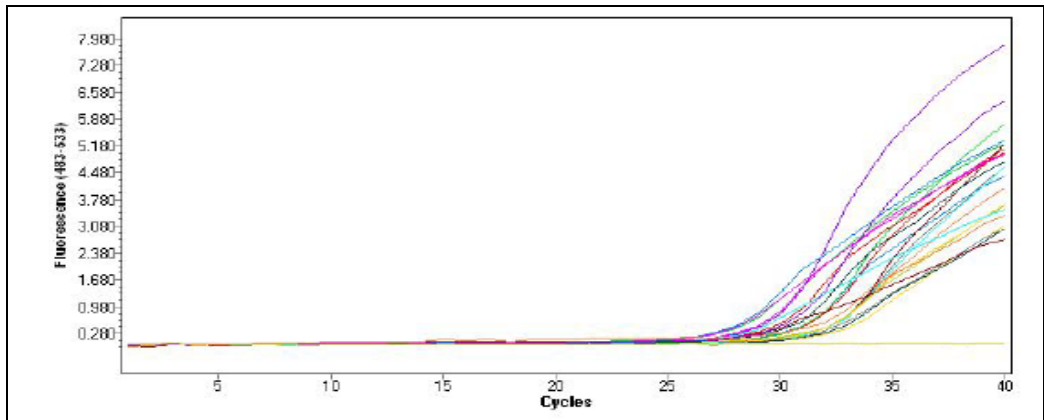
PdAct, PabSOC1, PpFT, PdCBF1 ve PdCBF2 primerlerine ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.38-4.43'te verilmektedir. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri genellikle 20. ve 35. döngüler arasında elde edilmiş olup, ideal sınırlar aralığındadır. Real Time PCR'da ilgili genin amplifiye olduğu anlamlı döngüler 20 ile 35. döngüler arasında olup, 35. döngü sonrasında elde edilen amplifikasyonlar genellikle anlamlı değildir. Bunun anlamı, 35. döngüden sonra cihazda görülen amplifikasyonlar genellikle özgün olmayan amplifikasyonlardır. Bu durumda, kullanılan primer cDNA dışında başka bir yere bağlanıyor olabilir olasılığı artmış olmaktadır.



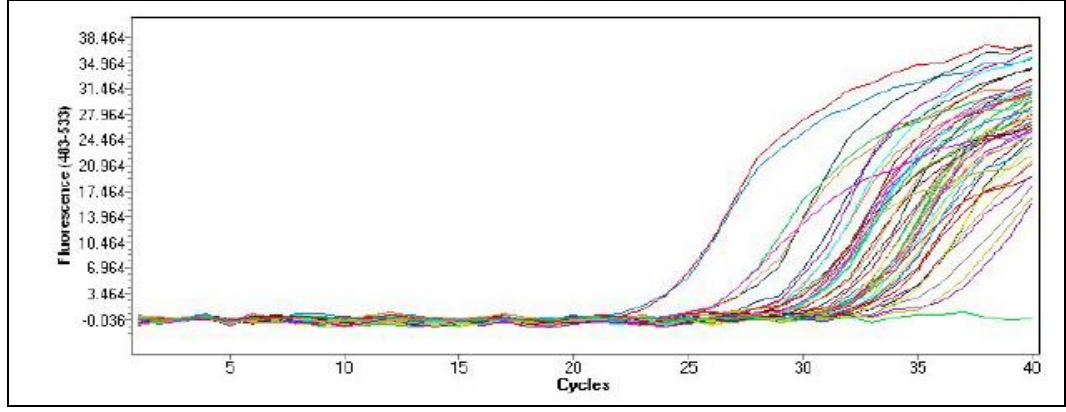
Şekil 4.38 Geç çiçeklenme - PdAct primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



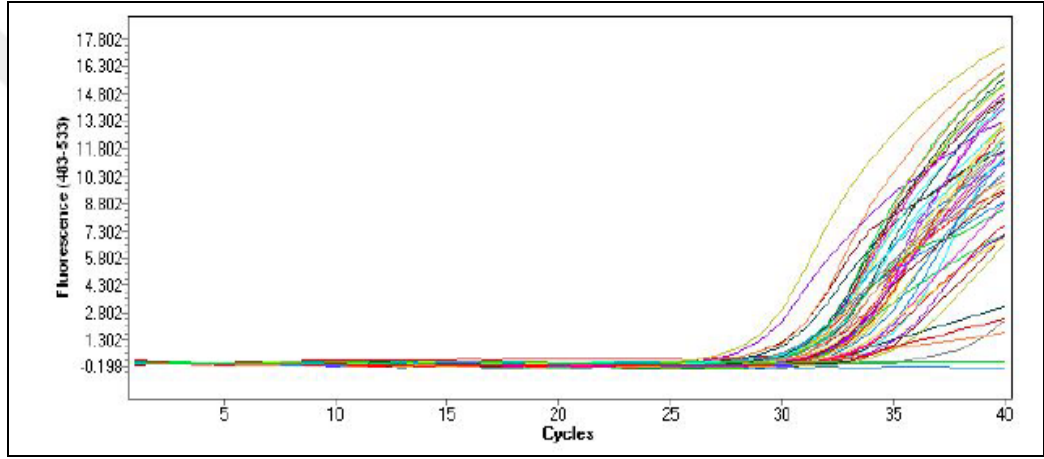
Şekil 4.39 Geç çiçeklenme - PpFT primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



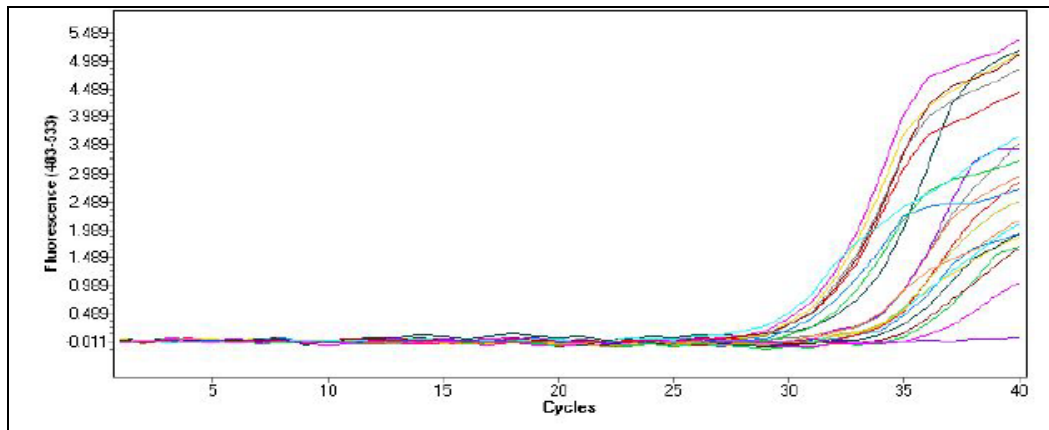
Şekil 4.40 Geç çiçeklenme - PabSOC1 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.41 Soğuk uygulama - PdAct primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.42 Soğuk uygulama - PdCBF1 primerinde 6.saat soğuk uygulama yapılan kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri

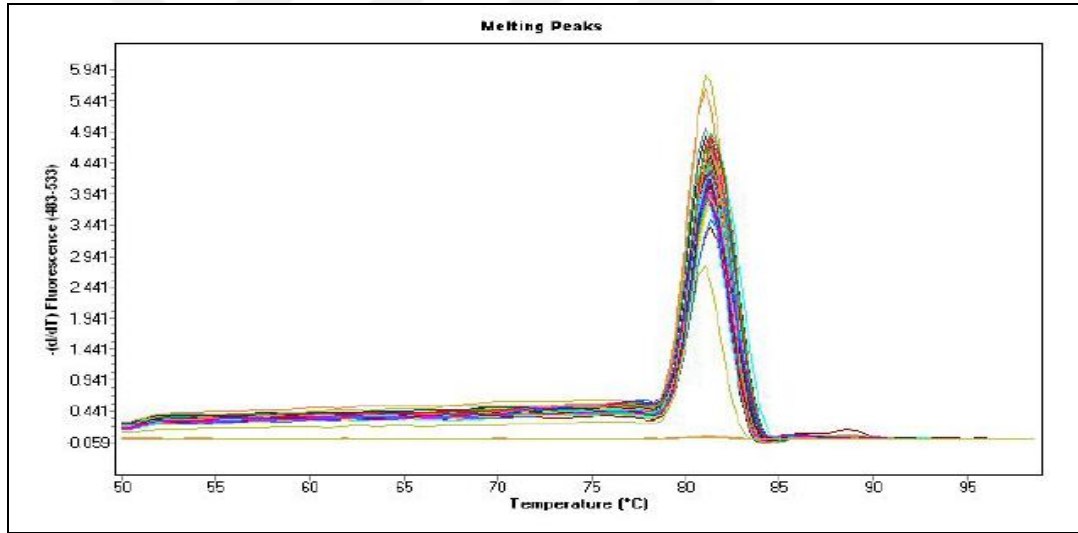


Şekil 4.43 Soğuk uygulama - PdCBF2 primerinde 6.saat soğuk uygulama yapılan kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri

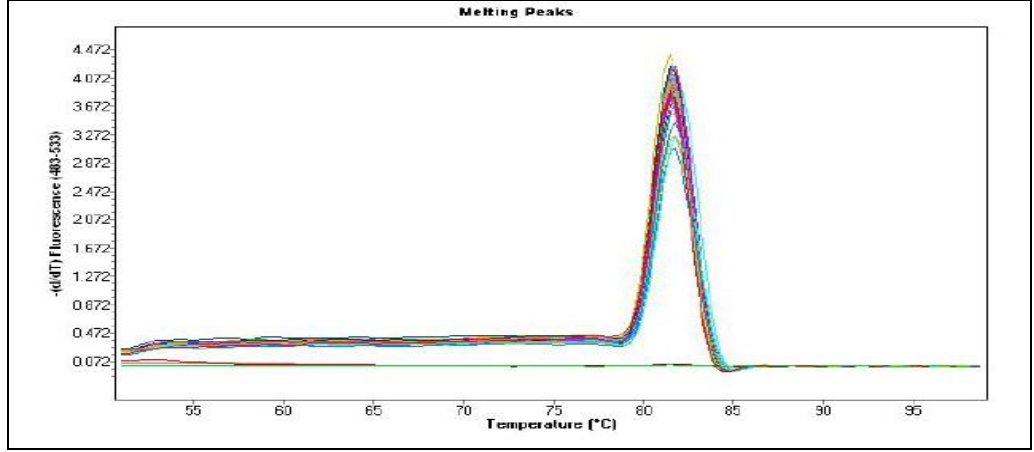
Real Time PCR reaksiyonlarında her bir primerin kontrol ve örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrilerinden elde edilen sonuçlar, kullanılan primerlerin amplifiye olması gereken optimum Ct değer aralıkları arasında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.38-4.43).

4.6.9. Erime eğrisi (Melting curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti amaçlı erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.44 - 4.45). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan pik görüntüleri elde edilmiş olup, bu durum reaksiyonlarda herhangi bir dimer varlığının olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.44 Geç çiçeklenme - PdActin primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği



Şekil 4.45 Geç çiçeklenme - PpFT primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği

4.6.10 Real Time PCR Verileri

Real Time PCR cihazından alınan *PdAct*, *PpFT*, *PabSOC1*, *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerinin her biri için, uygulama (geç çiçeklenme ve soğuk stresi) örneklerine (-s ile ifade edilen grup) ve kontrol örneklerine ait (-c ile ifade edilen grup) Ct değerleri (3 teknik tekrarlı) Çizelge 4.17 ve 4.18’te verilmektedir.

Çizelge 4.17 Geç çiçeklenme örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PpFT-s</i>	<i>PpFT-c</i>	<i>PabSOC1-s</i>	<i>PabSOC1-c</i>
Akbadem-1	32.07	29.75	30.45	32.39	29.40	31.00
Akbadem-2	32.13	29.57	30.64	32.49	29.54	31.44
Akbadem-3	32.10	29.66	30.51	32.44	29.37	31.25
<i>A.arabica</i> -1	28.33	30.65	29.75	28.26	29.87	29.51
<i>A.arabica</i> -2	28.24	30.49	30.01	28.54	29.56	29.26
<i>A.arabica</i> -3	28.29	30.57	29.98	28.40	29.78	29.39
<i>A. orientalis</i> -1	23.43	31.92	32.18	35.34	27.46	30.41
<i>A.orientalis</i> -2	23.52	31.81	31.02	35.17	27.13	30.24
<i>A.orientalis</i> -3	23.63	31.87	32.33	35.43	27.60	30.58
<i>A. webbii</i> -1	30.29	28.83	30.76	31.93	30.55	31.10
<i>A. webbii</i> -2	30.38	28.86	31.23	33.89	30.36	31.52
<i>A. webbii</i> -3	30.19	28.65	31.32	32.91	30.46	31.31
Araban 10-1	31.38	30.96	30.31	32.12	31.60	33.19
Araban 10-2	31.24	30.80	31.13	32.83	31.25	33.36
Araban 10-3	31.01	30.88	29.87	31.39	31.33	33.43
Araban 17-1	33.00	30.66	34.35	35.40	30.08	29.78
Araban 17-2	33.22	30.27	33.45	35.30	30.17	29.52
Araban 17-3	33.11	30.47	33.79	35.60	30.21	29.65
Araban 94-1	31.77	33.03	33.71	34.75	29.19	31.18
Araban 94-2	31.66	33.17	33.61	35.00	28.37	32.37
Araban 94-3	31.82	32.10	33.16	35.07	28.23	31.23
Araban 95-1	30.12	30.45	32.27	34.86	29.94	30.64
Araban 95-2	30.45	31.00	32.32	34.60	29.56	30.29
Araban 95-3	30.29	30.73	32.60	34.73	29.75	30.57
Araban 96-1	32.16	30.64	33.88	32.06	31.12	30.62
Araban 96-2	32.32	30.82	34.21	33.20	32.23	30.72
Araban 96-3	32.14	30.73	33.43	32.63	32.13	30.67
Araban 125-1	30.80	31.19	31.26	33.03	32.83	31.21
Araban 125-2	30.38	31.45	31.32	33.15	32.43	31.67
Araban 125-3	30.59	31.32	31.12	32.79	32.63	31.49
Araban 126-1	29.92	26.93	32.64	34.74	31.31	31.70
Araban 126-2	29.30	27.39	33.03	35.00	31.41	31.88
Araban 126-3	29.61	27.21	32.74	34.52	31.50	31.59
Araban 129-1	29.92	28.94	29.36	35.00	28.34	30.75
Araban 129-2	29.50	28.81	30.19	34.71	27.78	30.85
Araban 129-3	29.61	28.98	29.78	34.66	28.16	30.50
Araban 136-1	31.84	32.49	34.83	35.00	29.44	30.60
Araban 136-2	31.78	32.39	34.60	35.35	29.22	30.45
Araban 136-3	31.81	32.64	34.41	35.18	29.37	30.53

Çizelge 4.17 Geç çiçeklenme örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri
(devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PpFT-s</i>	<i>PpFT-c</i>	<i>PabSOC1-s</i>	<i>PabSOC1-c</i>
Araban 146-1	32.89	28.01	33.43	35.00	31.47	32.08
Araban 146-2	32.32	27.78	33.65	35.08	31.75	32.14
Araban 146-3	32.61	27.90	33.88	35.10	31.61	31.82
Araban 164-1	31.67	29.97	33.25	31.48	31.00	32.32
Araban 164-2	31.32	29.45	33.63	32.29	31.06	32.52
Araban 164-3	31.45	29.71	33.44	31.74	31.13	32.60
Bertina-1	27.63	33.44	27.19	29.56	27.52	27.99
Bertina-2	27.77	33.40	28.07	29.32	27.23	27.76
Bertina-3	27.50	33.52	27.93	29.42	27.38	27.88
Bozkurt-1	27.46	28.45	35.09	32.86	29.55	31.08
Bozkurt-2	27.71	28.58	35.10	33.06	29.30	31.26
Bozkurt-3	27.59	28.52	35.35	33.01	29.28	31.12
Ferragnes-1	28.82	35.10	32.32	33.12	30.36	31.56
Ferragnes -2	29.02	35.07	32.74	33.33	30.24	31.54
Ferragnes -3	28.77	35.00	32.53	33.23	29.78	31.45
Ferraduel-1	32.76	25.93	33.45	31.57	34.13	32.00
Ferraduel-2	34.06	25.94	32.34	30.56	33.54	31.80
Ferraduel-3	33.41	25.84	32.03	30.34	33.78	31.99
Garrigues-1	31.96	25.89	31.55	30.35	31.45	30.35
Garrigues-2	31.56	25.68	32.33	30.77	31.25	30.14
Garrigues-3	31.76	25.79	31.88	30.80	32.12	30.54
Guara-1	32.49	28.37	34.14	35.00	30.44	31.82
Guara-2	32.74	28.91	34.17	35.26	30.65	31.94
Guara-3	32.62	28.64	34.06	35.63	30.76	31.99
Gülcan 1-1	31.46	29.83	31.12	30.85	30.85	29.68
Gülcan 1-2	31.01	30.00	31.03	30.54	31.05	29.76
Gülcan 1-3	31.24	29.92	31.26	30.70	31.00	29.72
Gülcan 2-1	32.60	29.92	33.28	35.00	31.21	32.03
Gülcan 2 -2	32.15	30.03	33.97	35.21	30.25	31.94
Gülcan 2 -3	32.38	29.98	33.03	35.11	30.34	31.99
Hacıalibey-1	29.53	29.60	29.25	33.21	28.54	32.37
Hacıalibey-2	29.34	29.41	29.36	33.32	28.76	32.57
Hacıalibey-3	29.44	29.51	29.45	33.77	28.90	32.67
Halitbey-1	32.13	26.57	32.87	33.54	33.55	32.70
Halitbey-2	32.01	26.77	33.05	33.12	33.87	32.96
Halitbey-3	32.07	26.87	32.68	33.64	33.65	32.83

Çizelge 4.17 Geç çiçeklenme örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri (devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PpFT-s</i>	<i>PpFT-c</i>	<i>PabSOCl-s</i>	<i>PabSOCl-c</i>
Moncayo-1	34.51	32.11	30.23	32.75	31.26	30.21
Moncayo-2	34.83	31.98	31.15	34.61	31.49	30.60
Moncayo-3	34.47	32.15	31.33	33.68	31.28	30.31
Ne Plus Ultra-1	30.68	29.42	34.33	35.00	28.10	30.89
Ne Plus Ultra -2	30.29	28.53	34.54	35.35	28.20	30.78
Ne Plus Ultra -3	30.49	28.78	34.14	35.18	28.35	30.84
Nonpareil-1	30.23	24.82	35.17	33.64	33.13	31.24
Nonpareil-2	29.86	24.76	35.20	33.13	33.23	31.43
Nonpareil-3	30.04	24.79	35.36	33.04	33.26	31.64
Nurlu-1	30.18	35.00	29.85	30.65	29.50	31.49
Nurlu-2	30.16	35.18	30.34	31.80	29.67	31.62
Nurlu-3	30.57	35.09	30.16	31.38	29.89	31.71
Primorski-1	33.00	32.94	32.23	30.93	31.76	28.67
Primorski -2	33.40	32.96	31.23	30.11	31.55	28.29
Primorski -3	33.30	32.65	32.17	30.52	31.66	28.48
Supernova-1	35.00	27.51	33.43	31.12	33.16	31.56
Supernova-2	35.49	26.95	32.68	30.22	33.75	31.44
Supernova-3	35.45	27.23	33.12	30.45	33.32	30.56
Teksas-1	32.27	29.11	35.21	33.63	29.45	32.10
Teksas-2	32.21	29.21	35.10	33.93	29.38	32.32
Teksas-3	32.24	29.16	35.18	33.45	29.27	32.46
Yaltinski-1	31.83	30.28	28.94	32.25	31.61	28.88
Yaltinski -2	31.58	30.31	29.27	32.40	31.71	29.01
Yaltinski -3	31.70	30.30	29.11	32.33	31.81	28.95
Yavuzeli 19-1	30.09	28.11	31.62	34.62	30.76	32.11
Yavuzeli 19-2	29.83	28.43	31.73	35.00	30.63	32.26
Yavuzeli 19-3	29.96	28.27	31.83	34.61	30.50	32.49
Yavuzeli 24-1	28.44	30.83	31.63	32.59	30.31	29.76
Yavuzeli 24-2	28.86	30.91	31.44	33.41	30.42	29.30
Yavuzeli 24-3	28.65	30.87	31.14	32.80	31.22	29.53
Yavuzeli 26-1	32.72	28.91	32.37	33.98	30.55	31.73
Yavuzeli 26-2	32.50	29.04	32.77	33.77	30.23	31.49
Yavuzeli 26-3	32.66	28.98	32.62	33.58	30.32	31.51
Yavuzeli 28-2	30.11	35.70	32.83	33.79	32.42	33.78
Yavuzeli 28-3	29.98	35.35	32.60	33.52	32.62	33.95
Yavuzeli 29-1	32.32	30.86	31.23	32.36	30.04	32.03
Yavuzeli 29-2	32.34	31.19	31.30	32.44	30.54	33.20
Yavuzeli 29-3	32.23	31.02	30.89	32.40	30.23	32.32

4.17 Geç çiçeklenme örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri (devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PpFT-s</i>	<i>PpFT-c</i>	<i>PabSOCI-s</i>	<i>PabSOCI-c</i>
Yavuzeli 51-1	30.67	30.77	33.13	34.57	29.63	29.80
Yavuzeli 51-2	30.44	30.34	32.72	34.59	29.33	29.70
Yavuzeli 51-3	30.56	30.56	33.03	34.83	29.33	29.90
Yavuzeli 102-1	32.71	33.77	33.00	35.00	30.45	29.56
Yavuzeli 102-2	32.62	33.93	32.43	35.37	30.57	29.95
Yavuzeli 102-3	32.87	33.35	33.57	35.09	30.26	29.41
Yavuzeli 103-1	35.00	30.09	35.10	33.46	33.37	31.96
Yavuzeli 103-2	35.47	29.89	35.40	33.15	33.64	31.83
Yavuzeli 103-3	35.44	29.99	35.30	33.31	33.76	31.90
17-4-1	32.33	30.11	32.43	31.28	30.16	30.70
17-4-2	32.61	30.00	32.87	31.82	30.02	30.66
17-4-3	32.47	30.05	32.65	31.55	30.24	30.68
48-1-1	29.74	29.49	30.35	31.60	30.43	31.70
48-1-2	30.34	29.33	30.67	33.06	30.15	31.52
48-1-3	30.09	29.41	29.14	32.33	30.02	31.51
1: 1.tekerrür, 2: 2.tekerrür, 3:3.tekerrür						

Çizelge 4.18 Soğuk uygulaması örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PdCBF1-s</i>	<i>PdCBF1-c</i>	<i>PdCBF2-s</i>	<i>PdCBF2-c</i>
Akbadem-1	29.11	35.00	29.66	30.65	27.24	28.72
Akbadem-2	29.34	34.95	29.33	30.90	26.62	28.95
Akbadem-3	29.38	34.98	29.50	30.78	26.74	28.84
<i>A.arabica</i> -1	28.33	30.65	29.75	28.26	29.87	29.51
<i>A.arabica</i> -2	28.24	30.49	30.01	28.54	29.56	29.26
<i>A.arabica</i> -3	28.29	30.57	29.98	28.40	29.78	29.39
<i>A.orientalis</i> -1	29.65	22.87	35.22	29.26	31.50	30.08
<i>A.orientalis</i> -2	30.09	23.23	35.10	29.52	32.75	29.58
<i>A.orientalis</i> -3	29.87	23.25	35.14	29.69	35.10	29.83
<i>A.webbii</i> -1	28.46	29.31	27.60	31.50	29.07	29.64
<i>A.webbii</i> -2	27.88	29.19	27.40	31.85	29.13	29.40
<i>A.webbii</i> -3	28.17	29.25	27.30	31.48	29.00	29.52
Araban 10-1	29.68	31.01	31.16	32.41	29.20	28.88
Araban 10-2	30.15	31.14	31.30	32.34	29.11	28.74
Araban 10-3	29.92	31.07	31.53	32.18	29.16	28.41
Araban 17-1	30.69	32.88	31.66	33.66	29.17	35.00
Araban 17-2	30.79	31.85	31.73	33.00	29.40	35.50
Araban 17-3	30.74	32.37	31.70	33.23	29.44	35.25

Çizelge 4.18 Soğuk uygulaması örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri
(devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PdCBF1-s</i>	<i>PdCBF1-c</i>	<i>PdCBF2-s</i>	<i>PdCBF2-c</i>
Araban 94-1	28.03	30.94	30.69	31.65	30.39	35.00
Araban 94-2	28.14	31.20	30.45	31.71	30.55	35.32
Araban 94-3	28.08	30.92	30.57	31.58	30.47	35.16
Araban 95-1	30.79	30.91	32.00	31.00	25.78	30.44
Araban 95-2	30.84	30.17	32.24	31.09	25.94	30.21
Araban 95-3	30.82	30.54	33.37	31.05	25.86	30.58
Araban 96-1	30.85	31.78	32.20	31.07	29.46	28.76
Araban 96-2	31.41	31.57	32.58	31.17	29.67	29.05
Araban 96-3	31.13	31.68	32.49	31.57	30.12	28.91
Araban 125-1	28.76	30.19	29.30	32.05	29.55	30.08
Araban 125-2	28.47	30.66	29.38	32.45	29.62	30.44
Araban 125-3	28.62	30.43	30.49	32.25	29.99	30.26
Araban 126-1	29.55	30.20	30.25	31.05	28.75	29.83
Araban 126-2	29.96	30.24	30.47	31.11	28.56	29.51
Araban 126-3	29.76	30.22	30.36	31.08	28.62	29.67
Araban 129-1	28.07	27.65	30.89	29.36	28.60	29.26
Araban 129-2	27.82	27.58	30.66	29.42	28.95	29.66
Araban 129-3	27.95	27.62	30.48	29.54	28.78	29.46
Araban 136-1	27.65	31.51	31.22	32.30	27.87	28.30
Araban 136-2	27.17	31.27	31.40	32.41	28.20	28.85
Araban 136-3	27.41	31.39	31.60	32.71	28.05	28.58
Araban 146-1	28.71	31.91	31.26	35.66	28.23	29.24
Araban 146-2	28.70	32.90	31.32	35.00	27.34	29.42
Araban 146-3	28.71	32.10	31.49	35.33	26.44	29.83
Araban 164-1	30.49	30.81	30.30	31.33	28.20	29.18
Araban 164-2	30.11	31.54	30.05	31.23	28.87	29.52
Araban 164-3	30.30	31.18	30.43	31.28	28.43	29.35
Bertina-1	34.00	26.73	34.25	33.33	32.00	30.50
Bertina-2	33.62	26.48	34.50	33.43	31.25	30.08
Bertina-3	34.31	26.11	34.50	33.53	31.75	30.44
Bozkurt-1	28.54	27.28	30.43	32.52	28.92	30.24
Bozkurt-2	28.78	27.76	30.33	32.35	28.73	30.51
Bozkurt-3	28.16	27.52	30.38	32.79	28.88	30.29
Ferraduel-1	25.64	33.83	30.19	32.70	29.36	30.14
Ferraduel-2	25.62	33.60	30.12	32.30	28.33	30.51
Ferraduel-3	25.63	33.92	30.36	32.40	28.12	30.33
Ferragnes-1	35.00	27.36	34.45	33.53	32.10	29.66
Ferragnes-2	34.54	27.49	33.75	33.31	31.10	29.13
Ferragnes-3	34.77	27.43	34.60	33.62	31.55	29.40

Çizelge 4.18 Soğuk uygulaması örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri (devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PdCBF1-s</i>	<i>PdCBF1-c</i>	<i>PdCBF2-s</i>	<i>PdCBF2-c</i>
Garrigues-1	30.12	35.52	33.00	35.23	29.10	29.45
Garrigues-2	30.40	35.30	33.11	35.17	28.85	29.15
Garrigues-3	30.22	35.44	33.05	35.20	29.00	29.55
Guara-1	33.45	35.00	28.84	35.30	27.87	28.93
Guara-2	33.23	34.37	28.75	35.22	28.04	28.86
Guara-3	33.13	34.69	28.50	35.10	27.96	28.90
Gülcan 1-1	25.74	31.48	28.76	35.20	29.25	28.92
Gülcan 1-2	25.67	29.88	28.85	35.12	29.27	28.77
Gülcan 1-3	25.71	30.68	28.81	35.00	29.56	28.85
Gülcan 2-1	30.35	33.46	31.01	32.88	29.03	29.39
Gülcan 2-2	30.84	33.78	31.05	32.83	28.95	29.66
Gülcan 2-3	30.60	33.62	31.23	32.86	28.99	29.78
Hacıalibey-1	27.68	29.44	30.83	32.89	27.50	28.34
Hacıalibey-2	27.86	29.27	30.51	32.50	27.10	29.02
Hacıalibey-3	27.77	29.36	30.67	32.60	27.55	29.38
Halitbey-1	30.88	32.34	29.61	33.48	29.06	28.98
Halitbey-2	30.96	32.07	29.65	33.46	29.43	28.40
Halitbey-3	30.92	32.20	29.63	33.12	29.25	28.69
Moncayo-1	31.71	32.01	30.42	35.22	28.00	29.84
Moncayo-2	32.35	32.28	30.22	35.30	29.10	30.06
Moncayo-3	32.03	32.15	30.52	35.28	28.75	29.95
Ne Plus Ultra-1	29.77	30.01	33.00	35.30	29.26	30.08
Ne Plus Ultra -2	29.48	30.31	33.11	35.20	29.04	30.55
Ne Plus Ultra -3	29.63	30.16	33.05	35.40	29.15	30.42
Nonpareil-1	27.88	29.70	31.75	35.00	26.78	29.30
Nonpareil-2	28.30	29.95	31.67	35.20	26.57	29.41
Nonpareil-3	28.72	29.83	31.71	34.90	26.93	29.36
Nurlu-1	32.92	29.47	32.56	31.24	31.36	29.57
Nurlu-2	31.72	29.56	33.03	31.43	31.00	29.48
Nurlu-3	32.32	29.52	32.25	31.04	31.38	29.88
Primorski-1	30.77	35.20	32.66	31.71	28.59	29.14
Primorski-2	30.92	35.09	32.81	31.93	28.63	29.20
Primorski-3	30.35	35.10	32.74	31.82	28.61	29.67
Supernova-1	34.50	35.30	30.72	35.00	27.80	28.95
Supernova-2	32.03	35.45	32.80	35.42	28.07	29.15
Supernova-3	33.27	35.29	31.76	35.31	28.03	29.05
Teksas-1	29.02	31.49	30.39	32.38	28.65	29.68
Teksas-2	28.71	31.63	30.04	32.47	28.80	29.48
Teksas-3	28.87	31.36	31.31	32.73	28.80	29.58

Çizelge 4.18 Soğuk uygulaması örneklerine (3 tekrarlı) ait Real Time PCR Ct değerleri
(devam)

Örnek	<i>PdAct-s</i>	<i>PdAct-c</i>	<i>PdCBF1-s</i>	<i>PdCBF1-c</i>	<i>PdCBF2-s</i>	<i>PdCBF2-c</i>
Yaltinski-1	32.59	31.31	31.30	30.11	30.10	29.34
Yaltinski -2	32.32	31.45	31.67	30.05	29.60	28.42
Yaltinski -3	32.46	31.38	31.49	30.08	29.80	28.88
Yavuzeli 19-1	29.70	29.95	31.64	32.35	29.25	30.25
Yavuzeli 19-2	29.61	29.70	31.26	32.70	29.54	30.58
Yavuzeli 19-3	29.66	29.83	31.45	32.53	29.36	30.38
Yavuzeli 24-1	29.34	28.08	32.14	31.82	28.83	29.84
Yavuzeli 24-2	30.00	28.54	32.25	32.10	28.78	30.02
Yavuzeli 24-3	29.67	28.31	32.20	31.96	28.81	29.93
Yavuzeli 26-1	29.71	33.21	29.16	32.09	29.75	29.18
Yavuzeli 26-2	29.93	33.43	29.05	32.37	29.32	28.86
Yavuzeli 26-3	29.42	33.32	29.00	31.43	29.54	29.07
Yavuzeli 28-1	28.70	30.44	30.68	31.27	29.09	29.73
Yavuzeli 28-2	29.00	29.94	31.09	31.50	29.25	29.86
Yavuzeli 28-3	28.85	30.19	30.89	31.39	29.17	29.50
Yavuzeli 29-1	28.47	31.12	30.26	34.66	29.38	30.57
Yavuzeli 29-2	27.57	30.81	30.07	35.00	29.72	30.84
Yavuzeli 29-3	28.02	30.97	30.02	34.93	29.55	30.71
Yavuzeli 51-1	28.34	31.01	29.61	31.73	29.43	28.71
Yavuzeli 51-2	28.34	31.32	29.95	31.32	29.82	28.96
Yavuzeli 51-3	28.34	31.17	29.68	31.53	29.58	28.84
Yavuzeli 102-1	29.22	32.42	35.00	30.52	30.40	28.51
Yavuzeli 102-2	29.73	32.19	35.00	33.52	29.72	28.76
Yavuzeli 102-3	29.48	32.31	35.00	32.02	30.06	28.64
Yavuzeli 103-1	31.15	35.00	31.67	33.77	27.09	29.14
Yavuzeli 103-2	30.82	35.16	31.77	33.31	27.32	29.26
Yavuzeli 103-3	30.99	35.48	31.42	33.44	27.23	29.20
17-4-1	28.10	31.85	22.55	21.80	30.10	29.18
17-4-2	28.29	32.07	22.15	21.58	30.35	29.41
17-4-3	28.20	31.76	22.40	21.68	30.25	29.30
48-1-1	34.00	29.50	31.89	30.65	31.25	30.38
48-1-2	34.19	29.48	31.51	30.32	31.15	30.00
48-1-3	34.60	29.49	31.60	30.56	31.30	30.44
1: 1.tekerrür, 2: 2.tekerrür, 3:3.tekerrür						

Buna göre, geç çiçeklenmeyle ilişkili *PdAct* (housekeeping) genindeki Ct değerlerinin 23.43 ile 35.70; *PpFT* genindeki Ct değerlerinin 27.19 ile 35.60; *PabSOC1* genindeki Ct değerlerinin ise 27.13 ile 34.13 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.17).

Soğuk stresi ile ilişkili olarak, *PdAct* (housekeeping) genindeki Ct değerlerinin 22.87 ile 35.52; *PdCBF1* genindeki Ct değerlerinin 21.58 ile 35.66 ve *PdCBF2* genindeki Ct değerlerinin ise 25.78 ile 35.32 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.18).

4.6.11 Real Time PCR verilerin relatif ifade analizleri

Badem genotipleri geç çiçeklenme ve soğuk (-2 °C'de 6 saat) uygulamalarında *PdAct* (housekeeping)'a göre normalize edilmiş *PpFT* ve *PabSOC1* genlerinin verileri Çizelge 4.19'da, ifade seviyeleri ise Şekil 4.46 ve 4.47'de verilmiştir. *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerinin verileri Çizelge 4.20'de, ifade seviyeleri ise Şekil 4.48 ve 4.49'da verilmiştir.

Çizelge 4.19 Geç çiçeklenme örneklerinde *PpFT* ve *PabSOC1* genlerine ait normalize veriler

Çeşitler	<i>PpFT</i> - 2 ^{^ddct} - up/down	<i>PpFT</i> - 2 ^{^ddct} - stdHata	<i>PabSOC1</i> - 2 ^{^ddct} - up/down	<i>PabSOC1</i> - 2 ^{^ddct} - stdHata
Akbadem	20,37*	0,63	19,04*	2,04
<i>Amygdalus arabica</i>	9,79*	4,10	5,64**	1,50
<i>Amygdalus orientalis</i>	-27,29*	0,01	-39,91**	0,00
<i>Amygdalus webbii</i>	11,02*	3,63	5,23*	0,69
Araban 10	4,08*	0,48	4,86*	0,53
Araban 17	7,48*	1,58	2,10*	1,01
Araban 94	1,62*	0,74	4,62*	1,51
Araban 95	3,78**	0,51	1,24*	0,05
Araban 96	1,25*	0,22	1,33*	0,35
Araban 125	2,07*	0,27	-3,74*	0,01
Araban 126	22,30*	5,96	7,08*	1,67
Araban 129	60,31**	19,18	10,62*	1,65
Araban 136	0,93*	0,11	1,41*	0,08
Araban 146	70,36*	8,55	38,83*	4,32
Araban 164	1,14*	0,15	9,14*	0,56
Bertina	-16,35*	0,02	-39,66*	0,00

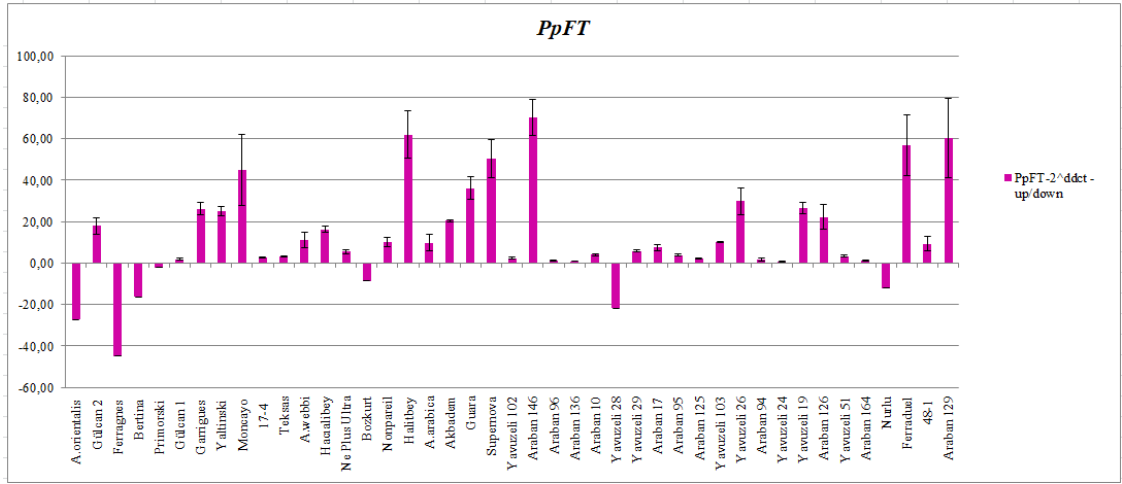
Çizelge 4.19 Geç çiçeklenme örneklerinde *PpFT* ve *PabSOC1* genlerine ait normalize veriler (devam)

Çeşitler	<i>PpFT</i> - 2 ^{ΔΔct} - up/down	<i>PpFT</i> - 2 ^{ΔΔct} - stdHata	<i>PabSOC1</i> - 2 ^{ΔΔct} - up/down	<i>PabSOC1</i> - 2 ^{ΔΔct} -stdHata
Bozkurt	-8,72**	0,01	1,82**	0,20
Ferraduel	56,94*	14,50	54,74*	16,54
Ferragnes	-44,93*	0,00	-27,49*	0,00
Garrigues	26,29*	3,16	26,53*	3,02
Guara	36,23*	5,32	39,01*	3,19
Gülcan 1	1,90*	0,34	1,08**	0,16
Gülcan 2	17,90*	3,83	13,97*	1,52
Hacialibey	16,23**	1,40	13,30**	0,16
Halitbey	62,08*	11,25	22,37*	1,91
Moncayo	45,02*	17,21	3,00*	0,45
Ne Plus Ultra	5,49*	0,87	18,40**	1,06
Nonpareil	10,17*	2,28	11,23*	0,74
Nurlu	-12,10*	0,01	-7,25*	0,01
Primorski	-2,14*	0,10	-6,86**	0,01
Supernova	50,25*	9,22	59,46*	8,96
Teksas	3,00*	0,29	64,89**	6,33
Yaltinski	24,91**	2,29	-2,55**	0,02
Yavuzeli 19	26,39**	2,75	10,35*	1,35
Yavuzeli 24	0,67*	0,17	-9,74*	0,02
Yavuzeli 26	29,92*	6,50	29,13*	1,57
Yavuzeli 28	-21,80*	0,00	-16,36**	0,00
Yavuzeli 29	5,83*	0,50	11,60*	1,25
Yavuzeli 51	3,31*	0,41	1,31*	0,13
Yavuzeli 102	2,36*	0,37	-3,26*	0,05
Yavuzeli 103	10,24**	0,40	12,33*	0,69
17-4	2,51*	0,25	7,85*	0,84
48-1	9,34*	3,46	4,19*	0,69

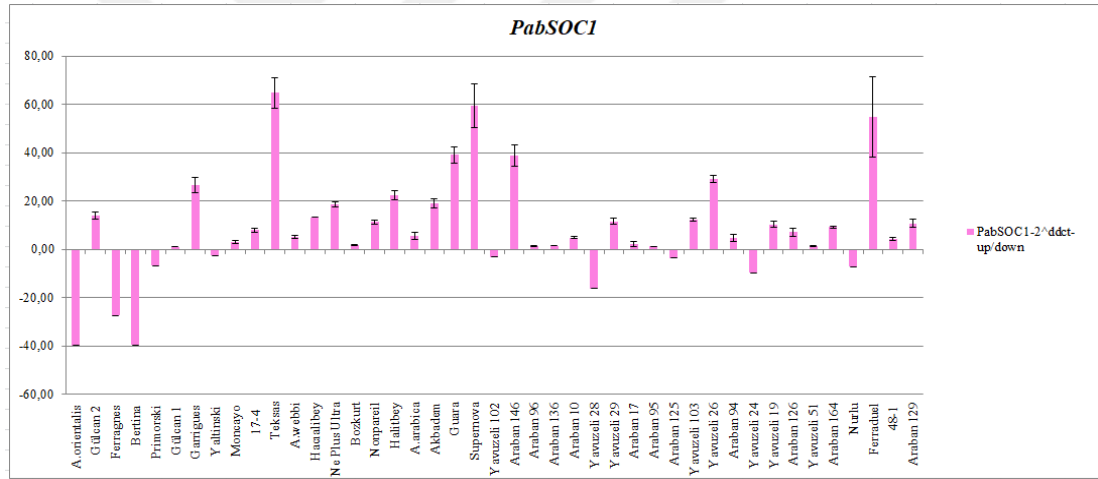
*p≤0.05' e göre istatistik olarak önemli

** p≤0.05' e göre istatistik olarak çok önemli

PpFT ve *PabSOC1* gen ifadelerindeki artış ve azalışın çiçeklenme özelliğini işaret eden bir durum olduğu düşünülmektedir (Putterill vd. 2004, Li vd. 2016, Agliassa vd. 2018) (Çizelge 4.19).



Şekil 4.46 Farklı badem genotiplerinde geç çiçeklenme değerlendirmesine ait *PpFT* geninin ifade seviyesi



Şekil 4.47 Geç çiçeklenme örneklerinde *PabSOC1* geni ifade seviyesi

4.6.11.1 Geç çiçeklenme örneklerinde *PpFT* gen ifadesi

Geç çiçeklenme özelliği açısından *PpFT* geni ifade analizlerine göre, Akbadem, *A.arabica*, *A.webbii*, Araban 10, Araban 17, Araban 95, Araban 125, Araban 126, Araban 129, Araban 146, Garrigues, Guara, Gülcan 2, Ferraduel, Hacıalibey, Halitbey, Moncayo, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Teksis, Supernova, Yaltinski, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103, 17-4 ve 48-1

genotiplerinde ifade artışı belirlenmiştir (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). İfade seviyesi azalan çeşit ve genotipler ise; *A. orientalis*, Bertina, Ferragnes, Nurlu, Primorski, Yavuzeli 28 ve Bozkurt olmuştur (Şekil 4.46).

Genotipler arasında en fazla ifade artışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemli) Araban 146 genotipinde (70.36 kat) olurken, onu sırasıyla Halitbey (62.08 kat), Araban 129 (60.31 kat), Ferraduel (56.94 kat), Supernova (50.25 kat), Moncayo (45.02 kat), Guara (36.23 kat), Yavuzeli 26 (29.92 kat), Yavuzeli 19 (26.39 kat), Garrigues (26.29 kat), Yaltinski (24.91 kat), Araban 126 (22.30 kat), Akbadem (20.37 kat), Gülcan 2 (17.90 kat), Hacılibey (16.23 kat), *A. webbii* (11.02 kat), Yavuzeli 103 (10.24), Nonpareil (10.17 kat), *A. arabica* (9.79 kat), 48-1 (9.34 kat), Araban 17 (7.48 kat), Yavuzeli 29 (5.83 kat), Ne Plus Ulta (5.49 kat), Araban 10 (4.08 kat), Araban 95 (3.78 kat), Yavuzeli 51 (3.31 kat), Teksas (3.00 kat), 17-4 (2.51 kat), Yavuzeli 102 (2.36) ve Araban 125 (2.07 kat) izlemiştir. En fazla ifade azalışı ise (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemli); Ferragnes (-44.93 kat) çeşidinde tespit edilirken, onu sırasıyla *A. orientalis* (-27.29 kat), Yavuzeli 28 (-21.80 kat), Bertina (-16.35 kat), Nurlu (-12.10 kat), Bozkurt (-8.72 kat) ve Primorski (-2.14 kat) izlemektedir (Çizelge 4.19).

İstatistik olarak yapılan t-test sonucunda ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistiksel anlamda önemlidir) ifade seviyelerinin -2 ile +2 arasında belirlenmesinden dolayı geç çiçeklenme özelliği bakımından Araban 94, Araban 96, Araban 136, Araban 164, Gülcan 1 ve Yavuzeli 24 genotiplerinde herhangi bir ifade artışı ya da azalışı olmamıştır (Çizelge 4.19, Şekil 4.46).

Orta geç ve geç çiçeklendiği belirtilen çeşitlerden (Küden vd. 2014) Halitbey (62.08 kat), Ferraduel (56.94 kat), Supernova (50.25 kat), Moncayo (45.02 kat), Guara (36.23 kat), Yaltinski (24.91 kat), Gülcan 2 (17.90 kat), Nonpareil (10.17 kat) ve Teksas (3.00 kat) çeşitlerinde *PpFT* geninde ifade artışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) gözlemlenirken; Ferragnes (-44.93 kat), Bertina (-16.35 kat), Bozkurt (-8.72 kat) ve Primorski (-2.14 kat) çeşitlerinde ise ifade azalışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.46).

Erken çiçeklenen çeşitlerden Garrigues (26.29 kat), Akbadem (20.37 kat), Hacıalibey (16.23 kat), 48-1 (9.34 kat), Ne Plus Ultra (5.49 kat) ve 17-4 (2.51 kat) çeşit ve genotiplerinde *PpFT* geninde ifade artışı, Nurlu çeşidinde ise ifade azalışı (-12.10 kat) belirlenmiştir (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) (Çizelge 4.19, Şekil 4.46).

Selekte edilen genotipler dikkate alındığında; Araban 146 (70.36 kat), Araban 129 (60.31 kat), Yavuzeli 26 (29.92 kat), Yavuzeli 19 (26.39 kat), Araban 126 (22.30 kat), Yavuzeli 103 (10.24 kat), Araban 17 (7.48 kat), Yavuzeli 29 (5.83 kat), Araban 10 (4.08 kat), Araban 95 (3.78 kat), Yavuzeli 51 (3.31 kat), Araban 125 (2.07 kat) genotiplerinde *PpFT* geninde ifade artışı, Yavuzeli 28 genotipinde ise ifade azalışı (-21.80 kat) belirlenmiştir (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) (Çizelge 4.19, Şekil 4.46).

4.6.11.2 Geç çiçeklenme örneklerinde *PabSOCl* gen ifadesi

Geç çiçeklenme açısından *PabSOCl* geninin ifade analizine göre, Akbadem, *A.arabica*, *A.webbii*, Araban 10, Araban 17, Araban 94, Araban 126, Araban 129, Araban 146, Araban 164, Ferraduel, Garrigues, Guara, Gülcan 2, Hacıalibey, Halitbey, Moncayo, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Supernova, Teksas, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 29, Yavuzeli 103, 17-4 ve 48-1 genotiplerinde ifade artışı belirlenmiştir (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). İfade seviyesi azalan genotipler ise *A.orientalis*, Bertina, Ferragnes, Yavuzeli 28, Yavuzeli 24, Nurlu, Primorski, Araban 125, Yavuzeli 102 ve Yaltinski olmuştur (Şekil 4.47).

Genotipler arasında en fazla ifade artışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemli) Teksas çeşidinde (64.89 kat) olurken, onu sırasıyla Supernova (59.46 kat), Ferraduel (54.74 kat), Guara (39.01 kat), Araban 146 (38.53 kat), Yavuzeli 26 (29.13 kat), Garrigues (26.53 kat), Halitbey (22.37 kat), Akbadem (19.04 kat), Ne Plus Ultra (18.40 kat), Gülcan 2 (13.97 kat), Hacıalibey (13.30 kat), Yavuzeli 103 (12.33 kat), Yavuzeli 29 (11.60 kat), Nonpareil (11.23 kat), Araban 129 (10.62 kat), Yavuzeli 19 (10.35 kat), Araban 164 (9.14 kat), 17-4 (7.85 kat), Araban 126 (7.08 kat), *A. arabica* (5.64 kat),

A. webbi (5.23 kat), Araban 10 (4.86 kat), Araban 94 (4.62 kat), 48-1 (4.19 kat), Moncayo (3.00 kat) ve Araban 17 (2.10 kat) izlemiştir. En fazla ifade azalışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemli) ise *A. orientalis* türünde (-39.91 kat) tespit edilirken, onu sırasıyla Bertina (-39.66 kat), Ferragnes (-27.49 kat), Yavuzeli 28 (-16.36 kat), Yavuzeli 24 (-9.74 kat), Nurlu (-7.25 kat), Primorski (-6.86 kat), Araban 125 (-3.74 kat), Yavuzeli 102 (-3.26 kat) ve Yaltinski (-2.55 kat) olmuştur (Çizelge 4.19).

İstatistik olarak yapılan t-test sonucunda ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistiksel anlamda önemlidir) ifade seviyelerinin -2 ile +2 arasında belirlenmesinden dolayı çiçeklenme özelliği bakımından Araban 95, Araban 96, Araban 136, Bozkurt, Gülcan 1 ve Yavuzeli 51 genotiplerinde herhangi bir ifade artışı ya da azalışı olmamıştır (Çizelge 4.19, Şekil 4.47).

Orta geç ve geç çiçeklendiği belirtilen çeşitlerden (Küden vd. 2014) Teksas (64.89 kat), Supernova (59.46 kat), Ferraduel (54.74 kat), Guara (39.01 kat), Halitbey (22.37 kat), Gülcan 2 (13.97 kat), Nonpareil (11.23 kat) ve Moncayo (3.00 kat) çeşitlerinde *PabSOCl* geninde ifade artışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) gözlemlenirken, Bertina (-39.66 kat), Ferragnes (-27.49 kat), Primorski (-6.86 kat) ve Yaltinski (-2.55 kat) çeşitlerindeki ifade azalmıştır (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir).

Erken çiçeklenen çeşitlerden Garrigues (26.53 kat), Akbadem (19.04 kat), Ne Plus Ultra (18.40 kat), Hacılibey (13.30 kat), 17-4 (7.85 kat) ve 48-1 (4.19 kat)'de *PabSOCl* geninde ifade artışı, Nurlu (7.25 kat) çeşidinde ise ifade azalışı (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.47).

Selekte edilen genotipler arasında ise, Araban 146 (38.83 kat), Yavuzeli 26 (29.13 kat), Yavuzeli 103 (12.33 kat), Yavuzeli 29 (11.60 kat), Araban 129 (10.62 kat), Yavuzeli 19 (10.35 kat), Araban 164 (9.14 kat), Araban 126 (7.08 kat), Araban 10 (4.86 kat), Araban 94 (4.62 kat) ve Araban 17 (2.10 kat) genotiplerinde *PabSOCl* geninde ifade artışı görülürken, Yavuzeli 28 (16.36 kat), Yavuzeli 24 (9.74 kat), Araban 125

(3.74 kat) ve Yavuzeli 102 (3.26 kat) genotiplerinde ifade azalışı (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenmiştir. (Çizelge 4.19, Şekil 4.47).

PpFT ve *PabSOC1* genleri birlikte değerlendirildiğinde ise; ifadesi artan (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) çeşit ve genotipler Akbadem, *A. arabica*, *A. webbi*, Araban 10, Araban 17, Araban 126, Araban 129, Araban 146, Ferraduel, Garrigues, Guara, Gülcan 2, Hacıalibey, Halitbey, Moncayo, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Supernova, Teksas, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 29, Yavuzeli 103, 17-4 ve 48-1 olurken, ifadesi azalanlar (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) *A. orientalis*, Bertina, Ferragnes, Nurlu, Primorski ve Yavuzeli 28 olmuştur (Şekil 4.46, Şekil 4.47).

PpFT ve *PabSOC1* gen ifadeleri; referans çeşitlerden Bertina (geç çiçeklenen), Ferragnes (geç çiçeklenen) ve Nurlu (erken çiçeklenen)'da azalış, 48-1 (erken çiçeklenen) çeşidinde ise artış (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiştir (Şekil 4.46 - 4.47, Çizelge 4.19).

Orta geç ve geç çiçeklendiği bilinen Ferraduel, Guara, Gülcan 2, Halitbey, Nonpareil ve Supernova çeşitlerinde (Çizelge 3.1), *PpFT* ve *PabSOC1* genlerinin her ikisinde de ifade artışı görülmüştür. *PpFT* genindeki ifade artışı (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) sırasıyla 56.94, 36.23, 17.90, 62.08, 10.17 ve 50.25 olarak belirlenirken; *PabSOC1* geninde ise sırasıyla 54.74, 39.01, 13.97, 22.37, 11.23 ve 59.46 kat ifade artışı (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) tespit edilmiştir (Çizelge 4.19).

Erken çiçeklendiği belirtilen Akbadem, Garrigues, Hacıalibey, Ne Plus Ultra ve 48-1 çeşitlerinde (Çizelge 3.1) *PpFT* ve *PabSOC1* genlerinin her ikisinde de ifade artışı (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) görülmüştür. *PpFT* genindeki ifade artışı sırasıyla 20.37, 26.29, 16.23, 5.49 ve 9.34 kat olurken; *PabSOC1* geninde ise sırasıyla 19.04, 26.53, 13.30, 18.40 ve 4.19 kat ifade artışı olmuştur (Çizelge 4.19).

Her iki gen açısından da ifade artışı (*,**p≤0.05' e göre istatistik olarak önemlidir) gösteren selekte edilmiş genotipler değerlendirildiğinde ise; *PpFT* genindeki ifade artışı

sırasıyla Araban 146 (70.36 kat), Araban 129 (60.31 kat), Yavuzeli 26 (29.92 kat), Yavuzeli 19 (26.39 kat), Araban 126 (22.30 kat), Yavuzeli 103 (10.24 kat), Araban 17 (7.48 kat), Yavuzeli 29 (5.83 kat) ve Araban 10 (4.08 kat) olurken; *PabSOCl* genindeki ifade artışı ise sırasıyla Araban 146 (38.83 kat), Yavuzeli 26 (29.13 kat), Yavuzeli 103 (12.33 kat), Yavuzeli 29 (11.60 kat), Araban 129 (10.62 kat), Yavuzeli 19 (10.35 kat), Araban 126 (7.08 kat), Araban 10 (4.86 kat) ve Araban 17 (2.10 kat) genotiplerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

4.6.11.3 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF1* gen ifadesi

Soğuğa tolerans açısından *PdCBF1* geninin ifade analizine göre, *A.orientalis*, *A.webbii*, Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Guara, Gülcan 1, Halitbey, Moncayo, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Nurlu, Supernova Yavuzeli 24, Yavuzeli 29 ve 48-1 çeşit ve genotiplerinde ifade artışı belirlenmiştir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). İfade seviyesi azalan çeşit ve genotipler ise; Akbadem, *A.arabica*, Araban 94, Araban 95, Araban 96, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103 ve 17-4 olmuştur (Şekil 4.48).

Genotipler arasında en fazla ifade artışı Bertina çeşidinde (99.63 kat) olurken, onu sırasıyla Ferragnes (95.08 kat), Guara (31.15 kat), Moncayo (27.69 kat), 48-1 (12.62 kat), Bozkurt (8.90 kat), *A.webbii* (8.56 kat), Halitbey (5.48 kat), Supernova (4.87 kat), Yavuzeli 24 (4.00 kat), Nonpareil (3.53 kat), Yavuzeli 29 (3.49 kat), Ne Plus Ultra (3.37 kat), Nurlu (2.95 kat), Gülcan 1 (2.71 kat), *A.orientalis* (2.15 kat) izlemiştir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). En fazla ifade azalışı ise Ferraduel çeşidinde (59.30 kat) tespit edilirken, onu sırasıyla Primorski (-40.63 kat), Yavuzeli 102 (-34.15 kat), Akbadem (-20.78 kat), 17-4 (-20.73 kat), *A.arabica* (-13.89 kat), Garrigues (-8.11 kat), Araban 136 (-7.50 kat), Yavuzeli 103 (-4.83 kat), Araban 94 (-3.63 kat), Araban 96 (-3.20 kat), Gülcan 2 (-2.40 kat) ve Araban 95 (-2.11 kat) izlemektedir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) (Şekil 4.48, Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerine ait normalize veriler

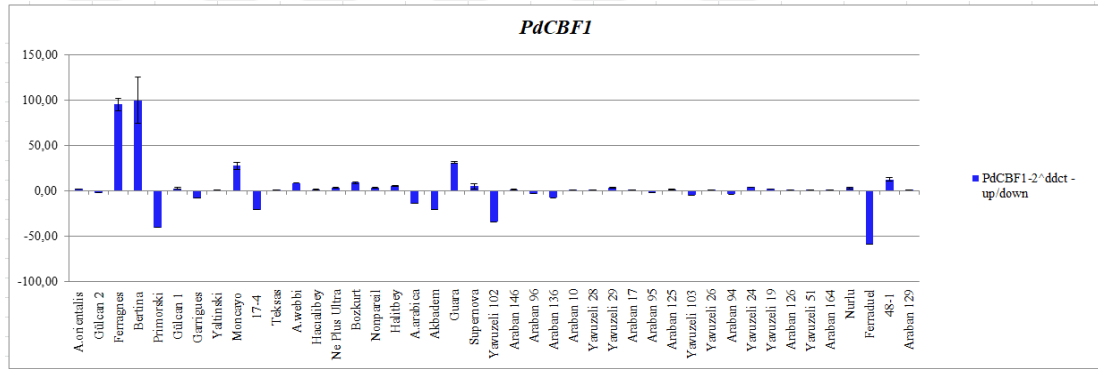
Çeşitler	<i>PdCBF1</i> - 2 [^] ddct - up/down	<i>PdCBF1</i> - 2 [^] ddct - stdHata	<i>PdCBF2</i> - 2 [^] ddct- up/down	<i>PdCBF2</i> - 2 [^] ddct- stdHata
Akbadem	-20,78*	0,01	-12,59*	0,02
<i>Amygdalus arabica</i>	-13,89*	0,00	-6,20*	0,00
<i>Amygdalus orientalis</i>	2,15**	0,20	18,84*	11,51
<i>Amygdalus webbii</i>	8,56**	0,15	0,66*	0,10
Araban 10	0,90*	0,10	-3,07*	0,04
Araban 17	0,93*	0,13	21,16**	6,09
Araban 94	-3,63*	0,01	3,38**	0,12
Araban 95	-2,11*	0,14	28,65**	2,72
Araban 96	-3,20*	0,04	-2,50*	0,09
Araban 125	1,77*	0,44	-2,37*	0,06
Araban 126	1,20*	0,05	1,48*	0,07
Araban 129	0,54*	0,06	2,02*	0,05
Araban 136	-7,50*	0,01	-10,88*	0,00
Araban 146	1,60**	0,36	0,53*	0,24
Araban 164	1,15*	0,25	1,06*	0,29
Bertina	99,63*	25,59	78,62*	20,13
Bozkurt	8,90**	0,65	5,69*	0,83
Ferraduel	-59,30**	0,00	-77,70**	0,00
Ferragnes	95,08*	6,85	35,70*	0,94
Garrigues	-8,11**	0,01	-27,10*	0,00
Guara	31,15**	0,88	0,66**	0,03
Gülcan 1	2,71**	0,76	-41,32*	0,01
Gülcan 2	-2,40**	0,02	-5,22*	0,02
Hacialibey	1,33*	0,08	1,22*	0,11
Halitbey	5,48**	0,55	-3,53*	0,03
Moncayo	27,69**	3,96	2,35*	0,28
Ne Plus Ultra	3,37**	0,52	1,59*	0,05
Nonpareil	3,53**	0,45	2,13**	0,26
Nurlu	2,95*	0,84	2,39*	0,46
Primorski	-40,63*	0,00	-13,17*	0,00
Supernova	4,87*	3,21	0,66*	0,32
Teksas	0,64*	0,08	-3,09*	0,06
Yaltinski	0,82*	0,14	1,12*	0,18
Yavuzeli 19	1,93*	0,34	1,81*	0,07
Yavuzeli 24	4,00*	0,13	5,63**	0,48
Yavuzeli 26	0,64*	0,15	-17,43*	0,00
Yavuzeli 28	0,57*	0,07	0,59*	0,11

Çizelge 4.20 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerine ait normalize veriler (devam)

Çeşitler	<i>PdCBF1</i> - 2 ^{ΔΔct} - up/down	<i>PdCBF1</i> - 2 ^{ΔΔct} - stdHata	<i>PdCBF2</i> - 2 ^{ΔΔct} - up/down	<i>PdCBF2</i> - 2 ^{ΔΔct} - stdHata
Yavuzeli 29	3,49**	0,20	-3,40*	0,04
Yavuzeli 51	0,51*	0,10	-12,03*	0,01
Yavuzeli 102	-34,15*	0,02	-17,11*	0,02
Yavuzeli 103	-4,83*	0,05	-4,61**	0,04
17-4	-20,73*	0,00	-24,77*	0,00
48-1	12,62*	2,16	14,40*	2,32

* $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemli

** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak çok önemli



Şekil 4.48 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF1* geni ifade seviyesi

İstatistik olarak yapılan t-test sonucunda (*, ** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) ifade seviyelerinin -2 ile +2 arasında belirlenmesinden dolayı soğuğa tolerans bakımından Araban 10, Araban 17, Araban 125, Araban 126, Araban 129, Araban 146, Araban 164, Hacialibey, Teksas, Yaltinski, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28 ve Yavuzeli 51 çeşit ve genotiplerinde herhangi bir ifade artışı ya da azalışı olmamıştır (Şekil 4.48, Çizelge 4.20).

Orta geç ve geç çiçeklendiği belirtilen çeşitlerden (Küden vd. 2014), Bertina (99.63 kat), Ferragnes (95.08 kat), Guara (31.15 kat), Moncayo (27.69 kat), Bozkurt (8.90 kat), Halitbey (5.48 kat), Supernova (4.87 kat), Nonpareil (3.53 kat), Gülcan 1 (2.71 kat)

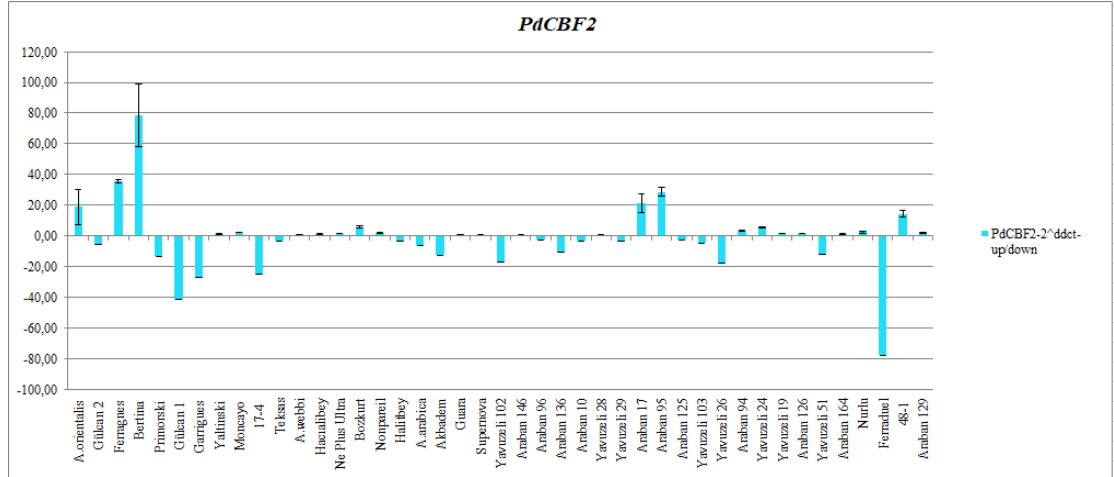
çeşitlerinde *PdCBF1* geninde ifade artışı (*,** $p\leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) gözlemlenirken; Ferraduel (-59.30 kat), Primorski (-40.63 kat) ve Gülcan 2 (-2.40 kat) çeşitlerinde ifade azalışı (*,** $p\leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenmiştir. (Şekil 4.48, Çizelge 4.20).

Erken çiçeklenen çeşitlerden 48-1 (12.62 kat), Ne Plus Ultra (3.37 kat), Nurlu (2.95 kat) çeşitlerinde *PdCBF1* geninde ifade artışı, Akbadem (-20.78 kat), 17-4 (-20.73 kat) ve Garrigues (-8.11 kat) çeşitlerinde ise ifade azalışı belirlenmiştir (*,** $p\leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). Akbadem, 17-4 ve Garrigues çeşitlerinin erken çiçeklenmelerine rağmen soğuğa toleranslı çeşitler olabilecekleri düşünülmektedir (Şekil 4.48, Çizelge 4.20).

Selekte edilen genotipler arasında ise, Yavuzeli 24 (4.00 kat) ve Yavuzeli 29 (3.49 kat) genotiplerinin *PdCBF1* geninde ifade artışı belirlenirken, Yavuzeli 102 (-34.15 kat), Araban 136 (-7.50 kat), Yavuzeli 103 (-4.83 kat), Araban 94 (-3.63 kat), Araban 96 (-3.20 kat) ve Araban 95 (-2.11 kat) genotiplerinde ifade azalışı tespit edilmiştir (*,** $p\leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). (Şekil 4.48, Çizelge 4.20). *PdCBF1* geni açısından ifade azalışı gösteren genotiplerin soğuğa toleranslı olabilecekleri düşünülmektedir.

4.6.11.4 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF2* gen ifadesi

Soğuğa tolerans açısından *PdCBF2* geninin ifade analizine göre, *A.orientalis*, Araban 17, Araban 94, Araban 95, Araban 129, Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Moncayo, Nonpareil, Nurlu, Yavuzeli 24 ve 48-1 çeşit ve genotiplerinde ifade artışı belirlenmiştir (*,** $p\leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). İfade seviyesi azalan çeşit ve genotipler ise; Akbadem, *A.arabica*, Araban 10, Araban 96, Araban 125, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 1, Gülcan 2, Halitbey, Primorski, Teksas, Yavuzeli 26, Yavuzeli 29, Yavuzeli 51, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103 ve 17-4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.49).



Şekil 4.49 Soğuk uygulaması örneklerinde *PdCBF2* geni ifade seviyesi

Genotipler arasında en fazla ifade artışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) Bertina çeşidinde (78.62 kat) olurken, onu sırasıyla Ferragnes (35.70 kat), Araban 95 (28.65 kat), Araban 17 (21.16 kat), *A.orientalis* (18.84 kat), 48-1 (14.40 kat) Bozkurt (5.69 kat), Yavuzeli 24 (5.63 kat), Araban 94 (3.38 kat), Moncayo (2.35 kat), Nurlu (2.39 kat) ve Nonpareil (2.13 kat) izlemiştir. En fazla ifade azalışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) ise; Ferraduel çeşidinde (-77.70 kat) tespit edilirken, onu sırasıyla Gülcan 1 (-41.32 kat), Garrigues (-27.10 kat), 17-4 (-24.77 kat), Yavuzeli 26 (-17.43 kat), Yavuzeli 102 (-17.11 kat), Primorski (-13.17 kat), Akbadem (-12.59 kat), Yavuzeli 51 (-12.03 kat), Araban 136 (-10.88 kat), *A.arabica* (-6.20 kat), Gülcan 2 (-5.22 kat), Yavuzeli 103 (-4.61 kat), Halitbey (-3.53 kat), Yavuzeli 29 (-3.40 kat), Teksas (-3.09 kat), Araban 10 (-3.07 kat) ve Araban 125 (-2.37 kat) izlemiştir (Çizelge 4.20). Bu çeşit ve genotiplerde ifade azalışının görülmesi, soğuk uygulamalarından bu çeşit ve genotiplerin daha az etkilendiğini ve bu nedenle soğuğa toleranslı olarak kabul edilebileceklerini işaret etmektedir.

İstatistik olarak yapılan t-test sonucunda (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) ifade seviyelerinin -2 ile +2 arasında belirlenmesinden dolayı soğuğa tolerans bakımından *A.webbii*, Araban 126, Araban 146, Araban 164, Guara, Hacialibey, Ne Plus Ultra, Supernova, Yaltinski, Yavuzeli 19 ve Yavuzeli 28 genotiplerinde herhangi bir ifade artışı ya da azalışı olmamıştır (Çizelge 4.20).

Orta geç ve geç çiçeklendiği belirtilen çeşitlerden (Küden vd. 2014) Bertina (78.62 kat), Ferragnes (35.70 kat), Bozkurt (5.69 kat), Moncayo (2.35 kat) ve Nonpareil (2.13) çeşitlerinde *PdCBF2* geninde ifade artışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) gözlemlenirken; Ferraduel (-77.70 kat), Gülcan 1 (-41.32 kat), Primorski (-13.17 kat) Gülcan 2 (-5.22 kat), Halitbey (-3.53 kat) ve Teksas (-3.09 kat) çeşitlerinde ifade azalışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenmiştir (Şekil 4.49, Çizelge 4.20).

Erken çiçeklenen çeşitlerden 48-1 (14.40 kat) ve Nurlu (2.39 kat)'da *PdCBF2* geninde ifade artışı, Garrigues (-27.10 kat), 17-4 (-24.77 kat) ve Akbadem (-12.59 kat) çeşitlerinde ise ifade azalışı belirlenmiştir (Şekil 4.49, Çizelge 4.20).

Selekte edilen genotipler arasında ise, Araban 95 (28.65 kat), Araban 17 (21.16 kat), Yavuzeli 24 (5.63 kat), Araban 94 (3.38 kat), Araban 129 (2.02 kat) genotiplerinde *PdCBF2* geninde ifade artışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) belirlenirken, Yavuzeli 26 (-17.43 kat), Yavuzeli 102 (-17.11 kat), Yavuzeli 51 (-12.03 kat), Araban 136 (-10.88 kat), Yavuzeli 103 (-4.61 kat), Yavuzeli 29 (-3.40 kat), Araban 10 (-3.07 kat), Araban 96 (-2.50 kat) ve Araban 125 (-2.37 kat) genotiplerinde ifade azalışı (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) tespit edilmiştir (Şekil 4.49, Çizelge 4.20).

PdCBF1 ve *PdCBF2* genleri birlikte değerlendirildiğinde ise; ifadesi artan çeşit ve genotipler *A.orientalis*, Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Moncayo, Nonpareil, Nurlu, Yavuzeli 24 ve 48-1 olurken, ifadesi azalanlar Akbadem, *A.arabica*, Araban 96, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103 ve 17-4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.48, Şekil 4.49).

Soğuğa tolerans anlamı taşıdığı yorumlanan, gen ifadesindeki azalış özelliği referans çeşitlerde belirlenmemiştir. Referans eşitlerin tümünde *PdCBF1* ve *PdCBF2* gen ifadelerinde artış görülmüştür (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir).

Orta geç ve geç çiçeklendiği bilinen Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Moncayo ve Nonpareil çeşitlerinde (Çizelge 3.1) *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerinin her ikisinde de ifade artışı görülmüştür (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). *PdCBF1* genindeki ifade artışı sırasıyla 99.63, 8.90, 95.08, 27.69 ve 3.53 kat olarak belirlenirken; *PdCBF2* geninde sırasıyla 78.62, 5.69, 35.70, 2.35 ve 2.13 kat ifade artışı tespit edilmiştir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). Bu grupta yer alan Gülcan 2, Ferraduel ve Primorski çeşitlerinde ise her iki gen bakımından da ifade azalışlarının olduğu ve soğuğa toleranslı olabilecekleri görülmektedir. Bu çeşitlerde *PdCBF1* genindeki ifade azalışı sırasıyla -2.40, -59.30 ve -40.63 kat, *PdCBF2* genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -5.22, -77.70 ve -13.17 kat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Erken çiçeklendiği belirtilen 48-1 ve Nurlu çeşitlerinde (Çizelge 3.1) *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerinin her ikisinde de ifade artışı görülmüştür. *PdCBF1* genindeki ifade artışı sırasıyla 12.62 ve 2.95 kat olarak belirlenirken; *PdCBF2* genindeki ifade artışı sırasıyla 14.10 ve 2.39 kat ifade artışı tespit edilmiştir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). Bu grupta yer alan 17-4, Garrigues ve Akbadem çeşitlerinde ise her iki gen bakımından da ifade azalışlarının olduğu görülmektedir. Bu çeşitlerde *PdCBF1* genindeki ifade azalışı sırasıyla -20.73, -8.11 ve -20.78 kat, *PdCBF2* genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -24.77, -27.10 ve -12.59 kat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Her iki gen açısından da ifade artışı gösteren selekte edilmiş genotipler değerlendirildiğinde ise; Yavuzeli 24 genotipinde her iki genin de ifade artışı (*PdCBF1* geni için 4.00 kat, *PdCBF2* geni için 5.63 kat) gösterdiği belirlenmiştir. Her iki gen açısından da ifade azalışı gösteren genotipler ise Araban 96, Araban 136, Yavuzeli 102 ve Yavuzeli 103 olmuştur (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir). Bu genotiplerde *PdCBF1* genindeki ifade azalışı sırasıyla -3.20, -7.50, -34.15 ve -4.83 kat, *PdCBF2* genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -2.50, -10.88, -17.11 ve -4.61 kat olarak belirlenmiştir (*,** $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) (Çizelge 4.20).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Geç Çiçeklenme Özelliği Açısından Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışılan çeşit ve genotiplerde geç çiçeklenme özelliğinin olup olmadığı 1 RAPD (OPK10) ve 4 SSR (UDP96003, BPPCT035, CPPCT008 ve EPCU2584) markırları kullanılarak taranmıştır. Bunun yanı sıra, geç çiçeklenme ile ilişkili genlerin badem spesifik bölgeleri kullanılarak, araştırmada yer alan çeşit ve genotiplerin genlerindeki ifade değişimleri de analiz edilmiştir. Gen ifadesi analizlerinde, iki geç çiçeklenme gen bölgesine ait (*PabSOC1* ve *PpFT*) primerler kullanılmıştır. Sonuçlar, RAPD ve SSR markırları, gen ifadesi analizleri açısından ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmiştir.

5.1.1 RAPD markır analizleri açısından değerlendirme

Bademde genetik haritalama yolu ile *Lb* (Late blooming) geni ile ilişkili markırların tanımlanması, bademde seleksiyon ve yeni çeşitlerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Ballester vd. 2001).

Ballester vd. (2001) tarafından yapılan genetik haritalama çalışmasında, BSA (Bulk Segregation Analysis) yaklaşımı ile bademde geç çiçeklenmenin genetik mekanizmasının belirlenmesine yönelik 134 F1 bitkisi kullanılmıştır. Çalışmada bağlantı grupları üzerinde lokalize olan ve geç çiçeklenme ile ilişkili 3 RAPD markırı (OPK10, OPB1, OPI15) tanımlanmış olup, özellikle *Lb* genine en yakın uzaklıkta olan (5,4 cM uzaklıkta) OPK10 markırının geç çiçeklenme özelliği açısından çeşitleri ayırmada etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada bu RAPD markırı, geç çiçeklendikleri belirtilen (Socias i Company vd. 1996) ‘Felisia’ çeşidinde amplifiye olurken, ‘Bertina’ çeşidinde herhangi bir amplifikasyon (bant eldesi) gözlemlenmemiştir (Ballester vd. 2001).

Çalışmamızda incelenen 43 çeşit ve genotipe OPK10 RAPD markırının % 67.44 oranında ayırım sağlayarak 29 genotipin geç çiçeklenme özelliğine sahip olduğu

görülmüştür (Şekil 4.2, Çizelge 4.2). Orta-geç ve geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşit bakımından değerlendirildiğinde ise; 9 adedinde (% 64.29) bu markırın amplifiye olduğu, dolayısıyla bu markırın geç çiçeklenme ile ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu çeşitler arasında; geç çiçeklendiği bilinen Bertina çeşidinde OPK10 markırını Ballester vd. (2001)'in çalışmasına benzer şekilde bizim çalışmamızda da amplifiye olmamıştır. Bunun yanı sıra, erken çiçeklendiği bildirilen (Çizelge 3.1) 7 çeşitten (Nurlu, Akbadem, 17-4, 48-1, Hacıalibey, Ne Plus Ultra ve Garrigues çeşitleri) 4 tanesinde de (Akbadem, 17-4, Nurlu ve Garrigues çeşitleri) istenilen büyüklükte OPK10 RAPD primerine ait bant profili gözlenmiştir. Çalışmamızdaki bu sonuçlar, bu markırın geç çiçeklenme ile ilişkili olarak net bir ayırım göstermediğini ortaya koymaktadır. Benzer yaklaşım Ballester vd. (2001) tarafından da ifade edilmiştir.

5.1.2 SSR markır analizleri açısından değerlendirme

Prunus türlerinde SSR markır temelli araştırmaların büyük çoğunluğu genetik karakterizasyon amaçlı gerçekleştirilmekte olup (Wang vd. 2014, Sarhan vd. 2015, Abodoma vd. 2017, Mahood ve Hama-Salih 2020), geç çiçeklenme özelliği ile ilişkili olarak belirlenen SSR markırlar (Rasouli vd. 2014) ile bu özelliğe yönelik bademde yapılan araştırmaların sayısı oldukça azdır. Geç çiçeklenme ile ilişkili olarak tanımlanan UDP96003, BPPCT035, CPPCT008 ve EPCU2584 markırlara (Rasouli vd. 2014) yönelik gerçekleştirilen bu tez çalışmasının, bu markırların geç çiçeklenmeyi belirlemede etkinlik derecelerinin görülmesi bakımından yapılacak benzer çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte Rasouli vd. (2014)'nin çalışmasında lokus bazında allel büyüklükleri (bç) ile geç çiçeklenme arasında herhangi bir ilişki belirtilmemiş, ancak CPPCT008 ve EPCU2584 primerlerinin (lokuslarının) heterozigot olup olmama durumunun çiçeklenmeyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte lokuslardaki heterozigot ya da homozigot allel durumu aynı zamanda genotip tanımlama çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Çalışmamızda genotiplerin geç çiçeklenme özelliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 4 SSR (UDP96003, BPPCT035, CPPCT008 ve EPCU2584) markır arasında, çeşitler arasında en iyi ayırımı CPPCT008 ve EPCU2584 SSR markırlarının yaptığı

gözlemlenmiş olup, bu markırlarda allel sayısı sırası ile 7 ve 5 olarak belirlenmiş (Çizelge 4.3), ancak allel sayıları geç çiçeklenme özelliği ile ilişkili bulunmamıştır. Araştırma sonucumuza benzer şekilde, Rasouli vd. (2014)'nin tarafından yapılan çalışmada, CPPCT008 ve EPCU2584 markırlarının geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili ayırım yapabildikleri açıklanmıştır. Geç çiçeklenme ile ilişkili olarak, bu markırlarda heterozigot allele sahip çeşitler, geç çiçeklenme özelliğiyle ilişkili iken, homozigot profil gösteren çeşitlerin geç çiçeklenme özelliği bulunmamaktadır (Rasouli vd. 2014). Çalışmamızda ise, CPPCT008 ve EPCU2584 SSR markırlarında sırası ile 13 ve 18 adet genotipde homozigot genotip belirlenmiş ve bu örneklerin SSR markır bakımından geç çiçeklenme özelliği ile ilişkili olmadığı varsayılmıştır. Rasouli vd. (2014) ile benzer olarak çalışmamızda kullanılan diğer bir markır, EPPCU2584 markırı ise geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşitten 8 adedi heterozigot profil gösterirken (% 57.14) 6 adedi homozigot profil (% 42.85) göstermiştir.

Orta geç çiçeklenme özelliğine sahip İtalyan badem çeşidi 'Tuono' ile ekstra geç çiçeklenen İran çeşidi 'Shahrood-12' melezlemesi ile elde edilen F1 populasyonunda, geç çiçeklenme özelliğine yönelik kullanılan CPPCT008 ve EPCU2584 SSR markırlarındaki analizler sonucu, bu iki markırın geç çiçeklenme bakımından etkin ayırım yaptığı bildirilmiştir. Özellikle QTL bakımından çiçeklenme genine 0 (sıfır) cM uzaklıkta olan CPPCT008 markırının geç çiçeklenme ile ilişkili seleksiyon çalışmalarında kullanılabilmesi belirtilmiştir (Rasouli vd. 2018).

Sanchez-Perez vd. (2007), UDP96003 SSR markırının G4 lokusundaki *Lb* genine çok yakın olduğunu, 'R1000' genotipinde % 56-86 arasında ve 'R1000' x 'Desmayo Langueta' melezlerinde % 54-67 arasında farklılık gösterdiğini ifade etmiştir. Rasouli vd (2014)'ün çalışmasında ise, özellikle UDP06003 ve BPPCT035 SSR markırlarının, çeşitleri geç çiçeklenme özelliği bakımından ayırt etmede başarısız olduğu belirtmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda da çeşitlerin çoğunda (% 95.34) bu SSR primeri (BPPCT035) homozigot allel profili göstermiş olup, çiçeklenme ile ilişkili özellik bakımından doğru bir ayırım sağlamamıştır.

Yılmaz (2017) çalışmasında, geç çiçeklenme özelliği açısından ümitvar olarak belirlenen genotipler (12 adet) arasındaki genetik ilişkileri SSR markırlar (CPPCT022, CPPCT026, CPPCT033, CPSCT004, UDP96003, UDP96008, UDP96018, UDP98408, BPPCT028, BPPCT039) kullanarak değerlendirmiştir. Kullanılan UDP96003 markırı çalışmamızla ortak kullanılan markır özelliğinde olup, yapılan bu araştırma geç çiçeklenme özelliğine sahip çeşitlerde genetik karakterizasyon çalışması olması nedeni ile, bu primerin geç çiçeklenme ile ilişkisine ait herhangi bir bulgu bulunmamaktadır.

Çalışmamızda SSR markır taraması açısından değerlendirme yapıldığında, Araban 129, Bozkurt, Ferraduel, Ferragnes, Garrigues, Guara, Supernova, Nonpareil, Yavuzeli 19, Yavuzeli 24, Yavuzeli 26, Yavuzeli 28, Yavuzeli 29 ve 48-1 genotiplerinde geç çiçeklenme özelliği olma olasılığı yüksektir.

5.1.3 Gen ifadesi açısından değerlendirme

Arabidopsiste çiçeklenmenin moleküler düzeyde araştırılması, çiçeklenme zamanını düzenleyen çok sayıda genin (*CO*, *FT*, *SOC1*, *FCA*, *FVE* ve *FLC*) tanımlanmasını kolaylaştırmıştır.

Çiçeklenmenin başlamasında *CO* ve *FT* genleri önemli rol oynamaktadır. *FT* geninin kısa gün koşullarında ifadesinin azaldığı ve soğuklamayı başlatan dormansi boyunca ifadesinin arttığı belirtilmektedir. Birden fazla yolak tarafından regüle edilen ikinci çiçeklenme geni olan *FT*'nin ifade düzeyinin, otonom yolaklarının fonksiyonunu onaran mutasyonlar tarafından azaldığı ve *CO*'nun gen ifadesi artışı tarafından aktive edildiği belirtilmektedir. Bu durum, her iki yolağın gen ifadesinin azalmasının *FT* geninin rol almasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Kardailsky vd. 1999, Kobayashi vd. 1999; Samach vd. 2000). *FT* geninin *CO* geninin ilk hedefi olduğu (Samach vd. 2000) ve *FT*'nin ifade düzeyinin uzun gün koşullarında (gün doğumundan 20 saat sonra) arttığı ve ifade seviyesinin günlük ritme bağlı olduğu Suarez-Lopez vd. (2001) tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda ise, geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşit (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979, Gülcan 1985, Atlı vd. 2008, Yılmaz 2017, Bozkurt 2020) ifade değişimi (artışı veya azalışı) bakımından farklılık göstermiş olup yaklaşık 8 çeşitte *PpFT* geni

ifadesi yüksek katsayılar (10 kat ile 62 kat arası) artış ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiştir. Bu durum, yüksek katsayıda ifade artışına sahip çeşitlerin çiçeklenme başlangıç potansiyelinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, erken çiçeklendiği bilinen çeşitlerde (özellikle Ne Plus Ultra ve 48-1 çeşitleri) *PpFT* geninin geç çiçeklendiği bilinen çeşitlere oranla daha düşük katsayılar (5 kat ile 26 kat arası) artış ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermesi ise bu durumu kanıtlar niteliktedir.

PmFT gen ifadesine yönelik yapılan diğer bir çalışmada ise, Japon kayısına ait 'Nanko' çeşidine ait farklı doku ve organlar (yaprak, sepal, peta stamen, kök, sürgün vb.) kullanılmış olup, *PmFT* gen ifade seviyelerinin kök, sürgün ve yapraklarda düşük katsayıda (yaklaşık 2 kat) olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte en yüksek ifade artışı ise meyvede (yaklaşık 18 kat) ve çiçeklenme ile ilişkili olan sepallerde (yaklaşık 13 kat) gözlemlenmiş olup, çiçeklenme ile ilgili petal, stamen, pistil gibi dokularda ise *PmFT* gen ifade seviyesi düşük kat sayılarda (2- 6 kat) ifade artışı artış ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiştir (Esumi vd. 2009). Bu durum çiçeği oluşturan farklı organlarda *PmFT* geninin ifade farklılığına sahip olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular çalışmamızda kullanılan pembe tomucuklardaki ifade farklılığının bademde farklı çeşit kullanımının dışında, çiçek organlarındaki ifade farklılığı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir.

Esumi vd. (2009)'ne benzer şekilde Japon kayısı 'Nanko' çeşidinde yapılan diğer araştırmada ise, hem çiçek hem de vejetatif tomurcularda yazdan (Haziran) kış sonuna kadar (Mart) her ay *PmFT*'nin ifade artışı gözlemlenirken, çiçek tomurculardaki ifade düzeyi vejetatif tomurculara oranla daha yüksek katsayıda bulunmuştur (Kitamura vd. 2017). Çalışmamızda ise kayısıya yakın tür olan badem çeşitlerine ait tomurcuklar, Kitamura vd. (2017)' ne benzer dönemi içeren şekilde Ocak sonu toplanmış olup, örneklerin tümünde ifade artışına rastlanmamıştır. Buradan hareketle çiçeklenme mekanizmasındaki bu olası ifade farklılıklarının aydınlatılmasına yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yarur vd. (2016) 10 yaşlı 'Van' çeşidi kirazından klonlanan *FT* geninin ifadesini ilkbahar ve yaz boyunca çiçek tomurcukları ve yapraklarda analiz etmişlerdir. *PavFT* geninin ifadesi, gün ışığı 12. saate ulaştığında hem yapraklarda hem de çiçek tomurcuklarında artmış olup, gen ifadesi çiçeklenmeden 22 gün sonra, ilkbaharın ortasında başlamıştır. Çiçek tomurcuklarında *PavFT* geninin ifadesinin en yüksek düzeye ulaştığı zaman çiçeklenmeden 119 gün sonra görülmüştür. Çalışmamızda ise badem genotiplerinde, *PpFT* geni ifadesine genotipler pembe tomurcuk safhasına ulaşır ulaşmaz bakılmıştır. Bu durumda, çiçeklenme zamanındaki farklılıkların da gen ifadesi düzeylerinde farklı sonuçlar yaratabileceği kanısı ortaya çıkmaktadır.

FT geninin çok yıllık bitkilerde yüksek doz ifadesinin özellikle gençlik periyodunu azaltarak erken çiçeklenmeye sebep olduğu, *FT* geninin bu fonksiyonunun ise özellikle *SOCI* ve *API* geni gibi spesifik koordine olmuş genlerin aktivasyonuna bağlı olduğu vurgulanmaktadır (Endo vd. 2005, Tränkner vd. 2010, Srinivasan vd. 2012, Oda vd. 2012, Xing vd. 2014).

İlk defa domates bitkisinde tanımlanan (Pnueli vd. 1991) *SOCI* geni günümüzde birçok bitki türünde izole edilmiş olup, halen bilinmeyen birçok fonksiyonunun olduğu belirtilmektedir (Becker ve Theissen 2003, Ruokolainen vd. 2011). Çalışmaların çoğunda, *SOCI* geninin çiçek gelişiminde rol oynadığı (Coen ve Meyerowitz 1991, Theissen ve Saedler 2001, Nam vd. 2003, 2004) bununla birlikte bazı dönemlerde vejetatif organlarda (Tandre vd, 1995, Walden vd. 1998, Winter vd. 1999, Watson ve Brill 2004) ve üreme organlarında da (Heuer vd. 2001, Münster vd. 2002) tercihli olarak ifade olabildiği de açıklanmıştır. Ayrıca *SOCI* geninin bazı aile üyeleri ise vasküler gelişim ve ksilem formasyonu gibi yapılarla ilişkili olarak da ifade olabilmektedir (Decroocq vd. 1999, Alvarez-Buylla vd. 2000, Cseke vd. 2003).

Günümüzde *SOCI* geni ve çiçeklenme ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Borner vd. 2000, Samach vd. 2000, Moon vd. 2003, 2005, Kitamura vd. 2016). *Gerbera hybrid* üzerinde yapılan bir çalışmada bu genin yüksek doz (over- ekspres) ifadesinin çiçeklenme zamanında herhangi bir değişime sebep olmadığı, aynı zamanda çiçek

oluşumunda az da olsa fonksiyon kaybına neden olduğu belirtilmiştir (Ruokolainen vd. 2011).

Elmada yapılan çalışmada *MdSOC1* geninin çiçeklenmeyi teşvik ettiği (Hattasch vd. 2008) belirtilirken, arabidopsiste ise *FT* geninin *SOC1* ifadesini aktive ettiği bildirilmektedir (Yoo vd. 2005). Bununla birlikte *SOC1* geni birçok gene bağlı promotor, baskılayıcı ve genin kendi aktivasyonuna dayalı etmenler ile birlikte ifade olmaktadır. Bu durum bu genin ifade mekanizmasının kompleks yapıda olduğunu göstermektedir (Tao vd. 2012).

Genel olarak *SOC1* geni çiçek oluşumu ve çiçeklenme sırasında ifade artışı gösterir (Hassankhah vd. 2020), ancak bu genin kompleks yapıda ifade mekanizmasına bağlı olarak ifade azalışı gösteren çalışmaları da mevcuttur. Örneğin, Kitamura (2016)'nın çalışmasında, Japon kayısı 'Nanko' ve 'Ellching' çeşitlerinin çiçek tomurcuklarında *PmSOC1* gen ifade seviyesi 'Nanko' çeşidi çiçek tomurcuğunda, Aralık ayından itibaren, 'Ellching' çeşidi çiçek tomurcuğunda ise Kasım ayından itibaren azalış göstermiştir. Çalışmamızda ise *SOC1* geni geç çiçeklenme gösterdiği bilinen (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979, Atlı vd. 2008, Gülcan 1985, Yılmaz 2017, Bozkurt 2020) çeşitlerde (14 çeşit) diğer çalışmalara benzer şekilde (Zhao vd. 2014) genel olarak ifade artışı göstermiş ancak 5 çeşitte ifadesi azalmıştır. Bu durum aslında *SOC1* geninin farklı ifade profillerinin geç/erken çiçeklenen çeşitlere göre bir korelasyon göstermediğini kanıtlamaktadır. Ayrıca Tao vd. (2012)'nin çalışmasına benzer olarak, *SOC1* geninin diğer gen / genler ile ilişkili olduğu da çalışmamızda kanıtlanmıştır. *PpFT* geninin pembe tomurcuk safhasında *PabSOC1* geni ile doğrudan ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Genotiplerin pembe çiçek tomurcuklarında *PpFT* gen ifadesi artış gösterirken, *PabSOC1* geninin de aynı doğrultuda ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Prunus mume' un çiçek tomurcuklarının farklı gelişim safhalarında (Haziran ayından Aralık ayına kadar haftalık toplanan) *PmSOC1-1*, *PmSOC1-2* ve *PmSOC1-3* genleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise, *PmSOC1-1* ve *PmSOC1-3* genleri çiçekte düşük ifade artışı göstermiş ve bu artış, sepallerin yaprak benzeri yapılara değişimi, petal renginin yeşile dönüşümü ve petalin filament benzeri yapılara değişimi gibi çiçek fenotip

değişimleri ile sonuçlanmıştır. *PmSOC1-2* geninin ise sadece vejetatif organlarda ifadesi artmıştır (Li vd. 2016b). Geomanyetik alan uygulamasının çiçeklenme ile ilişkili genler üzerindeki etkilerine yönelik yapılan diğer bir çalışmada ise, arabidopsis örneklerinde, *FLC* ve *SVP*'nin birlikte çalışmasıyla *SOC1* geninin baskılandığı vurgulanmıştır (Agliassa vd. 2018). Aynı çalışmada *SOC1* geninin ifadesi sadece geç çiçeklenme döneminde çok düşük katsayıda (2.63 kat sayı, $p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) azalmıştır. Bu düşük azalış katsayısı, bu genin belirgin bir seviyede ifade değişimine sahip olmadığını kanıtlamaktadır. Çalışmamızda ise *SOC1* geni geç çiçeklenme gösterdiği bilinen (Dokuzoğuz ve Gülcan 1979, Atlı vd. 2008, Gülcan 1985, Yılmaz 2017, Bozkurt 2020) çeşitlerde (14 çeşit) diğer çalışmalara benzer şekilde (Lee vd. 2000, Moon vd. 2003, Yoo vd. 2005, Liu vd. 2008, Wang vd. 2009, Tao vd. 2012, Zhao vd. 2014) genel olarak ifade artışı ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiş ancak 5 çeşitte ifadesi azalmıştır.

Çalışmamızda, 43 adet çeşit ve genotipten *PabSOC1* geninin ifadesi 27 genotipte artarken ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir), *PpFT* geninin ifadesi 30 genotipte artış ($p \leq 0.05$ ' e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiştir. *PpFT* ve *PabSOC1* gen ifadeleri açısından değerlendirildiğinde ise, her iki genin ifadesindeki artış ortak olarak 25 genotipte (Akbadem, *Amygdalus arabica*, *Amygdalus webbi*, Araban 10, Araban 17, Araban 126, Araban 129, Araban 146, Ferraduel, Garrigues, Guara, Gülcan 2, Hacılibey, Halitbey, Moncayo, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Supernova, Teksas, Yavuzeli 19, Yavuzeli 26, Yavuzeli 29, Yavuzeli 103, 17-4 ve 48-1) görülmüştür (Çizelge 5.1).

Çalışmamızda kullanılan yabancı tür, yerli ve yabancı çeşitlerle ilgili başka bir çalışma olmadığından sonuçlarımızı çeşit bazında karşılaştırma imkanımız bulunamamaktadır. Çalışmamızın bilgilerimiz dahilinde tür ve çeşit bazında yapılan ilk çalışma olduğu söylenebilir.

Geç çiçeklenme özelliği açısından genel olarak bir değerlendirme yapıldığında, doğadan selekte edilen Araban 96, Araban 136, Yavuzeli 24 ve Yavuzeli 28 genotiplerinin geç çiçeklenme özelliğini kesin olmamakla birlikte taşıyabildikleri düşünülmektedir. Bu durum arazi koşullarında yürütülen fenolojik gözlemlerle de uyumlu bulunmuştur

(Yılmaz 2017). Geç ieklendiği bilinen Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Gülcan 1 ve Primorski standart eitlerin bu özelliği taşıdıkları bu çalışmayla bir kez daha kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, geç çiçeklenmenin poligenik bir özellik olduğu ve/veya genlerin etkilerini baskılayan başka faktörlerin olabileceğine de dikkat çekilmektedir (eki 2000).



Çizelge 5.1 Geç çiçeklenme değerlendirmesi yapılan çeşit, tür ve genotiplerin markır taramaları (- Bant yok, + Bant var) ile geç çiçeklenme ve soğuk uygulamalarına ilişkin gen ifade analizlerinin çeşit, tür ve genotipler arasında karşılaştırılması (- gen ifadesi azalmış, + gen ifadesi artmış)

Çeşit, Tür ve Genotip	Geç çiçeklenmeyle ilgili primerler							Soğukla ilgili primerler	
	OPK10	UDP96003	EPCU2584	CPPCT008	BPPCT035	<i>PpFT</i>	<i>PabSOC1</i>	<i>PdCBF1</i>	<i>PdCBF2</i>
<i>A. arabica</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>A. orientalis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>A. webbii</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Akbadem	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Araban 10	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Araban 17	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Araban 94	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Araban 95	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Araban 96	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Araban 125	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Araban 126	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Araban 129	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Araban 136	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Araban 146	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Araban 164	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Bertina	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Bozkurt	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Ferraduel	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Ferragnes	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Garrigues	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Guara	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Gülcan 1	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Çizelge 5.1 Geç çiçeklenme değerlendirmesi yapılan çeşit, tür ve genotiplerin markır taramaları (- Bant yok, + Bant var) ile geç çiçeklenme ve soğuk uygulamalarına ilişkin gen ifade analizlerinin çeşit, tür ve genotipler arasında karşılaştırılması (- gen ifadesi azalmış, + gen ifadesi artmış) (devam)

Çeşit, Tür ve Genotip	Geç çiçeklenmeyle ilgili primerler							Soğukla ilgili primerler	
	OPK10	UDP96003	EPCU2584	CPPCT008	BPPCT035	<i>PpFT</i>	<i>PabSOC1</i>	<i>PdCBF1</i>	<i>PdCBF2</i>
Gülcan 2	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Hacıalibey	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Halitbey	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Moncayo	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ne Plus Ultra	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Nonpareil	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nurlu	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Primorski	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Supernova	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Teksas	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Yaltinski	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Yavuzeli 19	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Yavuzeli 24	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Yavuzeli 26	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Yavuzeli 28	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Yavuzeli 29	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Yavuzeli 51	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Yavuzeli 102	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Yavuzeli 103	+	-	+	+	+	+	+	-	-
17-4	+	-	-	+	-	+	+	-	-
48-1	-	-	+	+	-	+	+	+	+

5.2 Soğuga Tolerans Özelliği Açısından Sonuçların Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu kısmında, soğuga toleransla ilişkili olarak çalışılan çeşit ve genotiplerin soğuga tolerans özelliğiyle ilişkili genlerin (*PdCBF1* ve *PdCBF2*) Real Time PCR reaksiyonları ile gen ifade düzeyleri bakımından karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Soğuk uygulamasının (-2 °C'de 6 saat) bitkilerde yaratmış olduğu strese bağlı olarak, tüm çalışılan genotiplerde soğuga toleransın gen ifadesi açısından karşılaştırılması yapılmış, geç çiçeklenme yönüyle tüm genotipler, gen ifade düzeyleri açısından değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonucunda geç çiçeklenme yönüyle öne çıkan genotiplerin yanında soğuk stresine tolerans gösteren genotipler de belirlenmiştir.

5.2.1 Gen ifadesi açısından değerlendirme

Farklı bitki türlerinde, *CBF* genlerinin soğuk uygulamasına yönelik gen ifade çalışmalarında (Benedict vd. 2006, El Kayal vd. 2006, Welling ve Palva 2008, Navarro vd. 2009, Wisniewski vd. 2011, Barros vd. 2012, Guo vd. 2014, Mousavi vd. 2014, Huang vd. 2016, Peng vd. 2016) soğuk uygulamasına (-2 °C ile 2 °C arası) maruz bırakılan bitkilerde, *CBF* gen ifadelerinde genellikle artış gözlemlendiği belirtilmektedir. Bununla birlikte; *CBF* geninin yüksek ifade oluşunun şeftali, elma ve Arabidopsis bitkilerinde soğuk stres toleransını artırdığına yönelik yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Vogel vd. 2005, Liang vd. 2013, Jiao vd. 2017).

CBF geni ile ilgili olarak; Çayır salkım otunda (*Poa pratensis* L.) *PpCBF3* gen ifade değişimi soğuk stresi tarafından başlatılmış olup, bu gen kuraklık stresinden etkilenmemiştir (Zhuang vd. 2015). Aynı çalışmada *PpCBF3*-transgenik arabidopsis bitkilerinde ise soğuk toleransında geç çiçeklenmeyle ve yavaş gelişimle birlikte bu gen pozitif yönde bir artış göstermiştir. Başka bir çalışmada (Benedict vd. 2006), yabani kavak (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*) bitkilerinden alınan yaprak ve gövde

örneklerinde 1 hafta boyunca soğuk oda koşullarında (2 °C 16 saat fotoperiyot) tutulduktan sonra 4 *CBF* paralog genlerinin (Bir tek genomda gen ikilenmesi ile oluşmuş ve işlevleri farklılaşmış, benzer genler) mevcut kinetik durumları çalışılmıştır. Bu genlerden, özellikle *PtCBF1-4* genlerinin yaprakta, *PtCBF1* ve *PtCBF3* genlerinin ise gövdede önemli oranda ifadesinin arttığı belirtilmiştir. *PtCBF1* gen ifade seviyeleri her iki doku tipinde de soğuk uygulamasından sonra 6. saatte artış göstermiş ancak sonraki saatlerde ifadesi azalmıştır. *PtCBF3* gen ifadesi ise, soğuk başlangıcından hemen sonra hızlı şekilde artarak 3. saatte en yüksek seviyeye ulaşmış, 6. saat içinde ise başlangıç seviyesine dönmüştür. *PtCBF2* ve *PtCBF4* genleri ise yaprak dokusunda fazla, gövdede zayıf olarak indüklenmiştir. *PtCBF2* gen ifadesi yaprakta soğuk uygulamasından sonra 9. saatte, gövdede 3 ile 6 saat arası en yüksek seviyeye ulaşmıştır. *PtCBF4* ifadesinin ise 3. saatte yüksek düzeye çıktığı belirtilmiştir. Bu durum soğuk stresinde, *CBF* gen paralog genlerinin farklı mekanizmalara yönelik gen ifade değişimlerinin farklı seviyelerde gerçekleştiğini göstermektedir. Kısa süreli (2 saat) soğuk uygulamasının farklı bitki türlerindeki *CBF* gen ifade değişimlerine yönelik yapılan (kontrollü çevre koşulları altında) diğer araştırmalarda (Benedict vd. 2006, El Kayal vd. 2006, Welling ve Palva 2008, Navarro vd. 2009, Wisniewski vd. 2011, Barros vd. 2012), bu genin kısa süreli soğuk stresinde de genellikle ifade artışı gösterdiği vurgulanmıştır. Sıcaklık azalmasından hemen sonra, *CBF* geninin hızlı bir şekilde ifade artışı gösterdiği ve bu zamanın genellikle 2. saat ve sonrasında olduğu belirtilen bu çalışmalar, soğuk uygulaması süresinin (kısa/uzun süre) *CBF* gen ifade artışı durumunda etken role sahip olmadığını gösterir niteliktedir.

Bademe yakın tür olan *Prunus mume* (Japon kayısı) da kısa süreli (30 dk.) düşük sıcaklık (2 °C) uygulaması sonrası farklı sürelerde toplanan (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 168 saat sonra) yapraklarda, özellikle 8-12 saat sonra *PmCBF* genlerinin ifadelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Guo vd. 2014). Aynı türde yapılan diğer çalışmada ise, Guo vd. (2014)' e benzer şekilde 2 °C düşük sıcaklıkta, 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120 saatlerde toplanan genç sürgünlerde *CBF* genlerinde (*PmhCBFa*, *PmhCBFb*, *PmhCBFc*) ifade artışı 2. saatte görülmüş olup, özellikle 12. saat soğuk uygulamasında ise, *CBF* genlerinde ifade artışı en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Peng vd. 2016).

Bademde *CBF* genine yönelik dış koşullarda yapılan gen ifade çalışmasında; Eylül ayından Şubat ortasına kadar 15 gün ara ile, soğuğa maruz kalan 3 farklı badem ağacında, yeşil tomurcuk, pembe tomurcuk ve tam çiçek örnekleri toplanmıştır. Gen ifade analizlerinde, *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN* genleri soğuklama süresince ifade olmuştur (Barros vd. 2012). Aynı çalışmada, her iki yılda da vejetatif tomurcuk patlamasıyla kış döneminde gen ifadesinde azalmanın görüldüğü ifade edilmektedir. Bu süreçteki *PdCBF1*, *PdCBF2* ve *PdDHN* ifade seviyeleri sonbahardaki soğuğa alışma süresine oranla çok daha düşük olmuştur. Bu durum soğuk sinyal yolağının, çiçek tomurcuğu patlamasından sonra, *PdCBF* genleri tarafından baskılandığını belirtmektedir. Tomurcuk patlamasından sonra, sıcaklıklar hala düşük seviyedeysen çiçek tomurcuklarında ve boğumlarda *PdCBF1* ve *PdDHN1* genlerinde keskin bir şekilde gen ifade azalışı bulunmuştur (Barros vd. 2012). Çalışmamızda, *CBF1* geninin ifadesi 43 genotip arasından 13 genotipte (*Amygdalus arabica*, Araban 94, Araban 95, Araban 96, Araban 136, Akbadem, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102, Yavuzeli 103 ve 17-4) artış ($p \leq 0.05$ 'e göre istatistik olarak önemlidir) göstermiştir.

In vitro koşulda, 'Verdeal' erken çiçeklenen badem çeşidinde sürgün ucu soğuk uygulaması sonrasında ise; 1. saat sonrası *PdCBF2* gen ifadesi artarken, 2. saat sonrasında ise *PdCBF1* geni ifadesi artmıştır (Barros vd. 2012). Aynı çalışmada 8. saat sonrasında ise hem *PdCBF2* hem de *PdCBF1* genlerinin ifadesi artış göstermiştir (Barros vd. 2012). Daha önce yapılan *CBF* geni çalışmaları ile (Barros vd. 2012, Guo vd. 2014) uyumlu olarak; çalışmamızda tüm genotiplerde *PdCBF1* ve *PdCBF2* genlerinin ifade artışları ($p \leq 0.05$ 'e göre istatistik olarak önemlidir) 6. saatte başlamış olup, *PdCBF1* geninin ifade artışı 2.15 kat (*Amygdalus orientalis*) ile 99.63 kat (Bertina) arasında görülürken, *PdCBF2* geninin ifade artışı 2.02 kat (Araban 129) ile 78.62 kat (Bertina) arasında görülmüştür. Bu durum, hem *PdCBF1* hem de *PdCBF2* geni bakımından, en yüksek ifade artışı gösteren Bertina çeşidimizin bu ifade artışları ile soğuğa toleranslığı arttırmaya yönelik diğer genotiplere oranla daha yüksek derece savunma yaptığı bu nedenle de bu çeşidin diğer genotiplere göre daha hassas çeşit olabileceği durumunu ortaya çıkarmaktadır.

Bir başka çalışmada, erken ve geç çiçeklenen çiçeklenen badem genotiplerine ait pembe tomurcuklar 0 C° ve -2 C°'de 2 saat boyunca soğuk uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Erken çiçeklenen genotiplerde -2 C°'de *PdCBF1* gen ifadesinde görülen artış, geç çiçeklenen genotiplere oranla daha düşük belirlenmiştir. *PdCBF1* geninin ifadesinin 2 saat sonunda azaldığı belirtilmiştir (Alisoltani vd. 2015). Bu çalışmayla uyumlu olarak çalışmamızda da geç çiçeklendiği bilinen 14 çeşit arasından yalnızca Ferraduel, Gülcan 1 ve Primorski çeşitlerinde, erken çiçeklendiği bilinen 7 çeşit arasından ise yalnızca Akbadem çeşidinde her iki gen (*CBF1* ve *CBF2*) bakımından ifade artışı ($p \leq 0.05$ 'e göre istatistik olarak önemlidir) görülmüştür.

Bu çalışmamızda yer alan badem genotiplerinde soğuk toleransına yönelik *CBF* geni ile ilişkili daha önce yapılmış bir araştırma bulgusu bulunmamaktadır. Bu nedenle bu genle ilişkili olarak çeşitlerin soğuğa toleranslılık düzeyleri hakkında net bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak çalışmamızda kullanılan soğuk toleransı ile ilişkili *CBF* genlerinin her ikisinde de yüksek gen ifade kat sayısı Bertina, Ferragnes, Moncayo, 48-1, Bozkurt, Yavuzeli 24, Nonpareil, Nurlu ve *Amygdalus orientalis* tür ve çeşitlerinde de sırasıyla *CBF1* (99.63, 95.08, 27.69, 12.62, 8.90, 4.00, 3.53, 2.95 ve 2.15 kat) ve *CBF2* genlerinde (78.62, 35.70, 2.35, 14.40, 5.69, 5.63, 2.13, 2.39 ve 18.84 kat) ifade katsayıları belirlenmiştir. Bu durumun nedeni hassas genotiplerin *CBF* genleri bakımından soğuğa toleransın artırılmasına yönelik diğer (dayanıklı) genotiplere oranla daha fazla ifade olması olarak gösterilebilir. Diğer bir deyişle hassas genotiplerde soğuğa tolerans mekanizmasının düzenlenmesi *CBF* genlerinin ifade artışı ile sağlanmaktadır. Farklı türlerde *CBF* genine yönelik yapılan benzer gen ifadesi çalışmaları da (Vogel vd. 2005, Liang vd. 2013, Jiao vd. 2017) bu durumu desteklemektedir. Bununla birlikte, *CBF* genlerinin gen ifade sonuçlarının, soğuğa toleranslık durumunun daha net şekilde ortaya konulması için, detaylı fizyolojik soğuk zararı çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. and Araki, T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309, 1052-1056.
- Abodoma, A. F., Shehata, M. M., Elsherif, N. S., Amar, M. H. and Khar, Kh. A. 2017. Biodiversity assessment for some almond genotypes cultivated in Libya using SRAP and ISSR – *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 46(2); 13-41.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., van Der Straeten, D., Peng, J. and Harberd, N. P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonignals. *Science*, 311, 91-94.
- Achard, P., Renou, J. P., Berthome, R., Harberd, N. P. and Genschik, P. 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, 18, 656-660.
- Açar, İ., Arpacı, S., Atlı, H. S., Kafkas, S., Eti, S., Çağlar, S. ve Yılmaz, A. 2012. Melezleme Yoluyla Kendine Verimli ve Geç Çiçeklenen Badem Islahı. TÜBİTAK TOVAG Proje No: 108O388; Gaziantep.
- Adaskavag, J. E. and Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Anthracnose of Almond and Peach in California. *Phytopathology*, 87(9); 979-987.
- Adrian, J., Torti, S. and Turck, F. 2009. From decision to commitment: the molecular memory of flowering. *Molecular Plant*, 2, 628-642.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X., and Zhu, J. K. 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 37636-37645.
- Agliassa, C., Narayana, R., Berteza, C. M., Rodgers, C. T. and Maffei, M. E. 2018. Reduction of the Geomagnetic Field Delays *Arabidopsis thaliana* Flowering Time Through Downregulation of Flowering-Related Genes. *Bioelectromagnetics*, 39, 361-374.
- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A. and Burgos, L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 162–170.
- Alimohammadi, A., Shiran, B. and Martinez-Gomez, P. 2013. Identification of water-deficit resistance genes in wild almond *Prunus scoparia* using cDNA-AFLP. *Scientia Horticulturae*, 159, 19-28.
- Alisoltani, A., Shiran, B., Fallahi, H. and Ebrahimie, E. 2015. Gene regulatory network in almond (*Prunus dulcis* Mill.) in response to frost stres. *Tree Genetics and Genomes*, 11(5); 1-15.

- Alkan, G., Tekintaş, F. E., Seferoğlu, H. G. ve Ertan, E. 2014. Niğde Altunhisar Yöresi Bademlerinin Seleksiyonu. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(1); 51-55.
- Alkio, M., Jonas, U., Declercq, M., Nocker, S. V. 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* 1, Article number: 11.
- Alonso, J. M., Anson, J. M., Espiau, M. T. and Socias i Company, R. 2005. Determination of endo-dormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 308-318.
- Alonso, J. M. and Socias i Company, R. 2009. Chill and heat requirements for blooming of the CITA almond cultivars. *Acta Horticulturae.*, 814, 215-220.
- Alonso, J. M. 2017. Environmental Requirements, In: *Almonds: Botany, Production and Uses*. Socias i Company, R. and Gradziel, T.M. (eds), CAB International, 254-278, Boston, USA.
- Altun, Z. G. 2006. DNA İşaretleyiciler (Markör) ve Türkiye’de Orman Ağaçları İslahında Kullanımı. *E0AE Dergisi*, 2; 20-36.
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F., Yanofsky, M. F. 2000. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal* 24, 457-466.
- An, L., Lei, H., Shen, X. and Li, T. 2012. Identification and Characterization of *PpLFL*, a Homolog of *FLORICAULA/LEAFY* in Peach (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(6); 1488-1495.
- Anderson, J. L. and Seeley, S. D. 1993. Bloom delay in deciduous fruits. *Horticultural Reviews*, 15, 97-144.
- Andrews, P. K., Proebsting, E. L. and Gross, D. C. 1983. Differential thermal analysis and freezing injury of deacclimating peach and sweet cherry reproductive organs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108, 755-759.
- Anonim. 2020. TÜİK. Web Sitesi. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Erişim Tarihi: 25.02.2019
- Anonymous. 2019a. FAO. Web Sitesi. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim Tarihi: 3.02.2021.
- Anonymous. 2019b. Web Sitesi. <http://www.Hernandorena.com/en/>. Erişim Tarihi: 08.05.2019.
- Aradhya, M. K., Weeks, C. and Simon, C. J. 2004. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 103, 131-144.

- Araki, T. 2001. Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 63-68.
- Arús, P., Ballester, J., Jáuregui, B., Joobeur, T., Truco, M. J., et al. 1998. The European *Prunus* mapping project: update on marker development in almond, pp. 331-338 in *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, edited by Tobutt K. R., Alston F. H., Oxford.
- Arús, P., Gradziel, T., Oliveira, M.M. and Tao, R. 2009. Genomics of Almond. In *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Folta, K.M and Gardiner, S.E. (eds), Springer, 187-219, New York.
- Asins, M. J., Mestre, P., Garcia, J. E., Dicenta, F. and CARBONELL, E. A. 1994. Genotype-environment interaction in QTL analysis of an intervarietal almond cross by means of genetic markers. *Theoi Appi. Genet.*, 89, 358-364.
- Aslantaş, R. 1999. Erzincan şartlarında yetiştirilen bazı badem (*Amygdalus communis* L.) çeşit/klon ve tiplerinin vejetatif ve generatif gelişme ile çiçek tomurcuklarının dona dayanım derecelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aslantaş, R. 2008. Bahçe Bitkilerinin dona dayanıklılık fizyolojisi. Ders Notu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aslantaş, R., Karakurt, H. ve Karakurt, Y. 2010. Bitkilerin Düşük Sıcaklıklara Dayanımında Hüresel ve Moleküler Mekanizmalar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(2);157-167.
- Aşkın, A. 1989. Meyvecilikte Soğuklama İhtiyacı ve Ekolojik Koşullar İle Pazar İsteklerine Uygun Olarak Çeşit Seçimi. Aylık Bilgi Alış Verişi Toplantısı Seminer Notu. 7-11.03.1989, Menemen/ İzmir.
- Atlı, H. S., Arpacı, S., Bozkurt, H., Akgün, A., Aydın, Y., Açar, İ., Bilim, C., Çağlar, S., Kaşka, N., Rastgeldi, U., Karipçin, M. Z., Soylu, M. K. ve Ak, B. E. 2008. Yerli ve Yabancı Değişik Badem Çeşitlerinin GAP Bölgesi Sulu Koşullarında Gelişme, Meyveye Yatma, Verim ve Bazı Kalite Değerlerinin Karşılaştırılması. Sonuç Raporu, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Gaziantep.
- Atkinson, C. J., Brennan, R. M. and Jones, H. G. 2013. Declining chilling and its impact on temperate perennial crops. *Environmental and Experimental Botany*, 91, 48-62.
- Attolico, A. D., and De Tullio, M. C. 2006. Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 462-466.
- Aukerman, M. J. and Sakai, H. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-liket genes. *Plant Cell*, 15, 2730-2741.
- Baker, S. S., Wilhelm, K. S. and Thomashow, M. F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-drought-and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, 24, 701-713.

- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., and Weigel, D. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genetics* 2, 980-989.
- Ballester, J., Boskovic, R., Batlle, I., Arus, P., Vargas, F. and de Vicente, M. C. 1998. Location of the self incompatibility gene on the almond linkage map. *Plant Breeding*, 117, 69-72.
- Ballester, J., Socias i Company, R., Arus, P. and Vicente, M. C. 2001. Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding*, 120, 268-270.
- Bangerth, K. F. 2009. Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Scientia Horticulturae*, 122, 153-163.
- Barros, P., Saibo, N., Martins, M., Ma, R. C. and Oliveira, M. M. 2010. Identification of candidate genes involved in the response to biotic and abiotic stress in almond, XIV Grempra Meeting on Pistachios and Almond, Vol 94, 87-94, Yunanistan.
- Barros, P. M., Gonçalves, N., Nelson, J. M., Saibo, N. J. M. and Oliveira, M. M. 2012. Cold acclimation and floral development in almond bud break: insights into the regulatory pathways. *Journal of Experimental Botany*, 63(12); 4585-4596.
- Barth, C., De Tullio, M. and Conklin, P. L. 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1657-1665.
- Bartolozzi, F., Warburton, M. L., Arulsekhar, S. and Gradziel, T. M. 1998. Genetic Characterization and Relatedness among California Almond Cultivars and Breeding Lines Detected by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal American Society for Horticultural Science*, 123(3); 381-387.
- Baurle, I. and Dean, C. 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125, 655-664.
- Bayazit, S. 2007. Türkiye'nin Farklı Ekolojilerindeki Yabani Badem Genotiplerinde Fenolojik, Morfolojik ve Pomolojik Özellikler ile Moleküler Yapıların Tanımlanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Becker, A. and Theissen, G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 464-489.
- Behnam, B., Kikuchi, A., Celebi-Toprak, F., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Watanabe, K. 2007. *Arabidopsis* rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato. *Plant Cell. Reports*, 26, 1275-1282.
- Benedict, C., Skinner, J.S., Meng, R., Chang, Y., Bhalerao, R., Huner, N.P., Finn, C.E., Chen, T.H. and Hurry, V. 2006. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant and Cell Environment*, 29, 1259-1272.

- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. and Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*, 5, 1147.
- Bharti, S., and Garg, O. P. 1970. Changes in the ascorbic acid content of the lateral buds of soybean in relation to flower induction. *Plant and Cell Physiology*, 11, 723-727.
- Bhat, Z.A., Dhillon, W. S., Rashid, R., Bhat, J. A., Dar, W. A. and Ganaie, M. Y. 2010. The Role of Molecular Markers in Improvement of Fruit Crops. *Not Sci Biol.*, 2(2); 22-30.
- Bianchi, V. J., Sansavini, S. and Fachinello, J. C. 2004. Microsatellite Markers For Identification of *Prunus* spp. Rootstocks. *Scientia Agricola*, 61(3); 303-306.
- Bianchi, V. J., Rubio, M., Trainotti, L., Verde, I., Bonghi, C. and Martinez-Gomez, P. 2015. *Prunus* transcription factors: breeding perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-20.
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R. and Abbott, A. G. 2004. A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *Journal of Heredity*, 95, 436-444.
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. Y., Scorza, R. and Abbott, A. G. 2008. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics and Genomes*, 4(3); 495-507.
- Blazquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I. and Weigel, D. 1997. *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, 124, 3835-3844.
- Blazquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R. and Weigel, D. 1998. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell*, 10, 791-800.
- Bode, R., Ivanov, A. G. and Hüner, N. P. A. 2016. Global transcriptome analyses provide evidence that chloroplast redox state contributes to intracellular as well as long-distance signalling in response to stress and acclimation in *Arabidopsis*. *Photosynthesis Research*, 128, 287-312.
- Bolt, S., Zuther, E., Zintl, S., Hinch, D. K. and Schmulling, T. 2017. *ERF105* is a transcription factor gene of *Arabidopsis thaliana* required for freezing tolerance and cold acclimation. *Plant, Cell and Environment*, 40, 108-120.
- Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G. and Jacquard, A. 2000. Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *Plant Journal*, 24, 103-111.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleißner, R., Wisman, E., Apel, K. and Melzer, S. 2000. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24, 591-599.

- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. and Laurie` re, C. 2004. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 41758-41766.
- Boss, P. K., Bastow, R. M., Mylne, J. S, and Dean, C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, 16(Suppl.); S18-S31.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314-331.
- Bozkurt, H. 2020. Sözlü görüşme. ‘Yerli ve Yabancı Badem Çeşitleri’
- Brewer, R. F. 1978. Frost protection in Almonds, In: *Almond Orchard Management*. Micke, W.C. and Kester, D. (eds), Publication 4092. Division of Agriculture Sciences, University of California, 2-67, Davis, California.
- Browicz, K. and Zieliński, J. 1984. Chorology of trees and shrubs in south-west Asia and adjacent regions, Vol. 4, Polish Scientific Publishers, Warszawa-Poznań. 80 pp.
- Browicz, K. and Zohary, D. 1996. The genus *Amygdalus* L. (*Rosaceae*): Species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 229-247.
- Burke, J. J. 1995. Enzym adaptation to temperature. In: *Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*. Smirnoff, N. (eds), BIOS Scientific Publisher Limited, 63-78.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. and Pfaffl, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3); 597-601.
- Buyukyilmaz, M. and Kester, D. E. (1976) Comparative hardiness of flower buds and blossoms of some almond genotypes in relation to time of bloom and leafing. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 308-318.
- Campalans, A., Pages, M. and Messeguer, R. 2001. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond. *Tree Physiology*, 21, 633-643.
- Campoy, J.A., Ruiz, D. and Egea, J. 2011a. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review. *Scientia Horticulturae*, 130, 357-372.
- Campoy, J. A., Ruiz, D., Egea, J., Rees, J., Celton, J. M. and Martinez-Gomez, P. 2011b. Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 404-410.
- Cangi, R. ve Şen, S. M. 1991. Vezirköprü ve Çevresinde Yetiştirilen Bademlerin Seleksiyon Yoluyla Islahı Üzerine Araştırmalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1/3, 131-152.
- Carmona, M. J., Calonje, M. and Martinez-Zapater, J. M. 2007. The *FT/TFL1* gene family in grapevine. *Plant Molecular Biology*, 63, 637-650.

- Castede, S., Campoy, J. A., Quero García, J., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., Wenden, B. and Dirlwanger, E. 2014. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytologist*, 202, 703-715.
- Catala, R., Medina, J. and Salinas, J. 2011. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 108, 16475-16480.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. and Ecker, J. R. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ethylene-insensitives and related proteins. *Cell*, 89, 1133-1144.
- Chaparro, J. and Beckman, T. 2008. Detection of vegetative bud dormancy QTL in peach. *HortScience*, 43(4); 1269.
- Chen, Y., Chen, Z., Kang, J., Kang, D., Gu, H., and Qin, G. 2013. AtMYB14 regulates cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 87-97.
- Chi, Y., Huang, F., Liu, H., Yang, S., and Yu, D. 2011. An APETALA1-like gene of soybean regulates flowering time and specifies floral organs. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2251-2259.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. H., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J. K. 2003. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 17, 1043-1054.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12, 444-451.
- Cho, L., Yoon, J. and An, G. 2017. The control of flowering time by environmental factors. *The Plant Journal*, 90, 708-719.
- Choi, H., Hong, J.H., Ha, J., Kang, J.Y. and Kim, S.Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723-1730.
- Chow, B. Y., Sanchez, S. E., Breton, G., Pruneda-Paz, J. L., Krogan, N. T. and Kay, S. A. 2014. Transcriptional regulation of LUX by CBF1 mediates cold input to the circadian clock in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 24, 1518-1524.
- Cipriani, G., G. Lot, H. G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger, and R. Testolin. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Basch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 65-72.
- Citadin, L., Raseira, M. C. B., Herter, F. G. and Silva, J. B. 2001. Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience*, 86, 303-307.
- Close, T. J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature, *Physiologia Plantarum*, 100, 291-296.
- Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353, 31-37.

- Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O. and Thomashow, M. F. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101, 15243-15248.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. and Coupland, G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(5827); 1030-1033.
- Courajou, J. 1995. Genetic studies of quantitative characters in apricot. *Scientia Horticulturae*, 61, 61-75.
- Couvillon, G. A. and Erez, A. 1985. Influenced of prolonged exposure to chilling temperatures on bud break and heat requirement for bloom of several fruit species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 47-50.
- Crockett, P. A., Bhalla, P. L., Lee, C. K. and Singh, M. B. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) cultivar. *Genome*, 43, 317-332.
- Crosatti, C., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E. and Cattivelli, L. 2013. Harden the chloroplast to protect the plant. *Physiologia Plantarum*, 147, 55-63.
- Cseke, L. J., Zheng, J. and Podila, G. K. 2003. Characterization of PTM5 in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene*, 318, 55-67.
- Cubero, B., Nakagawa, Y., Jiang, X. Y., Miura, K. J., Li, F., Raghothama, K. G., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. 2009. The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the golgi apparatus of *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2, 535-552.
- Curtis, P. and Wang, X. 1998. A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia*, 113, 299-31.
- Çalışkan, M. 2005. RAPD analizi ile güllerde (*Rosa* sp.) genetik tanımlama. S:8-20.
- Çekiç, Ç. 2000. Markers for positional cloning of seasonal flowering and runner loci in *Fragaria vesca* L. The Thesis of Doctor of Philosophy. Department of Horticultural and Landscape, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6 6AS, UK.
- Dangl, G. S., Yang, J., Golino, D. A. and Gradziel, T. 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 168,41-48.
- Daniela, A. A. and De Tullio, M. C. 2007. Contrasting effects of increased ascorbate content on growth and development of long-day and short-day grown *Brassica rapa*. *Caryologia*, 60, 185-187.
- Dal Bosco, C., Busconi, M., Govoni, C., Baldi, P., Stanca, A.M., Crosatti, C., Bassi, R. and Cattivelli, L. 2003. COR gene expression in barley mutants affected in chloroplast development and photosynthetic electron transport. *Plant Physiology*, 131, 793-802.

- Davis, S. J. 2009. Integrating hormones into the floral-transition pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 32, 1201-1210.
- Decroocq, V., Zhu, X., Kauffman, M., Kyojuka, J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. and Llewellyn, D. J. 1999. A TM3-like MADS-box gene from Eucalyptus expressed in both vegetative and reproductive tissues. *Gene*, 228, 155-160.
- Devran, Z. 2003. Moleküler işaretleyicilerin dayanıklılık ıslahında kullanılması. *Derim Dergisi*, 20(1); 1-6.
- Dicenta, F., Garcia, J. E. and Carbonell, E. A. 1993. Heritability of flowering, productivity and maturity in almond. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 68, 113-120.
- Dicenta, F., Sanchez-Perez, R., Rubio, M., Egea, J., Batlle, I., Miarnau, X., Palasciano, M., Lipari, E., Confolent, C., Martinez-Gomez, P. and Duval, H. 2015. The origin of the self-compatible almond 'Guara'. *Scientia Horticulturae*, 197, 1-4.
- Dicenta, F., Sanchez-Perez, R., Batlle, I. and Martinez-Gomez, P. 2017. Late-blooming Cultivar Development, In: *Almonds: Botany, Production and Uses*. Socias i Company, R. and Gradziel, T.M. (eds), CAB International, 168-187, Boston, USA.
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z., and Yang, S. 2015. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*. *De. Cell*, 32, 278-289.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joubert, T., Garriga-Caldera, F., Cosson, P., Howad, W. and Arus, P. 2003. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101(26); 9891-9896.
- Dirlewanger, E., Quero-García, J., Le Dantec, L., Lambert, P., Ruiz, D., Dondini, L., Illa, E., Quilot-Turion, B., Audergon, J. M., Tartarini, S., Letourmy, P. and Arus, P. 2012. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity*, 109, 280-292.
- Distefano, G., Caruso, M., Malfa, S., Ferrante, T., Signore, B., Gentile, A. and Sottile, F. 2013. Genetic diversity and relationships among Italian and foreign almond germplasm as revealed by microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, 162, 305-312.
- Doherty, C. J., van Buskirk, H. A., Myers, S. J. and Thomashow, M. F. 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21, 972-984.
- Dokuzoğuz, M. and Gülcan, R. 1979. Badem Yetiştiriciliği ve Sorunları. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu XV. Kuruluş Yılı Bilimsel Yayınları No:432, Ankara.

- Dong, C. H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. and Zhu, J. K. 2006. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 103, 8281-8286.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull*, 19, 11-15.
- Dou, M., Cheng, S., Zhao, B., Xuan, Y. and Shao, M. 2016. The indeterminate domain protein ROC1 regulates chilling tolerance via activation of DREB1B/CBF1 in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3); 233.
- Dure, L. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation, *The Plant Journal*, 3, 363-369.
- Eckardt, N. A. 2009. CAMTA proteins: a direct link between calcium signals and cold acclimation? *Plant Cell*, 21, 697.
- Edwards, K. D., Anderson, P. E., Hall, A., Salathia, N. S., Locke, J. C. W., Lynn, J. R., Straume, M., Smith, J. Q. and Millar, A. J. 2006. FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 18, 639-650.
- Egea, J., Ortega, E., Martínez-Gómez, P. and Dicenta, F. 2003. Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 79-85.
- Eldem, V., Akçay, U. Ç., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S. and Unver, T. 2012. Genome-wide Identification of miRNAs Responsive to Drought in Peach (*Prunus persica*) by High-Throughput Deep Sequencing. *PlosOne*, 7(12); 1-14.
- Elhamzaoui, A., Oukabli, A., Charafi, J. and Mounni, M. M. 2012. Assesment of genetic diversity of Moroccan cultivated almond in its area of extreme diffusion using nuclear microsatellites. *American Journal of Plant Sciences*, 3,1294-1303.
- El Kayal, W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C., Teulieres, C. 2006. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2455-2469.
- El-Sharkawy, I., Sherif, S., Mila, I., Bouzayen, M. and Jayasankar, S. 2009. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, 60(3); 907-22.
- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., Omura, M. 2005. Ectopic expression of an *FT* homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 14, 703-712.
- Enrenreich, I. M., Hanzawa, Y., Chou, L., Roe, J. L., Kover, P. X., Purugganan, M. D. 2009. Candidate gene association mapping of *Arabidopsis* flowering time. *Genetics* 183, 325-335.

- Ensminger, I., Busch, F. and Hüner, N. P. A. 2006. Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 126, 28-44.
- Eremina, M., Unterholzner, S. J., Rathnayake, A. I., Castellanos, M., Khan, M., Kugler, K. G., May, S. T., Mayer, K. F., Rozhon, W. and Poppenberger, B. 2016. Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. *Proceedings of National Academy Sciences*, 113, 5982-5991.
- Erez, A. and Couvillion, G. A. 1987. Characterization of the influence of moderate temperatures on rest completion in peach. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 112, 677-680.
- Ergon, A. 2017. Optimal Regulation of the Balance between Productivity and Overwintering of Perennial Grasses in a Warmer Climate. *Agronomy*, 7(19); 1-15.
- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Esumi, T., Hagihara, C., Kitamura, Y., Yamane, H. and Tao, R. 2009. Identification of an FT ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Scientia Horticulturae*, 125(4); 608-616.
- Fan, S., Bielenberg, D. G., Zhebentyayeva, T. N., Reighard, G. L., Okie, W. R., Holland, D. and Abbott, A. G. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytologist*, 185, 917-930.
- Fathi, A., Ghareyazi, B., Haghazari, A., Ghaffari, M. R., Pirseyedi, S. M., Kadkhodaei, S., Naghouri, M. R. and Mardi, M. 2008. Assessment of the genetic diversity of almond (*P.dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(2); 98-106.
- Felipe, A. J. 1988. Observaciones sobre comportamiento frente a heladas tardías en almendro. *Rap. EUR*, 11557, 123-130.
- Felipe, A. J. 2000. El almendro: El material vegetal. *Integrum*. Lerida, Spain.
- Fernandez i Marti, A., Alonso, J. M., Espiau, M. T., Rubio-Cabetas, M. J., and Socias i Company, R. 2009. Genetic Diversity in Spanish and Foreign Almond Germplasm Assessed by Molecular Characterization with Simple Sequence Repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(5); 535-542.
- Filiz, E. ve Koç, İ. 2011. Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2); 207-214.
- Foolad, M. R., Arulsekar, S. and Becerra, V. 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *BMC Genetics*, 13: 47.
- Font i Forcada, C., Marti, A. F. and Socias i Company, R. 2012. Mapping quantitative trait loci for kernel composition in almond. *BMC Genetics*, 13:47.

- Foucher, F., Chevalier, M., Corre, C., Soufflet-Fresion, V., Legeal, F. and Hibrand-Saint Oyant, L. 2008. New resources for studying the rose flowering process. *Genome*, 51, 827-837.
- Fowler, S. and Thomashow, M. F. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
- Fowler, S. G., Cook, D., and Thomashow, M. F. 2005. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology*, 137, 961-968.
- Förster, H. and Adaskaveg, J. E. 1999. Identification of Subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and Epidemiology of Almond Anthracnose in California. *Phytopathology*, 89(11);1056-1065.
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A. M., Galiba, G., Toth, B., Hayes, P. M., Skinner, J. S. and Pecchioni, N. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 670-680.
- Freeman, M. W. and Martin, G. C. 1981. Peach floral budbreak and abscisic acid content as affected by mist, light and temperature during rest. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106, 333-336.
- Fujii, H. and Zhu, J. K. 2009. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8380-8385.
- Fursova, O. V., Pogorelko, G. V. and Tarasov, V. A. 2009. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 429, 98-103.
- Garcia-Pallas, I., Val, J. and Blanco, A. 2001. The inhibition of flower bud differentiation in 'Crimson Gold' nectarine with GA3 as an alternative to hand thinning. *Scientia Horticulturae*, 90, 265-278.
- Gaveliene, V., Novickiene, L. and Pakalniskyte, L. 2013. Effect of auxin physiological analogues on rapeseed (*Brassica napus*) cold hardening, seed yield and quality. *Journal of Plant Research*, 126, 283-292.
- Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J. Salazar, M. P., Houghton, J. M. and Thomashow, M. F. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16(4); 433-442.
- Gilmour, S. J., Fowler, S. G. and Thomashow, M. F. 2004. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology*, 54, 767-781.
- Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6); 503-12.

- Gradziel, T., Martinez-Gomez, P., Dicenta, F. and Kester, D. E. 2001. The utilization of related *Prunus* species for almond variety improvement. *Journal of American Pomological Society*, 55, 100-108.
- Gradziel, T. M. 2017. History of Cultivation, In: Almonds: Botany, Production and Uses. Socias i Company, R. and Gradziel, T. M. (eds), CAB International, 43-65, Boston, USA,
- Grasselly, C. 1976. Les especes sauvages d'amandiers. *Options Mediterraneennes*, 32, 28-43.
- Grassely, C. 1978. Observations sur l'utilisation d'un mutant d'amandier a' floraison tardive dans un programme d'hybridation. *Ann Amelior PLant*, 28, 685-695.
- Grassely, C. and Crossa-Raynaud, R. 1980. L'amandier. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris.
- Godini, A. 2000. About the possible relationship between *Amygdalus webbii* Spach and *Amygdalus communis* L. *Nucis* 9, 17-19.
- Gouta, H., Ksia, E., Buhner, T., Moreno, M. A., Zarrouk, M., Mliki, A. and Gogorcena, Y. 2010. Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers. *Hereditas*, 147, 283-292.
- Guo, C., Zhang, J. Q., Peng, T., Bao, M. Z. and Zhang, J. W. 2014. Structural and expression analyses of three *PmCBFs* from *Prunus mume*. *Biologia Plantarum*, 58, 247-255.
- Gurdian, R. J. and Biggs, R. H. 1964. Effect of low temperature on terminating bud dormancy of Okinawa, Flordawon, Flordahome and Nemaguard peaches. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 77, 370-379.
- Guttridge, C. G. 1985. *Fragaria x ananassa*. In: Handbook of flowering. Halevy, A. H. (eds), FL: CRC Press, 16-23, Boca Raton.
- Guy, C. L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism, *Annual Review of Plant Physiology*, 41, 187-223.
- Gülcan, R. 1976. Seçilmiş badem tipleri üzerinde fizyolojik ve morfolojik araştırmalar. *Ege Üniv. Matbaası*, 72, Bornova-İzmir.
- Gülcan, R. 1985. Almond Descriptors. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, 30, Rome.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J. L., Pineda, O., Thomashow, M. F. and Zhang, J. Z. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 130, 639-648.
- Habu, T., Yamane, H., Igarashi, K., Hamada, K., Yano, K. and Tao, R. 2012. 454-Pyrosequencing of the transcriptome in leaf and flower buds of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) at different dormant stages. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, 81(3); 239-250.
- Hansche, P. E., Hesse, C. O. and Beres, V. 1972. Estimates of genetic and environmental effect of several traits in peach. *Proceedings of American Society for Horticultural Science*, 97, 76-79.

- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. and Huijser, P. 2000. Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 21, 351-360.
- Hassankhah, A., Rahemi, M., Ramshini, H., Sarikhani, S. and Vahdati, K. 2020. Flowering in Persian walnut: patterns of gene expression during flower development, *BMC Plant Biology*, 20,136.
- Hättasch, C., Flachowsky, H., Hanke, M.V., Lehmann, S., Gau, A. and Kapturska, D. 2008. The switch to flowering: genes involved in floral induction of the apple cultivar 'Pinova' and the role of the flowering gene MdFT. *Acta Hort.*, 839, 701-5.
- Hayama, R. and Coupland, G. 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 13-19.
- He, Y., Michaels, S. D. and Amasino, R. D. M. 2003. Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science*, 302, 1751-1754.
- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, L., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M. and Pei, Z. M. 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305(5692); 1968-1971.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10); 986-94.
- Henry, R. J. 1997. *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman & Hall, London
- Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. and Coupland, G. 2002. Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21, 4327-4337.
- Heuer, S., Hansen, S., Bantin, J., Brettschneider, R., Kranz, E., Lörz, H. and Dresselhaus, T. 2001. The maize MADS box gene *ZmMADS3* affects node number and spikelet development and is co-expressed with *ZmMADS1* during flower development, in egg cells and early embryogenesis. *Plant Physiology*, 127, 33-45.
- Hisamatsu, T. and King, R. W. 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for *FLOWERING LOCUS T (FT)* and gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 59, 3821-3829.
- Hosseinpour, B., Sepahvand, S., Aliabad, A. K., Bakhtiarizadeh, M., Imani, A., Assareh, R. and Salami, S. A. 2018. Transcriptome profiling of fully open flowers in a frost-tolerant almond genotype in response to freezing stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 293, 151-163.
- Howarth, C. J. and Ougham, H. J. 1993. Gene expression under temperature stress. *New Phytologists*, 125, 1-26.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F. and Yu, D. 2013. Jasmonate regulates the inducer of *cbf* expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor 1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 2907-2924.

- Huang, J. G., Yang, M., Liu, P., Yang, G. D., Wu, C. A. and Zheng, C. C. 2009. *GhDREB1* enhances abiotic stress tolerance, delays GA-mediated development and represses cytokinin signalling in transgenic Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 32, 1132-1145.
- Huang, Z., He, J., Zhong, X. J., Guo, H. D., Jin, S. H., Li, X., and Sun, L. X. 2016. Molecular cloning and characterization of a novel freezing-inducible DREB1/CBF transcription factor gene in boreal plant iceland poppy (*Papaver nudicaule*), *Genetics and Molecular Biology*, 39, 616-628.
- Imani, A. and Mahamadkhani, Y. 2011. Characteristics of Almond Selections in Relation to Late Frost Spring. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2 (2); 31-34.
- Imani, A., Barzegar, K. and Piripireivatlou, S. 2011. Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2, 22-26.
- Ingram, J. and Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, 47, 377-403.
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B. and Zhu, J. K. 1998. HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis, *Plant Cell*, 10, 1151-1161.
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 47, 141-153.
- Jagadish, S.K., Bahuguna, R. N., Djanaguiraman, M., Gamuyao, R., Prasad, P. V. and Craufurd, P. Q. 2016. Implications of high temperature and elevated CO₂ on flowering time in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 913.
- Jauregui, B., Vicente, M. C., Messeguer, R., Felipe, A., Bonnet, A., Salesses, G. and Arus, P. 2001. A reciprocal translocation between ‘Garfi’ almond and ‘Nemared’ peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1169-1176.
- Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Gong, Z. and Yang, S. 2016. The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBF REGULONS in Arabidopsis. *New Phytologist*, 212, 345-353.
- Jiang, Y., Peng, D., Bai, L. P., Ma, H., Chen, L. J., Zhao, M. H., Xu, Z. J. and Guo, Z. F. 2013. Molecular switch for cold acclimation-anatomy of the cold-inducible promoter in plants. *Biochemistry*, 235, 1091-1105.
- Jiao, Y., Shen, Z. and Yan, J. 2017. Transcriptome analysis of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) stigma in response to low-temperature stress with digital gene expression profiling. *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology*, 26(2); 141-148.
- Jiménez, S., Reighard, G. L. and Bielenberg, D. G. 2010. Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Molecular Biology*, 73(1-2); 157-67.

- Joobeur, T., Viruel, M. A., Vicente, M. C., Jauregui, B., Ballester, J., Dettori, M. T., Verde, I., Truco, M. J., Messeguer, R., Battle, I., Quarta, R., Dirlewanger, E. and Arffls, P. 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond peach F2 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1034-1041.
- Joobeur, T., Periam, N., Vicente, M. C., King, G. J. and Arus, P. 2000. Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome* 43, 649-655.
- Jung, C. and Müller, A. E. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.* 14, 563-573.
- Jung, J. H., Ju, Y., Seo, P. J., Lee, J. H. and Park, C. M. 2012. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69, 577-588.
- Kadkhodaei, S., Elahy, M., Nekouei, M. K., Imani, A., Shahnazari, M., Mardi, M., Javanmard, A. and Ariff, A. B. 2010. A panel of cultivate specific marker based on polymorphisms at microsatellite markers for Iranian cultivated Almonds, *AJCS*, 4(9); 730-736.
- Kadkhodaei, S., Shahnazari, M., Nekouei, M. K., Ghasemi, M., Etminani, H., Imani, A. and Ariff, A. B. 2011. A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). *Australian Journal of Crop Science*, 5(1); 82-91.
- Karakurt, H. 2013. Doğu Anadolu Bölgesinden Selekte Edilen Yazlık Elma, Badem ve Ahududu Genotiplerinin AFLP ve SSR Moleküler Primerleri ile Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J. and Weigel, D. 1999. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 286, 1962-1965.
- Kaşka, N., Küden, A. B. and Küden, A. 1998. Performances of Some Local and Foreign Almond Cultivars in South East Anatolia. X GREMPA Seminar, Options Mediterraneennes, 33, 181-183.
- Kaşka, N. 2001. Southeast Anatolia can be an important almond growing region of Turkey. XI. GREMPA Seminar on pistachios and almonds, Options Mediterraneennes, 56, 87-90.
- Kaya, O., Köse, C. and Şahin, M. 2021. The use of differential thermal analysis in determining the critical temperatures of sweet cherry (*Prunus avium* L.) flower buds at different stages of bud burst. *International Journal of Biometeorology*
- Kellerhals, M., Koch, T. and Gessler, C. 2000. Virulence Pattern of *Venturia inaequalis* Field Isolates and Corresponding Differential Resistance in *Malus x domestica*. Swiss Federal Research Station for Fruit-Growing, Wädenswil, Switzerland.

- Kendall, E. J. and McKersie, B. D. 1989. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiol. Plant*, 76, 86-94.
- Kester, D. E. 1965. Inheritance of time of bloom in certain progenies of almond. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 87, 214-221.
- Kester, D. E, Raddi, P. and Asay, R. 1973. Correlation among chilling requirements for germination, blooming and leafing in almond (*Prunus amygdalus* Batsch). *Genetics* 74, 135.
- Kester, D. E. and Asay, R. 1975. Almonds. In: *Advances in Fruit Breeding*, Janick, J. and Moore, J. N. (eds), Purdue University Press, 387-419, West Lafayette, Indiana.
- Kester, D. E. and Gradziel, T. M. 1996. Almonds. In: *Fruit Breeding Volume III: Nuts*, Janick, J. and Moore, J. N. (eds), Wiley, 1-97, New York, USA.
- Khan, M. R. G., Ai, X. and Zhang, J. 2014a. Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(3); 347-359.
- Khan, M., Rozhon, W., Unterholzner, S. J., Chen, T., Eremina, M., Wurzinger, B., Bachmair, A., Teige, M., Sieberer, T., Isono, E., and Poppenberger, B. 2014b. Interplay between phosphorylation and SUMOylation events determines CESTA protein fate in brassinosteroid signalling. *Nature Communications*, 5, 4687.
- King, R. W., Moritz, T., Evans, L. T., Martin, J., Andersen, C. H., Blundell, C., Karailsky, I. and Chandler, P. M. 2006. Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the FLOWERING LOCUS T gene. *Plant Physiology*, 141, 498-507.
- Kitamura, Y., Takeuchi, T., Yamane, H. and Tao, R. 2016. Simultaneous down-regulation of DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box6 and SOC1 during dormancy release in Japanese apricot (*Prunus mume*) flower buds. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91, 476-482.
- Kitamura, Y. 2017. Studies on the temperature requirements for flower bud dormancy release in *Prunus mume*. Thesis or Dissertation, Kyoto University, Japan.
- Knight, H., Zarka, D. G., Okamoto, H., Thomashow, M. E. and Knight, M. R. 2004. Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiology*, 135, 1710-1717.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960-1962.
- Kodad, O. and Socias i Company, R. 2004. Differential flower and fruit damages by spring frosts in almond. *Nucis*, 12, 5-7.
- Kodad, O. and Socias i Company, R. 2005. Daños diferenciales por heladas en flores y frutos y criterios de selección para la tolerancia a heladas en el almendro. *Información Técnica Económica Agraria*, 101, 349-365.

- Kodad, O., Morales, F. and Socias i Company, R. 2010. Evaluation of almond flower tolerance to frost by chlorophyll fluorescence. *Options Méditerranéennes, Série A 94*, 141-145.
- Korves, T. M. and Bergelson, J. 2003. A developmental response to pathogen infection in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133, 339-347.
- Korzun, V. and Ebmeyer, E. 2003. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Rome, Italy. p: 140-143.
- Köse, M. 2013. Erzurum İli İspir İlçesinde Doğal Olarak Yetişen Badem Tiplerinin Seleksiyon Yolu İle İslahı ve Seçilen Tiplerde RAPD Yöntemiyle Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum.
- Krebs, J. A., Wu, Y., Chang, H. S, Zhu, T., Wang, X. and Harper, J. F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130, 2129-2141.
- Kubien, D. S., von Caemmerer, S., Furbank, R. T. and Sage, R. F. 2003. C4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of rubisco, *Plant Physiology*, 132, 1577-1585.
- Kulkarni, V. J. 1988. Chemical control of tree vigour and the promotion of flowering and fruiting in mango (*Mangifera indica* L.) using paclobutrazol. *J. Horticultural Science*, 63, 557-566.
- Kurar, E. 2001. Comparative physical and linkage mapping of bovine chromosome 24 with human chromosome 18. Doktora Tezi (PhD Thesis). University of Wisconsin-Madison.
- Küden, A. B. ve Tanrıver, E. 1996. Şeftalilerde Değişik İslah Yöntemleriyle Yeni Çeşit Eldesi ve İzoenzim Analizleri ile Genotiplerinin Tanımlanması. *Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(4);183-192.
- Küden, A. B., Küden, A., Paydaş, S., Kaşka N. ve İmrak B. 1998. Bazı ılıman iklim meyve tür ve çeşitlerinin soğuğa dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. *Turkish Journal of Agriculture ve Forestry*, 22, 101-109.
- Küden, A. B. ve Küden, A. 2000. Badem Yetiştiriciliği. TÜBİTAK, TARP Projesi Yayınları, 18, Adana.
- Küden, A., Küden, A., Mendi, Y. Y., Kaçar, Y. A., Bayazit, S., Çömlekçioğlu, S. ve İmrak, B. 2005. Farklı Ekolojilerdeki Badem Genotiplerinde Bitkisel ve Moleküler Özelliklerin Tanımlanması. TÜBİTAK Proje No: TOGTAG-3063.
- Küden, A. B., Küden, A., Bayazit, S., Çömlekçioğlu, S., İmrak, B. ve Dikkaya, Y. 2014. Badem Yetiştiriciliği. TAGEP Proje No: 5.2.3.1.
- Lalli, D. A., Decroocq, V., Blenda, A. V., Schurdi-Levraud, V., Garay, L., Le Gall, O., Damsteegt, V., Reighard, G. L. and Abbott, A. G. 2005. Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(8); 1504-1513.

- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 109-136.
- Lamp, B.M., Connell, J.H., Duncan, R.A., Viveros, M. and Polito, V.S. 2001. Almond flower development: floral initiation and organogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 689-696.
- Lang, A. 1957. The effect of gibberellin upon flower formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 43, 709-717.
- Lang, G. A., Early, J. D., Martin, G. C. and Darrell, R. L. 1987. Endo,-para,-and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22, 371-377.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M. and Lee, I. 2000. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS-domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 14, 2366-2376.
- Lee, B. H., Henderson, D. A. and Zhu, J. K. 2005. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17, 3155-3175.
- Lee, J. and Lee, I. J. 2010. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot.*, 61(9); 2247-54.
- Lee, H., Yoo, S. J., Lee, J. H., Kim, W., Yoo, S. K., Fitzgerald, H., Carrington, J.C., Ahn, J. H. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 38, 3081-3093.
- Lee, S. C. and Luan, S. 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment*, 35, 53-60.
- Lee, H. G. and Seo, P. J. 2015. The MYB96-HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF-COR pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 82, 962-977.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D. and Douglas, G. C. 1998. Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. Robur* L.) at Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica*, 47, 5-6.
- Lenahan, O. M., Whiting, M. D. and Elfving, D.C. 2006. Gibberellic acid inhibits floral bud induction and improves 'Bing' sweet cherry fruit quality. *HortScience*, 41, 654-659.
- Lewitt, J. 1980. Chilling, freezing, and high temperature stresses, In: *Responses of Plants to Environmental Stress*, New York London Toronto: Academic Press.
- Li, K., Wang, Y., Han, C., Zhang, W., Jia, H. and Li, X. 2007. GA signaling and CO/FT regulatory module mediate salt-induced late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 53, 195-206.

- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E. and Yu, H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 15, 110-120.
- Li, X., Tan, D. X., Jiang, D. and Liu, F. 2016a. Melatonin enhances cold tolerance in drought-primed wild-type and abscisic acid- deficient mutant barley. *Journal of Pineal Research*, 61(3); 328-339.
- Li, Y., Xu, Z., Yang, W., Cheng, T., Wang, J. and Zhang, Q. 2016b. Isolation and functional characterization of SOC1-like genes in *Prunus mume*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(4); 315-326.
- Liang, L., Zhang, B., Yin, X., Xu, C., Sun, C. and Chen, K. 2013. Differential Expression of the *CBF* Gene Family During Postharvest Cold Storage and Subsequent Shelf-Life of Peach Fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 1358-1367.
- Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S. and Yanofsky, M. F. 1999. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant*, 1, 1007-1018.
- Lissarre, M., Ohta, M., Sato, A. and Miura, K. 2010. Cold-Responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 5, 948-952.
- Liu, B. H. 1998. *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press LLC, 648 p., Boca Raton New York.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1391-1406.
- Liu, F., Quesada, V., Crevillen, P., Baurle, I., Swiezewski, S. and Dean, C. 2007. The *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate FLC. *Molecular Cell*, 28, 398-407.
- Liu, C., Chen, H., Er, H. L., Soo, H.M., Kumar, P. P., Han, J. H., Liou, Y. C. and Yu, H. 2008. Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development*, 135, 1481-1491.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C. and Yu, H. 2009. Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell*, 16, 711-722.
- Lord, E. M., and Eckard, K. J. 1987. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington navel orange). II. Alternation of developmental fate of flowering shoots after GA3 treatment. *Botanical Gazette*, 148, 17-22.
- Ma, R-C. and Oliveira, M. 2000. The RNase PD2 gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionarily distinct class of S-like RNase genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 263, 925-933.
- Ma, R., Xie, H., Xu, Y., Ma, Y., Jiang, Y. Q. and Cao, M. Q. 2005. Molecular analysis of almond germplasm in China. XIII Grempa Meeting on Almonds and Pistachios, 63, 281-290.

- Mahood, A. M. R and Hama-Salih, F. M. 2020. Characterization of Genetic Diversity and Relationship in Almond (*Prunus Dulcis* [Mill] D.A. Webb) Genotypes and ISSR Markers in Sulaimani Governorate. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1); 1739-1753.
- Malone, J. and Oliver, B. 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9, 34.
- Manganaris, G. A., Rasori, A., Bassi, D., Geuna, F., Ramina, A., Tonutti, P. and Bonghi, C. 2011. Comparative transcript profiling of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit development and on-tree ripening. *Tree Genetics & Genomes*, 7(3); 609-616.
- Martin, T., Hu, M., Labbe, H., McHugh, S., Svircev, A. and Miki, B. 2006. *PpAG1*, a homolog of AGAMOUS, expressed in developing peach flowers and fruit. *Canadian Journal of Botany*, 84, 767-776.
- Martinez-Gomez, P., Sanchez-perez, R. and Rubio, M. 2012. Clarifying omics concepts, challenges and opportunities for *Prunus* breeding in the post-genomic era. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16, 268-283.
- Martínez-Gómez, P., Prudencio, A. S., Gradziel, T.M. and Dicenta, F. 2017. The delay of flowering time in almond: a review of the combined effect of adaptation, mutation and breeding. *Euphytica*, 213, 197.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Okamoto, M., Kim, J. M., Kurihara, Y., Kawashima, M., Tanaka, M., To, T. K., Nakaminami, K., Kaminuma, E., Endo, T. A., Mochizuki, Y., Kawaguchi, N., Shinozaki, K., Toyoda, T. and Seki, M. 2010. *Arabidopsis* tiling array analysis to identify the stress-responsive genes. *Methods in Molecular Biology*, 639, 141-155.
- Mazur, P. 1969. Freezing injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 20, 419-448.
- McClung, C. R. and Davies, S. J. 2010. Ambient Thermometers in Plants: From Physiological Outputs towards Mechanisms of Thermal Sensing. *Current Biology*, 20, 1086-1092.
- Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Perez-Alonso, M. and Salinas, J. 1999. The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, 119, 463-470.
- Medina, J., Catalá, R. and Salinas, J. 2011. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*, 180, 3-11.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. and Beeckman, T. 2008. Flowering time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 40, 1489-1492.
- Mimida, N., Li, J., Zhang, C., Moriya, S., Moriya-Tanaka, Y., Iwanami, H., Honda, C., Oshino, H., Takagishi, K., Suzuki, A., Komori, S. and Wada, M. 2012. Divergence of TERMINAL FLOWER 1-like genes in Rosaceae. *Biologia Plantarum*, 56, 465-472.

- MirAli, N. and Nabulsi, I. 2003. Genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. *Scientia Horticulturae*, 98, 461-471.
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E. N., Bressan, R. A., Yun, D. J. and Hasegawa, P. M. 2007. SIZ1-Mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 1403-1414.
- Miura, K., Sato, A., Shiba, H., Kang, S. W., Kamada, H. and Ezura, H. 2012. Accumulation of antioxidants and antioxidant activity in tomato, *Solanum lycopersicum*, are enhanced by the transcription factor SlICE1. *Plant Biotechnology*, 29, 261-269.
- Miura, K. and Furumoto, T. 2013. Cold Signaling and Cold Response in Plants. *Int.J. Mol. Sci.*, 14, 5312-5337.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 86-96.
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R. Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S. G. K. and Lee, I. 2003. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 35, 613-623.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M. and Lee, I. 2005. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 46, 292-299.
- Mouradov, A., Cremer, F. and Coupland, G. 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14(suppl.), s111-s130.
- Mousavi, S., Alisoltani, A., Shiran, B., Fallahi, H., Ebrahimie, E., Imani, A. and Houshmand, S. 2014. De Novo Transcriptome Assembly and Comparative Analysis of Differentially Expressed Genes in *Prunus dulcis* Mill. in Response to Freezing Stress, *PlosOne*, 9(8); 1-13.
- Munoz-Fambuena, N., Mesejo, C., Gonzalez-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E. and Agusti, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by repressing CiFT gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 529-536.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. and Giraudat, J. 2002. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, 14, 3089-3099.
- Münster, T., Faigl, W., Saedler, H. and Theissen, G. 2002. Evolutionary aspects of MADS-box genes in the eusporangiate fern *Ophioglossum*. *Plant Biology* 4, 474-483.
- Nam, J., dePamphilis, C. W., Ma, H. and Nei, M. 2003. Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1435-1447.

- Nam, J., Kim, J., Lee, S., An, G., Ma, H. and Nei, M. 2004. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 1910-1915.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34, 137-148.
- Navarro, M., Marque, G., Ayax, C., Keller, G., Borges, J. P., Marque, C., Teulieres, C. 2009. Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2713-2724.
- Nayyar, H., Chander, K., Kumar, S. and Bains, T. 2005. Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea, *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 381-388.
- Neven, L. G., Haskell, D. W., Hofig, A., Li, Q. B. and Guy, C. L. 1993. Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol. Biol.*, 21, 291-305.
- Nilsen, E. T. and Orcutt, D. M. 1996. *Physiology of Plants Under Stress* (New York Toronto: John Wiley and Sons, Inc.).
- Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Shimizu, T., Omura, M. and Ikoma, Y. 2007. Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*, 58, 3915-3927.
- Niu, S. H., Gao, Q., Li, Z. X., Chen, X. Y. and Li, W. 2014. The role of gibberellin in the CBF1-mediated stress-response pathway. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 852-863.
- Nolan, T., Hands, R. E. and Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3); 1559-82.
- Novillo, F., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and Salinas, J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 3985-3990.
- Novillo, F., Medina, J. and Salinas, J. 2007. *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 21002-21007.
- Oda, A., Narumi, T., Li, T. P., Kando, T., Higuchi, Y., Sumitomo, K., Fukai, S., and Hisamatsu, T. 2012. CsFTL3, a chrysanthemum FLOWERING LOCUS T-like gene, is a key regulator of photoperiodic flowering in chrysanthemums. *J. Exp. Bot.*, 63, 1461-1477.

- Ogawa, K. I., Tasaka, Y., Mino, M., Tanaka, Y. and Iwabuchi, M. 2001. Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 42, 524-530.
- Oh, S. J., Kwon, C. W., Choi, D. W., Song, S. I. and Kim, J. K. 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 646-656.
- Olukolu, B., Trainin, T., Fan, S., Kole, C., Bielenberg, D. and Reighard, G. 2009. Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and budbreak in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Genome*, 52, 819-828.
- Otaghvari, A. M. and Ghaffarian, M. R. 2011. Assessment of genetic diversity in late flowering almond varieties using ISSR molecular markers aimed to select genotypes tolerant to early spring frost in Yazd province. *Curr. Bot.*, 2(1); 01-04.
- Ovesna, J., Polakova, K. and Leisova, L. 2002. DNA analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38 (1); 29-40.
- Owens, C. L., Thomashow, M. F., Hancock, J. F. and Iezzoni, A. F. 2002. *CBF1* Orthologs in Sour Cherry and Strawberry and the Heterologous Expression of *CBF1* in Strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 489-494.
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, 128, Ders Kitabı:11, 486 s.
- Özdemir, B. 2015. Sert Kabuklu Meyve Türlerinde Moleküler Markörlerin Kullanımı. Doktora Semineri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Ankara.
- Özşensoy, Y. ve Kurar, E. 2012. Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(2);11-19.
- Palta, J. P. and Weiss, L. S. 1993. Ice formation and freezing injury: An overview on the survival mechanism and molecular aspects of injury and cold acclimation in herbaceous plants, In: *Advances in Plant Cold Hardiness*.
- Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E. and Kao-Kniffin, J. 2015. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal*, 9, 980-989.
- Parcy, F. 2005. Flowering: a time for integration. *Int. J. Dev. Biol.*, 49, 585-593.
- Pearce, R. S. 1988. Extracellular ice and cell shape in frost- stressed cereal leaves: a low temperature scanning electron microscopy study. *Planta*, 175(3); 313-324.
- Peng, T., Guo, C., Yang, J., Xu, M., Zuo, J., Bao, M. and Zhang, J. 2016. Overexpression of a Mei (*Prunus mume*) CBF gene confers tolerance to freezing and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 126, 373-385.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9); e45.

- Phippen, W. B., Kresovich, S., Candelas, F. G. and McFerson, J. R. 1997. Molecular characterisation can quantify and partition variation among genebank holdings; a case study with phenotypically similar accessions of *Brassica oleracea* var *capitata* L. (cabbage) 'Golden Acre'. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 227-234.
- Pnueli, L., Abu-Abeid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z., Lifschitz, E. 1991. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 1, 255-266.
- Prudencio, A. S., Martinez-Gomez, P. and Dicenta, F. 2018. Evaluation of breaking dormancy, flowering and productivity of extra-late and ultra-late flowering almond cultivars during cold and warm seasons in South-East of Spain. *Scientia Horticulturae*, 235, 39-46.
- Polat, İ., Göçmen, M. ve Onur, C. 1999. Trabzon Hurması Tiplerinin RAPD Markırlarla Belirlenmesi. *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, s: 22-26; Ankara.
- Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuniga, A. and Gonzales, B. 2013. Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plos ONE*, 8, e69435.
- Puckett, E. E., Serapiglia, M. J., DeLeon, A. M., Long, S., Minocha, R. and Smart, L. B. 2012. Differential expression of genes encoding phosphate transporters contributes to arsenic tolerance and accumulation in shrub willow (*Salix* spp.). *Environmental and Experimental Botany*, 75, 248-257.
- Puhakainen, T. 2004. Physiological and molecular analyses of cold acclimation of plants. Department of Biological and Environmental Sciences, Genetics Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Finland.
- Pukacki, P.M., Kendall, E.J., McKersie, B.D., 1991. Membrane injury during freezing stress to winter wheat (*Triticum aestivum* L.) crowns. *J. Plant Physiol.*, 138, 516-521.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. and Coupland, G. 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6); 847-857.
- Putterill, J., Laurie, R. and Macknight, R. 2004. It's time to flower: the genetic control of flowering. *BioEssays*, 26, 363-373.
- Quamme, H. A., Layne, R. E. C. and Ronald, W. G. 1982. Relationship of supercooling to cold hardiness and the northern distribution of several cultivated and native *Prunus* species and hybrids. *Canadian Journal of Plant Science*, 62, 137-148.
- Quamme, H. A. and Gusta, L. V. 1987. Relationship of ice nucleation and water status to freezing patterns in dormant peach flower buds. *HortScience*, 22, 465-467.
- Quero-Garcia, J., Le Dantec, L., Fodor, A., Reignier, A., Capdevilla, G., Joly, J., Tauzin, Y., Fouilhaux, L., Dirlwanger, E. 2010. QTL detection for fruit quality and phenological characters in sweet cherry. 5th International Rosaceae Genomics Conference, Stellenbosch.

- Rahim, M. A., Busatto, N. and Trainotti, L. 2014. Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits. *Planta*, 240(5); 913-29.
- Rasouli, M., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A. and Martinez-Gomez, P. 2014. Identification of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Linked to Flowering Time in Almond by Bulked Segregant Analysis (BSA). Proc. VIth IS on Almonds and Pistachios, *Acta Horticulturae*, 1028, 53-56.
- Rasouli, M., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A. and Martinez-Gomez, P. 2018. Identification of DNA Markers Linked to Blooming Time in Almond. *Journal of Nuts*, 9(2); 105-122.
- Rattigan, K. and Hill, S. J. 1986. Relationship between temperature and flowering in almond. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 26, 399-404.
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C. and Conti, L. 2013. *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*. *Plant Physiology*, 162, 1706-1719.
- Richardson, E. A., Seeley, S. D. and Walker, R. D. 1974. A model estimating the completion of rest for Red Haven and Elberta peach. *HortScience*, 9, 331-332.
- Riechmann, J. L. and Meyerowitz, E. M. 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biological Chemistry*, 378, 1079-1101.
- Rinne, P., Welling, A. and Kaikuranta, P. 1998. Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant, Cell and Environment*, 21, 601-611.
- Roberts, A. V., Blake, P. S., Lewis, R., Taylor, J. M. and Dunstan, D. I. 1999. The effect of gibberellins on flowering in roses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18, 113-119.
- Robinson, P. J. and Jones, R. K. 1972. The effect of phosphorus and sulphur fertilization on the growth and distribution of dry matter, nitrogen, phosphorus, and sulphur in Townsville stylo (*Stylosanthes humilis*). *Crop and Pasture Science*, 23, 633-640.
- Rodríguez, J., Sherman, W. B., Scorza, R., Wisniweski, M., Okie, W. R. 1994. 'Evergreen' peach, its inheritance and dormant behaviour. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 789-792.
- Rom, R. C. and Arrington, E. H. 1966. The effect of varying temperature regimes on degree days to bloom in the 'Elberta' peach. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 88, 239-244.
- Roose, M. L. and Stone, N. K. 1996. Development of genetic markers to identify two asparagus cultivars. *Acta Hort.*, 415, 129-135.
- Ruana, J. and Sonnio, A. 2003. Marker-assisted selection-Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Chapter 1:4-13.

- Rubio, M., Rodríguez-Moreno, L., Ballester, A. R., de Moura, M. C., Bonghi, C., Candresse, T. and Martínez-Gómez, P. 2015. Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Molecular Plant Pathology*, 16(2); 164-76.
- Ruiz, D., Campoy, J. A. and Egea, J. 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 254-263.
- Ruokolainen, S., Ng, Y. P., Albert, V. A., Elomaa, P. and Teeri, T. H. 2011. Over-expression of the *Gerbera hybrida* At-SOC1-like gene Gh-SOC1 leads to floral organ identity deterioration. *Annals of Botany*, 107, 1491-1499.
- Sakai, A. and Larcher, W. 1987. *Frost Survival in Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stress* (New York, USA: Springer-Verlag).
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 998-1009.
- Salazar, J. A., Ruiz, D., Egea, J. and Martínez-Gómez, P. 2013. Inheritance of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 1506-1517.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F. and Couplan, G. 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*, 288, 1613-1616.
- Samach, A. and Wigge, P. A. 2005. Ambient temperature perception in plants. *Journal of Plant Biology*, 8, 483-486.
- Samani, R., Mostafavi, M., Khalighi, A. and Mousavi, A. 2005. Effects of different amounts and application times of soybean oil spray on delaying time blooming of almond, IV International Symposium on Pistachios and Almonds 726, 471-474.
- Sanchez-Bermejo, E., Zhu, W., Tasset, C., Eimer, H., Sureshkumar, S., Singh, R., Sundaramoorthi, V., Colling, L. and Balasubramanian, S. 2015. Genetic architecture of natural variation in thermal responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 169, 647-659.
- Sanchez-Perez, R., Howad, D., Dicenta, F., Arus, P. and Martinez-Gomez, P. 2007. Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond. *Plant Breeding*, 126, 310-318.
- Sanchez-Perez, R., Howad, W., Garcia-Mas, J., Arus, P., Martinez-Gomez, P. and Dicenta, F. 2010. Molecular markers for kernel bitterness in almond. *Tree Genetics and Genomes*, 6; 237-245.
- Sanchez-Perez, R., Dicenta, F. and Martinez-Gomez, P. 2012. Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. *Tree Genetics and Genomes*, 8, 379-389.

- Sanchez-Perez, R., Cueto, J. D., Dicenta, F. and Martinez-Gomez, P. 2014. Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Frontiers in Plant Science*, 5(334); 1-6.
- Santos, A. M., Oliver, M. J., Sánchez, A. M. and Oliveira, M. M. 2012. Expression of almond Knotted1 homologue (PdKn1) anticipates adventitious shoot initiation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 48, 40-49.
- Sarhan, S., Hamed, F., Lawand, S. and Al-Youssef, W. 2015. Relationships among Peach, almond, and related species as detected by SSR/ ISSR markers. *International Journal of ChemTech Research*, 8(1); 82-88.
- Sathe, S. K., Wolf, W. J., Roux, K. H., Teuber, S. S., Venkatachalam, M. and Sze-Tao, K. W. C. 2002. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4333-4341.
- Scalabrelli, G. and Couvillon, G. A. 1986. The effect of temperature and bud type on rest completion and the GDH requirement for budbreak in 'Redhaven' peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111, 537-540.
- Schmid, M., Uhlentaut, N. H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. and Lohmann, J. U. 2003. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, 130, 6001-6012.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *NatureReviews. Genetics*, 5, 63-69.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A. and Coupland, G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 20, 898-912.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. 2002a. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31, 279-292.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. 2002b. Monitoring the expression pattern of around 7000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and Integrative Genomics*, 2, 282-291.
- Sharma, G. and Sharma, N. 2010. Molecular characterization of diversity and relationship among almond cultivars and indigenous selections. *Indian Journal of Biotechnology*, 9; 378-383.

- Shen, X., Zhao, K., Liu, L., Zhang, K., Yuan, H., Liao, X., Wang, Q., Guo, X., Li, F. and Li, T. 2014. A role for PacMYBA in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant and Cell Physiology*, 55(5); 862-80.
- Sherif, S., El-Sharkawy, I., Paliyath, G. and Jayasankar, S. 2013. PpERF3b, a transcriptional repressor from peach, contributes to disease susceptibility and side branching in EAR-dependent and -independent fashions. 32(7); 1111-1124.
- Sherman, W. B. and Rodriguez-Alcazar, J. 1996. Peach tree growth and fruiting as affected by temperature. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 38, 122–126.
- Shewfelt, R.L. 1992. Response of plant membranes to chilling and freezing. IN *Plant Membranes: a biophysical approach to structure, development and senescence*. Y.Y. Leshem, ed. (Dordrecht. Boston, London: Kluwer Academic Publishers), pp. 192-219.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H. and Yang, S. 2012. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24, 2578-2595.
- Shi, Y. and Yang, S. 2014. ABA Regulation of the Cold Stress Response in Plants, In: *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. Zhang, D. P (eds), Springer, 337-363, Dordrecht.
- Shi, H., Qian, Y., Tan, D. X., Reiter, R. J. and He, C. 2015a. Melatonin induces the transcripts of CBF/DREB1s and their involvement in both abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 59, 334-342.
- Shi, Y., Ding, Y. and Yang, S. 2015b. Cold Signal Transduction and Its Interplay with Phytohormones During Cold Acclimation. *Plant Cell Physiology*, 56(1);7-15.
- Shinozaki, M., Swe, K. L. and Takimoto, A. 1988. Varietal difference in the ability to flower in response to poor nutrition and its correlation with chlorogenic acid accumulation in *Pharbitis nil*. *Plant and Cell Physiology*, 29, 611-614.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 217-223.
- Shinwari, Z. K., Nakashima, K., Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1998. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250, 161-170.
- Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayed-Tabatabaei, B. E. and Moradi, H. 2007. Molecular characterization and genetic relationship among cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 280-292.

- Siligato, F., Intrieri, M. C., Delre, T. and Mulero, R. 2004. An In vitro System to Identity and Study Gene Expression In Apple Under Cold Stress Conditions. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics. 15-18 September 2004. SIFV-SIGA Joint Meeting Lecce, Italy
- Silva, C., Garcia-Mas, J., Sanchez, A. M., Arus, P. and Oliveira, M. M. 2005. Looking into flowering time in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb): the candidate gene approach. Theoretical and Applied Genetics, 110, 959-968.
- Simpson, G. G. and Dean, C. 2002. Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time? Science, 296, 285-289.
- Smallwood, M. and Bowles, D. J. 2002. Plants in a cold climate. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 357, 831-847.
- Socias i Company, R. 1990. Breeding self-compatible almonds. Plant Breeding Reviews 8, 313-338.
- Socias i Company, R., Felipe, A. J. and Gómez Aparisi, J. 1996. Genetics of late blooming in almond. EUCARPIA Symp. Fruit Breeding and Genetics, Oxford.
- Socias i Company, R., Felipe, A. J., Gómez Aparisi, J., García, J. E. and Dicenta, F. 1998. The ideotype concept in almond. Acta Horticulturae, 470, 51-56.
- Socias i Company, R. and Felipe, A. J. 1999. ‘Blanquerna’, ‘Cambra’ y ‘Felisia’. Tres nuevos cultivares autogamos de almendro. Inf. Tecn. Econ. Agrar., 95, 111-117.
- Socias i Company, R., Felipe, A. J. and Gómez Aparisi, J. 1999. A major gene for flowering time in almond. Plant Breeding, 118, 443-448.
- Socias i Company, R., Anson, J. M. and Espiau, M. T. 2017. Taxonomy, Botany and Physiology, In: Almonds: Botany, Production and Uses. Socias i Company, R. and Gradziel, T. M. (eds), CAB International, 1-42, Boston, USA.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T. M., Epperson, B. K., Martinez-Gomez, P. and Asadi, E. 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond and its relationships with agronomic traits. Euphytica, 156, 327-344.
- Springer, C. J., and Ward, J. K. 2007. Flowering time and elevated atmospheric CO₂. New Phytologists, 176, 243-255.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A., Scorza, R., 2012. Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar FT1 result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. PLoS One 7, e40715.
- Stanton, M. L., Roy, B. A. and Thede, D. A. 2000. Evolution in stressful environments. I. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stresses. Evolution, 54, 93-111.
- Stushnoff, C. 1972. Breeding and selection methods for cold hardiness in deciduous fruit crops. HortScience, 7, 10-13.

- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. 2001. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410, 1116-1120.
- Sung, S. and Amasino, R. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 4-10.
- Şimşek, M. ve Küden, A. B. 2007. Şanlıurfa'nın Hilvan ilçesinin Bahçecik Köyünde Doğal Olarak Yetişen Bademlerin (*Prunus Amygdalus L.*) Seleksiyon Yoluyla Islahı Üzerinde Bir Araştırma. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1); 125-132.
- Şimşek, M., Osmanoğlu, A. ve Taş, Z. 2010. Çermik'ten Seçilen Badem (*Prunus Amygdalus L.*) Tiplerinin Meyve Performansları. *H.R.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(2); 29-37.
- Tabuenca, M. C. 1972. Necesidades de frio invernal en almendro. *Anales Aula Dei*, 11, 325-329.
- Tabuenca, M. C., Mut, M. and Herrero, J. 1972. Influencia de la temperatura en la epoca de floracion de variedades de almendro. *Anales Aula Dei*, 11, 378-395.
- Takahashi, M. and Morikawa, H. 2014. Nitrogen dioxide is a positive regulator of plant growth. *Plant Signaling and Behaviour*, 9, 1-14.
- Tandre, K., Albert, V. A., Sundas, A. and Engstrom, P. 1995. Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Molecular Biology*, 27, 69-78.
- Tang, M., Tao, Y. B., Fu, Q., Song, Y., Niu, L. and Xu, Z. F. 2016. An ortholog of LEAFY in *Jatropha curcas* regulates flowering time and floral organ development. *Scientific reports*, 6, 37306.
- Tao, Z., Shen, L., Liu, C., Liu, L., Yan, Y. and Yu, H. 2012. Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 70, 549-561.
- Taoka, K. I., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C. and Shimamoto, K. 2013. Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends in Plant Science*, 18, 287-294.
- Tavassolian, I., Rabiei, G., Gregory, D., Mnajja, M., Wirthensohn, M. G., Hunt, P. W., Gibson, J. P., Ford, C. M., Sedgley, M. and Wu, S. 2010. Construction of an almond linkage map in on Australian population NonpareilxLaurenne. *BMC Genomics*, 11(551); 1-10.
- Teng, N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y. and Lin, J. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 172, 92-103.
- Theissen, G. and Saedler, H. 2001. Floral quartets. *Nature*, 409, 469-471.
- Thomashow, M. F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Advance Genetics*, 28, 99-131.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 571-599.

- Thomashow, M. F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, 125, 89-93.
- Tittarelli, A., Santiago, M., Morales, A., Meisel, L. A. and Silva, H. 2009. Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. *BMC Plant Biology*, 9(121); 1-15.
- Tivang, J., Skroch, P. W., Nienhuis, J. and DeVos, N. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121, 783-788.
- Trainin, T., Bar-Ya'akov, I. and Holland, D. 2013. *ParSOC1*, a MADS-box gene closely related to *Arabidopsis AGL20/SOC1*, is expressed in apricot leaves in a diurnal manner and is linked with chilling requirements for dormancy break. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 753-766.
- Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M. V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K. and Malnoy, M. 2010. Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta*, 232, 1039-1324.
- Tromp, J. 1982. Flower-bud formation in apple as affected by various gibberellins. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 57, 277-282.
- Ton, J., Flors, V. and Mauch-Mani, B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14, 310-317.
- Tzonev, R. and Erez, A. 2003. Inheritance of chilling requirement for dormancy completion in apricot vegetative buds. *Acta Horticulturae*, 622, 429-436.
- Vanneste, S. and Friml, J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136, 1005-1016.
- Vargas, F. J. and Romero, M. A. 2001. Blooming time in almond progenies. *Options Méditerranéennes*, 56, 29-34.
- Verde, I., Abbott, A. G. and Scalabrin, S. 2012. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, 45, 487-494.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J., Choveiri, E., Jreijiri, F., Zammar, S., Gelie, B., Bove, J. M. and Garnier, M. 2003. Candidates *Phytoplasma phoenicium* sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emergent lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*, 53, 833-838.
- Veselov, D. S., Kudoyarova, G. R., Kudryakova, N. V. and Kusnetsov, V. V. 2017. Role of cytokinins in stress resistance of plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64, 15-27.
- Viruel, M. A., Messeguer, R., Vicente, M. C., Garcia-Mas, J., Puigdomenech, P., Vargas, F. J. and Arus, P. 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 1, 964-971.

- Vogel, J. T., Zarka, D. G., Van, Buskirk, H. A., Fowler, S. G. and Thomashow, M. F. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 41, 195–211.
- Wada, K. C. and Takeno, K. 2010. Stress-induced flowering. *Plant Signalling and Behaviour*, 5(8); 944-947.
- Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Coleman-Derr, D., Tringe, S. G., Dangl, J. L. and Mitchell-Olds, T. 2014. Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecology Letters*, 17, 717-726.
- Walden, A. R, Wang, D. Y, Walter, C. and Gardner, R. C. 1998. A large family of TM3 MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. *Plant Science*, 138(2); 167-176.
- Wang, D., Karle, R. and Iezzoni, A. F. 2000. QTL analysis of flower and fruit traits in sourcherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 535-544.
- Wang, J. W., Czech, B. and Weigel, D. 2009. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138, 738-749.
- Wang, Y. and Pijut, P. M. 2013. Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER 1 homolog from *Prunus serotina* Ehrh. *Tree Physiology*, 33(8); 855-865.
- Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y. J., Van Oosten, M. J., Zhang, H., Tao, W. A. and Zhu, J. K. 2013. Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 11205-11210.
- Wang, Z., Kang, M., Liu, H., Gao, J., Zhang, Z., Li, Y., Wu, R. and Pang, X. 2014. High level genetic diversity and complex population structure of Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China as revealed by nuclear SSR markers. *PLoS One*, 9(2), e87381.
- Wang, Q., An, B., Wei, Y., Reiter, R. J., Shi, H., Luo, H. and He, C. 2016. Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7(1882); 1-11.
- Wang, D. Z., Jin, Y. N., Ding, X. H., Wang, W. J., Zhai, S. S., Bai, L. P. and Guo, Z. F. 2017. Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants. *Biochemistry*, 82(10); 1444-1462.
- Watson, J. M and Brill, E. M. 2004. *Eucalyptus grandis* has at least two functional SOC1-like floral activator genes. *Functional Plant Biology*, 31, 225-234.
- Weber, J. L. and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.*, 44, 388-396.
- Welling, A. and Palva, E. T. 2008. Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant Physiology*, 147, 1199-1211.

- Wells, C. E., Vendramin, E., Tarodo, S. J., Verde, I. and Bielenberg, D. G. 2015. A genome-wide analysis of MADS-box genes in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *BMC Plant Biology*, 15(41); 1-15.
- Westwood, N. H., 1978. Temperate-zone Pomology. W.H. Feeman, San Francisco, CA.
- Wigge, P. A, Kim, M. C, Jaeger, K. E, Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U. and Weigel, D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309, 1056-1059.
- Wild, M., Daviere, J. M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P. and Achard, P. 2012. The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell*, 24, 3307-3319.
- Williamson, V. M., Ho, J. Y., Wu, F. F., Miller, N. and Kaloshian, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 87, 757-763.
- Wilson, R. N., Heckman, J. W. and Somerville, C. R. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology*, 100, 403-408.
- Winfield, M. O., Lu, C., Wilson, I. D., Coghill, J. A. and Edwards, K.. J. 2010. Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 749-771.
- Winter, K. U, Becker, A., Munster, T., Kim, J. T., Saedler, H. and Theissen, G. 1999. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 7342-7347.
- Wisniewski, M., Nassuth, A., Teulieres, C., Marque, C., Rowland, J., Cao, P. B. and Brown, A. 2014. Genomics of cold hardiness in woody plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33, 92-124.
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T. and Macarisin, D. 2011. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) resulted in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233, 971-983.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1); 75-85.
- Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., Ma, R.C., 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 366-372.
- Xing, W., Wang, Z., Wang, X., Bao, M. and Ning, G. 2014. Over-expression of an FT homolog from *Prunus mume* reduces juvenile phase and induces early flowering in rugosa rose. *Scientia Horticulturae*, 172, 68-72.
- Xiong, L., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 165-183.

- Xu, Y., Ma, R., Xie, H., Liu, J. and Cao, M. 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47; 1091-1104.
- Xue-Xuan, X., Hong-Bo, S., Yuan-Yuan, M., Gang, X., Jun-Na, S., Dong-Gang, G. and Cheng-Jiang, R. 2010. Biological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 222-230.
- Yadav, S. K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 515-527.
- Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Hosaka, Y., Sasaki, R. and Tao, R. 2011. Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach dormancy associated MAD-box genes, by low temperature and dormancy breaking reagent treatment. *Journal of Experimental Botany*, 62(10); 3481-3488.
- Yanovsky, M. J. and Kay, S. A. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, 419, 308-311.
- Yarur, A., Soto, E., Leon, G. and Almeida, A. M. 2016. The sweet cherry (*Prunus avium*) FLOWERING LOCUS T gene is expressed during floral bud determination and can promote flowering in a winter-annual *Arabidopsis* accession. *Plant Reproduction*, 29, 311-322.
- Yıldırım, A. N. 2007. Isparta Yöresi Bademlerinin (*Prunus Amygdalus L.*) Seleksiyonu. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Aydın.
- Yılmaz, A. 2017. Gaziantep ili Araban ve Yavuzeli İlçelerinde Doğal Olarak Yetişen Bademlerin (*Prunus amygdalus* Batsch) Seleksiyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Ankara
- Yi, W., Law, S. E. and Wetzstein, H. Y. 2003. Fungicide sprays can injure the stigmatic surface during receptivity in almond flowers. *Annals of Botany*, 91, 335-341.
- Yoo, S. K., Chung K. S., Kim J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Yoo, S.Y., Lee, J. S. and Ahn, J. H. 2005. Constans activates suppressor of overexpression of constans 1 through flowering Locus T to promote flowering in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol.*, 139(2); 770-8.
- Young, N. D. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.*, 5, 505-510.
- Yüzer, D. 2008. Kahramanmaraşta Badem Cadı Süpürgesi Fitoplazma Hastalığının Moleküler Teşhisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş.
- Zaurov, D. E. 2015. Genetic Resources of Almond Species in The Former USSR. *HortScience*, 50(1); 18-29.
- Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Tooichi, M., Dicenta, F. and Martinez-Gomez, P. 2007. Molecular characterization of almond and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(3-4);242-247.

- Zeinalabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Gradziel, T. M. and Martinez-Gomez, P. 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae*, 125, 593-601.
- Zeller, G., Henz, S. R., Widmer, C. K., Sachsenberg, T., Ratsch, G., Weigel, D. and Laubinger, S. 2009. Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole genome tiling arrays. *Plant Journal*, 58, 1068-1082.
- Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C. M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y. and Sun, T. P. 2007. Global analysis of della direct targets in early gibberellin signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 3037-3057.
- Zhang, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J. and Thomashow, M. F. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 39, 905-919.
- Zhang, J., Yang, W. R., Cheng, T. R., Pan, H. T. and Zhang, Q. X. 2013. Functional and evolutionary analysis of two CBF genes in *Prunus mume*. *Canadian Journal of Plant Science*, 93, 455-464.
- Zhang, Y., Du, W. X., Fregevu, C., Kothary, M. H., Harden, L. and McHugh, T. H. 2014. Expression, purification, and characterization of almond (*Prunus dulcis*) allergen Pru du 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(52); 12695-700.
- Zhang, S., Zhang, D., Fan, S., Du, L., Shen, Y., Xing, L., Li, Y., Ma, J. and Han, M. 2016. Effect of exogenous GA3 and its inhibitor paclobutrazol on floral formation, endogenous hormones, and flowering-associated genes in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 178-186.
- Zhao, S. 1998. Induction of freezing tolerance in Jack Pine seedlings: changes in lipids, oxidation-reduction and antioxidant enzymes during cold acclimation, Department of Botany, Toronto University, PhD Thesis, p166.
- Zhao, S. Z., Luo, Y. Z., Zhang, Z. L., Xu, M. Y., Wang, W. B., Zhao, Y. M., Zhang, L., Fan, Y. L. and Wang, L. 2014. *ZmSOC1*, an MADS-box transcription factor from *Zea mays*, promotes flowering in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 19987-20003.
- Zhao, H., Ye, L., Wang, Y., Zhou, X., Yang, J., Wang, J., Cao, K. and Zou, Z. 2016. Melatonin increases the chilling tolerance of chloroplast in cucumber seedlings by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate-glutathione cycle. *Frontiers in Plant Science*, 7(1814); 1-14.
- Zhou, H., Lin-Wang, K., Wang, H., Gu, C., Dare, A. P., Espley, R. V., He, H., Allan, A. C. and Han, Y. 2015. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant Journal*, 82(1); 105-121.

- Zhou, M., Chen, H., Wei, D., Ma, H. and Lin, J. 2017. Arabidopsis CBF3 and DELLAs positively regulate each other in response to low temperature. *Scientific Reports*, 7(39819); 1-13.
- Zhou, Y., Hu, L., Ye, S., Jiang, L. and Liu, S. 2019. Overexpression of an APETALA1-like gene from cucumber (*Cucumis sativus* L.) induces earlier flowering and abnormal leaf development in transgenic Arabidopsis. *Canadian Journal of Plant Science*, 99(2); 210-220.
- Zhuang, W., Gao, Z., Wang, L., Zhong, W., Ni, Z. and Zhang, Z. 2013. Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *Journal of Experimental Botany*, 64, 4953-4966.
- Zhuang, L., Yuan, X., Chen, Y., Xu, B., Yang, Z. and Huang, B. 2015. *PpCBF3* from cold-tolerant Kentucky bluegrass involved in freezing tolerance associated with up-regulation of cold-related genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, 10, e0132928.
- Zuriaga, E., Soriano, J. M., Zhebentyayeva, T., Romero, C., Dardick, C., Cañizares, J. and Badenes, M. L. 2013. Genomic analysis reveals MATH gene(s) as candidate(s) for Plum pox virus (PPV) resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Plant Pathology*, 14(7); 663-677.