

## Zeytin Mikroçoğaltımı ve Konzervasyonunda Güncel Biyoteknolojik Gelişmeler

Recent Biotechnological Advances in Olive Micropropagation and Conservation

Ergun KAYA, Hülya AKDEMİR, Yelda ÖZDEN

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
Bitki Biyoteknolojisi Labotatuvarı, 41400, Gebze, Kocaeli

Geliş tarihi: 10.10.2010

Kabul tarihi: 03.01.2011

### Özet

Günümüze kadar, zeytin çeşitleri (*Olea europaea* L.) üzerinde geleneksel vejetatif üretim yöntemlerinin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak köklenmede karşılaşılan sorunlar geleneksel yöntemler ile çoğaltılan zeytin bitkisinin üretim verimini azaltmaktadır. Bu problem geleneksel yöntemlere tamamlayıcı olarak biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla aşılabilmektedir. Biyoteknolojik yöntemlerin, türlerin moleküler karakterizasyonunda *in vitro* koşullarda türün hızlı çoğaltımına ve türe ait germ plazmanın orta ve uzun süreli saklanmasına, gen aktarımı çalışmaları ile türe ait köklenme sorununun azaltılmasında kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle bu derlemede zeytin bitkisinin karakterizasyonu, mikroçoğaltımı ve konzervasyonu konularında yapılan güncel biyoteknolojik çalışmalar özetlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler markör, orta dereceli saklama, kriyoprezervasyon

### Abstract

Up to now, several studies were carried out to propagate olive cultivars (*Olea europaea* L.) via traditional vegetative techniques. However, problems faced with rooting of cuttings lower the efficiency of production in traditional propagated olive. This problem can be overcome with using biotechnological methods as a complementary strategy to traditional propagation methods. Biotechnological techniques have potential to be used for molecular characterization and rapid propagation of the species via *in vitro* techniques, medium- and long-term conservation of plant genetic resources and reduction of rooting problems with transgenic studies. Thus, recent biotechnological advances on olive molecular characterization, micropropagation and conservation were summarized in this review.

**Keywords:** Cryopreservation, molecular markers, medium-term conservation

### Giriş

Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin bir bölümünü ve Suriye'yi de içine alan Mezopotamya'nın yukarı kısımları ile Asya'nın güneybatısında yetiştirilen zeytin (*Olea europaea* L.), dünyada kültüre alınan en eski türlerdendir. Zeytinin kültüre alınmasının 5500 yıl önce "Oleaster" olarak bilinen yabancı Akdeniz zeytininin, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika boyunca yayılmaya başlayan insan göçlerini takip ederek başladığı düşünülmektedir (Besnard ve ark., 2001). M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'in doğu kıyılarında kültüre

alınmaya başlanan zeytin bu bölgede kültürlenilen ilk meyve çeşitlerindedir (Zohary ve Spiegel-Roy, 1975).

Günümüzde, dünyanın pek çok ülkesinde yaygın olarak kültürlü yapılmasına karşın, zeytin tipik Akdeniz bitkisi olarak bilinir ve bu bölge bugün yaklaşık 2000 zeytin çeşidi ile dünya zeytinyağı üretiminin %98'ini karşılamaktadır (Bartolini ve Petrucci, 2002). Bu nedenle zeytin özellikle Akdeniz toplumunun beslenmesinde, ekonomisinde ve kültüründe önemli bir role sahiptir (Zamora, 2001).

Zeytin ağaçları, mevsim koşullarına bağlı olmakla birlikte çoğunlukla uzun ömürlü ve herdem yeşil bitkilerdir. Akdeniz iklim koşullarında zeytin ağaçları, sıklıkla verimliliklerini ve hatta canlılıklarını etkileyen özellikle kuraklık gibi birçok abiyotik strese maruz kalsa da (Sofu ve ark., 2004), zeytin ağaçları, sıcak ve kurak, uzun yazları, rüzgarlı kısa kışları ile Akdeniz iklim koşullarına oldukça iyi adapte olmuşlardır. Zeytin bitkisi meyve miktarının indirgenmesi yoluyla yazın su stresine karşı hayatta kalmasını sağlayacak bir mekanizma geliştirmiştir (Rallo, 2009).

Zeytinin kültüre alındığı ülkelerde (başta İspanya, İtalya ve Türkiye olmak üzere) morfolojik olarak birbirine benzer (sinonim) çok sayıda zeytin çeşidi bulunması ve bu çeşitlerin belirlenmesinde karşılaşılan sorunlar, genetik kaynaklar işletmeciliği ve korunmasında birçok sorunun ortaya çıkmasına neden olmuş (Carriero ve ark., 2002), bu nedenle zeytin genetik kaynaklarının hızlı, güncel moleküler teknikler ile etkin bir biçimde karakterizasyonu çok önemlidir. Ayrıca günümüze kadar geleneksel yöntemlerle çelik ya da aşılama yoluyla çoğaltılmaya çalışılan (Fabbri ve ark., 2004) zeytinin köklenmesinin zor ya da kimi sofralık çeşitlerde olduğu gibi olanaksız olması, ticari üretim için bitki doku kültürü temelli biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada, zeytin çeşitlerinin moleküler karakterizasyonu için günümüze kadar uygulanan farklı yöntemlere ek olarak türün biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltımı, orta ve uzun süreli saklanması ve transformasyonu son literatür çalışmaları da göz önünde bulundurularak derlenmiştir.

### **Zeytin Çeşitlerinin Moleküler Karakterizasyonu**

Farklı morfolojik özellik ve coğrafik kökenlere sahip birçok alttürü içeren *Olea europaea* türleri, yağ içerikleri, meyve büyüklükleri ve çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına adaptasyon dereceleri gibi birçok tarımsal özellikleri açısından genetik çeşitlilik gösterirler (Hatzopoulou ve ark., 2002). Zeytin çeşitlerinin birbirinden ayırt edile-

bilmesi ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, zeytin gen kaynaklarının daha iyi işletilmesi ve başarılı yetiştirme programları için önemlidir.

Zeytin genetik kaynaklarının çeşitliliği, geleneksel olarak morfolojik ve fenolojik yollarla belirlenirken, morfolojik verilere tamamlayıcı olarak izozim analizleri de zeytin çeşitlerinin tanımlanması için birçok araştırmacı tarafından (Pontikis ve ark., 1980; Trujillo ve Rallo, 1995; Roselli ve ark., 1990; Seker ve ark., 2005) çalışılmıştır. Bunu takiben, çeşitli DNA marker tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanması ile birçok zeytin çeşidinin kendi aralarında ya da kendi içinde genetik akrabalıklarının ve zeytin biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde (Fabbri ve ark., 1995; Angiolillo ve ark., 1999; Belaj ve ark., 2001; Cipriani ve ark., 2002; Banilas ve ark., 2003) ilerleme sağlamıştır.

Zeytin karakterizasyonunda kullanılan ilk moleküler yöntem, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP; Gallitelli ve ark., 1991) olup, De la Rosa ve ark. tarafından (2003) yapılan çalışmada 'Leccino' ve 'Dolce Agagia' çeşitlerinin melezlenmesiyle 95 bitkinin analizi gerçekleştirilmiştir. Yine çeşit içi ve çeşitler arası farklılıkların belirlenebilmesi için kullanılan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) belirteçleri *Olea* genusunun taksonomik sınıflandırılmasında birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Fabbri ve ark., 1995; Mekuria ve ark., 1999; Gemas ve ark., 2000; Ganino ve Fabbri, 2005; Durgac ve ark., 2010). Tüm bitki genomlarında bulunan ve türler arasında yüksek değişkenlik gösteren tek dizi tekrarlarına (SSR) özgü tasarlanan primerlerle DNA'nın çoğaltılması yöntemine dayanan SSR markerları kodominant belirteçler olup yüksek polimorfizm göstermeleri nedeniyle zeytinin genetik karakterizasyonu (Bandelj ve ark., 2002; Belaj ve ark., 2005; Taamalli ve ark. 2006) çalışmalarında kullanılan bir başka DNA temelli yöntemlerden birisidir. Vos ve ark. (1995) tarafından geliştirilen çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) yöntemi de kültüre alınmış zeytin çeşitleri arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Angiolillo ve ark., 1999; Baldoni ve ark., 2000; Bandelj ve ark., 2004; Owen ve ark., 2005; Montemurro ve ark., 2005; Taamalli ve ark.

2006). Bu yöntemlerin bir arada kullanıldığı çalışmalardan birinde İtalyan ve İspanyol zeytin çeşitleri arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesi için RAPD, AFLP ve SSR yöntemleri bir arada kullanılmıştır (Belaj ve ark., 2003). Moleküler karakterizasyon için kullanılan son yöntemlerden biri olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ilk kez Diaz Bermudez (2005) adlı araştırmacı tarafından 51 zeytin çeşidinin sınıflandırılmasında kullanılmıştır. SCAR (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) (Busconi ve ark., 2006) ve ISSR (Basit Ara Dizi Tekrarları) (Gemmas ve ark., 2004) gibi moleküler yöntemler ise zeytinin karakterizasyonunda kullanılan diğer moleküler belirteçlerdir.

Zeytinin moleküler karakterizasyonunda kullanılan biyokimyasal ve moleküler temelli yöntemlere ait çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan bazı çalışmalar Çizelge 1’de özetlenmiştir.

### **Zeytin Bitkisinin Mikroçoğaltımı ve Biyoteknolojik Uygulamalar**

Günümüzde zeytin yetiştiriciliği yapan pek çok ülkede zeytin, yapraklı gövde veya çeliklerin köklendirilmesiyle ya da gövde filizlerinin, tohumdan gelişen ya da klonal gövdelere aşılama ile çoğaltılmaktadır (Fabbri ve ark., 2004). 1950’lerin ortalarında çelikle çoğaltım yöntemi özellikle İspanya gibi aşılama yönteminin kullanılmadığı ülkelerde yaygınlaşmış ve üretim materyalinin %70’inden daha fazlasının kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bununla birlikte, sofraya zeytini olarak kullanılan çeşitlerin köklenmesi çok zor ya da tümüyle olanaksızdır. Ayrıca, *de novo* olarak oluşmuş kökler de sıklıkla işlevsel değildir. Bu nedenle çeşitlerin klonal çoğaltımı için aşılama en uygulanabilir yöntem olarak görülmektedir.

Günümüze değin, morfolojik bakımdan oldukça yüksek derecede farklılık gösteren binlerce zeytin genotipi kültüre alınmıştır. Bununla birlikte, bu genotiplerin üretiminin gelecekte devamlılığını sağlamada yapılan uygulamaları sınırlayıcı bazı problemlerin (verimliliğin düşük, üretim maliyetinin fazla olması gibi) acilen çözülmesi gereklidir

(Rugini ve Caricato, 1995). Köklenmesi çok zor olan zeytinin ürün verimliliğinin artırılması için, geleneksel yöntemlerin, kısa sürede ve kolaylıkla ticari olarak yüksek miktarlarda bitkinin çoğaltılmasına olanak tanıyan mikroçoğaltım yöntemi gibi biyoteknolojik yaklaşımlarla desteklenmesi gerekmektedir.

Günümüze kadar pek çok meyve türünün doku kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro* çoğaltılmasına karşılık, bazı zeytin çeşitlerinin mikroçoğaltım yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltılması mümkün olmuştur (Rugini ve Fedeli, 1990). Zeytin bitkisinin mikroçoğaltımı ile ilgili ilk bilgiler 1970’lerin ortalarına rastlamaktadır ve bu da tüm zeytin çeşitlerinde uygulanabilecek bir mikroçoğaltım yönteminin kurulması için araştırmacıların kültür ortamının mineral içeriklerinin optimizasyonu üzerinde yaptıkları çalışmalardan ibarettir. Fiorino ve Leva (1986) tarafından standart MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin modifiye edilmesiyle MSI ve Leva ve ark., (1992) tarafından belirlenen yine standart MS besiyerinin modifiye şekli MSM ve Rugini (1984) tarafından belirlenen OM besiyerleri, zeytin mikroçoğaltımı için kullanılan en yaygın besiyerleridir. OM besiyeri, İtalya’da 50’den fazla zeytin çeşidinin *in vitro* koşullarda ticari olarak üretilmesinde kullanılmakta olup, yüksek kalitede üretim ve hızlı bitki gelişimi sağlamıştır (Rugini ve ark., 2006).

Temel mineral içeriğinin yanı sıra bitki büyüme düzenleyicileri, *in vitro* kültür ortamında bir besiyerinin en önemli bileşenlerini oluşturmaktadır. Farklı zeytin çeşitlerinde yapılan çalışmalarda, besiyerine eklenen 6-benziladenin (BA), tidiazuron (TDZ) ve kinetin gibi sentetik bitki büyüme düzenleyicilerinin zeytin bitkisinde kısa gövdelerin ve fazla bazal kallusun oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir (Rugini, 1990). Doğal bir sitokin olan zeatin ise Rugini’nin (1984) ilk çalışmasından günümüze kadar zeytin kültür besiyerlerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Yüksek derecede çoğalma elde etmek için besiyerinde bu bitki büyüme düzenleyicisinin yüksek derişimlerde kullanılması gerektiği rapor edilmiştir. Buna karşılık, zeatinin pahalı oluşu zeytin çoğaltımının üretim

maliyetini arttırmaktadır (Rugini ve Baldoni, 2004). Zeytin mikroçoğaltımında, farklı kombinasyonlarda ve farklı derişimlerde denenen bitki büyüme düzenleyicileri ile yapılan bazı önemli çalışmalar Çizelge 2’de özetlenmiştir.

Zeytin bitkisi, *in vitro* koşullarda çoğaltılmaya çalışıldığında güçlü bir apikal dominans göstermektedir. Bunun sonucu olarak, gövde gelişimi genellikle, tepe tomurcukları yerine, uzayan gövdelerden alınan bir veya iki nodlu parçalar ile olmaktadır. Zeytin çeşidine bağlı olarak, proliferasyon besiyerindeki zeatin derişimi  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  ile  $10 \text{ mg l}^{-1}$  arasında farklılık gösterebilir. Yarı katı besiyeri sistemlerinde, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanılmasında karşılaşılan güçlükler, verim ve maliyet açısından zeytin mikroçoğaltımı için sıvı besiyeri kullanımını ve biyoreaktör sistemleri gibi yarı veya tam otomize edilmiş yeni teknolojilerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Geçici daldırma bioreaktör sistemi (TIS) kullanılarak, zeytin bitkisinin “Canino”, “Ascolana Tenera” ve “Gentile di Larino” çeşitlerinde *in vitro* proliferasyonun arttığı rapor edilmiştir (Lambardi ve ark., 2006). Özden ve ark. (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise “Edremit” yağlık çeşidine ait olgun ağaçlardan alınan nodal tomurcuklar *in vitro* çoğaltım için farklı karbon kaynakları (sukroz, mannitol, glukoz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (zeatin ve dikegulak) eklenerek hem yarı katı hem de geçici daldırma bioreaktör sisteminde çoğaltılmıştır. Elde edilen sonuçlar, mannitol içeren sıvı OM besiyerinde TIS sistemi ile gövdelerde apikal dominansın kırılarak yanıl gövdelerin gelişme gösterdiğini ve çoklu gövde oluşumunun gerçekleştirdiğini göstermiştir. Yine TIS sisteminde besi ortamına zeatine ek olarak, dikegulak eklenmesinin çoklu gövde oluşumu üzerine olumlu etkisi olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmada, zeytin bitkisine ait nodal eksplantlardan en fazla gövde rejenerasyonu ve çoklu gövde oluşumu mannitol, zeatin ve dikegulak içeren sıvı besiyerinde TIS sistemi kullanılarak, elde edilmiştir.

Zeytin mikroçoğaltımını etkileyen önemli besiyeri bileşenlerinden biri de enerji kaynağı olan karbon-

dur. Zeytin mikroçoğaltım besiyerine sukrozla birlikte mannitolün eklenmesinin üretim maliyetine arttırmasına karşılık, proliferasyonu arttırdığı rapor edilmiştir (Leva ve ark., 1992). Benzer şekilde Garcia-Ferriz ve arkadaşları (2002) tarafından “Manzanillo” çeşidinde yapılan bir çalışmada, mannitol kullanımının sürgün uzunluğunda artış ve apikal dominansın kırılmasını sağladığı rapor edilmiştir. Mannitole ek olarak, yapılan *in vitro* çalışmalarda birkaç alt kültür sonrası besiyerine FeEDDHA’ nın eklenmesinin tomurcuk gelişimini ve bunlardan gelişen gövdelerin aynı besiyerinde proliferasyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir (Tsao ve Reed, 2002). Besiyerine eklenen demir (Şekil 1) çok çeşitli enzimatik metabolik işlemlerde rol oynadığından ve *de novo* meristem organizasyonunda ve/veya gövde gelişmesinde görev aldığından, besiyerindeki miktarının optimizasyonu önemlidir. Kültür şartlarını iyileştirmeye yönelik yapılan tüm bu çalışmalar sadece bazı çeşitlerle sınırlı olup henüz tüm zeytin çeşitleri üzerinde uygulanmamıştır.

Zeytin bitkisine yönelik *in vitro* köklenme çalışmalarında ise % 85’e kadar başarı elde edilmiştir (Rugini, 1984). Köklenme çalışmalarında genellikle  $1-4 \text{ mg l}^{-1}$  IBA (indol-3-butirik asit) veya NAA ( $\alpha$ -naftalen asetik asit) kullanılmıştır. Ayrıca steril siyah renkli polikarbonat granüllerle besiyerinin yüzeyini ya da siyah boya ile besiyeri kabını boyamanın da köklenme oranını arttırdığı rapor edilmiştir (Rugini ve ark., 1993; Mencucci, 2003).

Mikroçoğaltım yöntemine ek olarak, mikroaşılama yöntemi de zeytin üretiminde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden biridir. *In vitro* çoğaltılan anaç fideler üzerine gövdelerin mikroaşılması yoluyla gerçekleştirilen mikroçoğaltım çeşitli araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır (Revilla ve ark., 1996; Farahani ve ark., 2006). Trancoso ve ark., (1999) tarafından yapılan çalışmada “Arbequina” çeşidine ait *in vitro* fideler üzerine aşılama “Canivano” çeşidine ait gövdelerden *in vivo*’da %67 canlılık ve verimlilik elde edilmiştir.

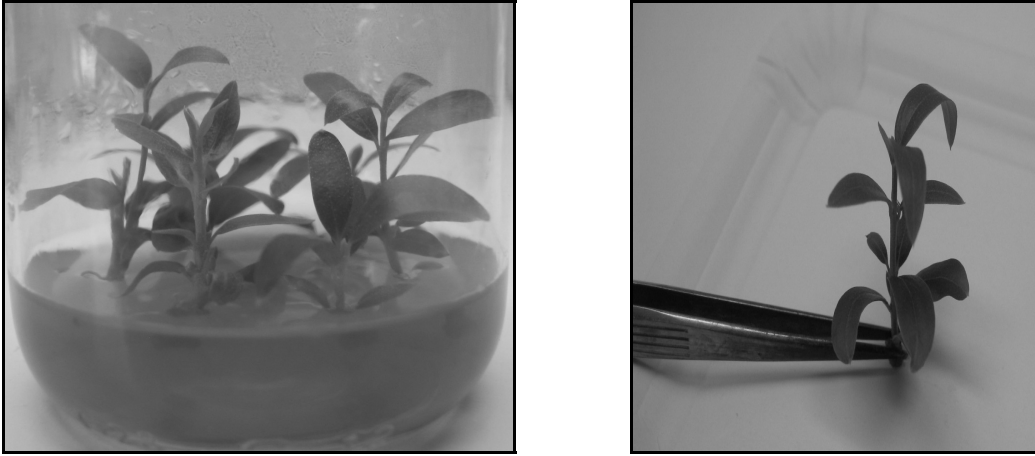
**Çizelge 1.** Zeytinin moleküler karakterizasyonunda kullanılan yöntemler

Yöntem	Eksplant Kaynağı	Kaynakça
İzozim	Farklı orjinlerden gelen 155 zeytin çeşidinin polen örneklerinin karşılaştırılması	Trujillo ve Rallo, 1995
İzozim	43 zeytin çeşidi (29 yerel, 5 “Gemlik”, 3 “Ayvalık”, 1 “Memecik”, 5 “Uslu” çeşidi)	Şeker ve ark., 2005
RAPD	Akdeniz Bölgesi orijinli yağlık ve sofralık 17 zeytin çeşitleri	Fabbri ve ark., 1995
RAPD	6 eski zeytin çeşidi ile 15 modern zeytin çeşitlerinin karşılaştırılması	Durgaç ve ark., 2010
SSR	5 yerel zeytin çeşidi ile 14 farklı orijinli (İtalya, İspanya, Fransa, Slovakya) zeytin çeşidi	Bandelj ve ark., 2002
SSR ve AFLP	26 Tunus orijinli zeytin çeşitleri	Taamalli ve ark. 2006
AFLP	65 farklı orijinli zeytin çeşidi (27 Türkiye, 25 Yunanistan, 1 Suriye, 2 Lübnan, 4 İtalyan, 6 İspanyol)	Owen ve ark., 2005
RAPD, AFLP ve SSR	32 İtalyan ve İspanyol orijinli zeytin çeşidi	Belaj ve ark., 2003
RAPD, AFLP, RFLP ve SSR	‘Leccino’ ve ‘Dolce Agagia’ çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 95 zeytin bitkisinin analizi	De la Rosa ve ark. 2003
SNP	51 zeytin çeşidi	Diaz Bermudez, 2005
SCAR	40 İtalyan ve İspanyol orijinli zeytin çeşidi	Busconi ve ark., 2006
ISSR ve RAPD	Portekiz zeytin çeşitlerinin karşılaştırılması	Gemas ve ark., 2004

**Çizelge 2.** Zeytinin *in vitro* çoğaltımı konusunda yapılan bazı önemli çalışmalar

Zeytin Çeşiti	Proliferasyon ortamı*	Köklenme ortamı*	Kaynakça
“Maderensis”	DKW + 2.2-8.8 µM BAP + 0.4 µM IBA DKW + 18.2 µM Zeatin OM + 2.2-8.8 µM BAP + 0.4 µM IBA OM + 18.2 µM Zeatin	½ DKW + 5.4-26.8 µM NAA ½ DKW + 4.1 µM-2.0 mM IBA	Santos ve ark., 2003
“Galega vulgar”	OM + 2.22 µM BAP + Hindistancevizi sütü 50 mg l <sup>-1</sup> OM + 2.32 µM KIN + Hindistancevizi sütü 50 mg l <sup>-1</sup> OM + 2.28 µM Zeatin + Hindistancevizi sütü 50 mg l <sup>-1</sup>	OM + 4.9 µM IBA	Peixe, 2007
“Frantoio”, “Canino”, “Moraiolo”, “Rosciola”, “Piantone”	OM + 4.5 µM Zeatin + 0-133,4 µM Dikegulak	Bourgin ve Nitsch (1967) besiyortamı + IBA (0.4 mg l <sup>-1</sup> ), 160 mg/l Putresin	Mendoza-de Gyves ve ark, 2007
“Aglандаu”, “Tanche”, “Laragne”	OM+30 g l <sup>-1</sup> sucrose+4 mg l <sup>-1</sup> zeatin OM+20 g l <sup>-1</sup> sucrose+4 mg l <sup>-1</sup> zeatin WPM+15 g l <sup>-1</sup> sucrose+0.1 mg l <sup>-1</sup> zeatin	OM + 4 mg l <sup>-1</sup> IBA ya da WPM + 1 mg l <sup>-1</sup> IBA + 0.75 mg l <sup>-1</sup> NAA	Binet ve ark., 2007
“Rowghani”	OM + 4 mg l <sup>-1</sup> 2ip + % 3 sucrose DKW + 4 mg l <sup>-1</sup> 2ip + % 3 sucrose	500 mg l <sup>-1</sup> IBA içeren solüsyona daldırma	Peyvandi, 2009
“Edremit”	OM + 5-10 µM Zeatin + 66 µM Dikegulak + 50 mg l <sup>-1</sup> FeEDDHA	Veri sunulmamıştır	Özden ve ark., 2010

\*DKW: Driver-Kuniyuki-Walnut besiyortamı, (Driver ve Kuniyuki, 1984); OM: zeytin besiyortamı, (Rugini, 1984); WPM: odunsu bitkiler için besiyortamı, (Lloyd and McCown, 1980); BAP, Benzil amino purin; IBA, İndol butirik asit; KIN, kinetin; NAA, Naftalen asetik asit, FeEDDHA, demir etilen diamin- N,N'-bis (hidroksifenil asetik asit); 2ip, N6-[2-izopentil] adenin.



Şekil 1: Zeytin bitkisine ait nodal eksplantlardan gelişen gövdelerin 2 mg l<sup>-1</sup> Zeatin ve 50 mg l<sup>-1</sup> FeEDDHA içeren besiyerinde 5 hafta sonunda gösterdikleri gelişme (a) ve elde edilen gövdeler (b)

### Zeytin Germplazmasının Orta Dereceli ve Uzun Süreli Saklanması

Biyçeşitliliğin korunmasına yönelik çalışmaların giderek arttığı günümüzde, zeytin germplazmasının da yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olması nedeniyle türün orta ve uzun süreli saklanması için yapılan *in vitro* çalışmalarda karşılan zorluklar nedeniyle koruma çalışmaları da oldukça sınırlı çerçevelerde kalmıştır. Genellikle geleneksel yöntemlerle tarla ve bahçe gibi alanlarda koruma altına alınan zeytin, günümüzde biyoteknolojik yaklaşımlardan faydalanılarak daha küçük alanlarda genellikle dış etkenlerden bağımsız olarak daha fazla bitkinin korunmasına olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşımlardan biri germplazmanın orta dereceli saklanması olan, *in vitro* kültürlerin büyümesinin yavaşlatıldığı ve böylelikle alt kültür periyodunun uzatıldığı çalışmalardır. Diğer bir koruma yöntemi de bitki doku, organ gibi bitki materyallerinin sıvı azot içerisinde (-196 °C), uzun süre canlılığını yitirmeden saklanmasını sağlayan dondurarak saklama yöntemidir.

Zeytin bitkisinin orta ve uzun süreli saklanmasına yönelik Lambardi ve ark., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, “Leccino” ve “Frantoio” zeytin çeşitlerini 4°C’te, karanlıkta 8 ay saklanmıştır. Yine aynı çalışmada, “Frantoio” çeşidine ait *in vitro* büyütülen bitkilerden alınan gövde ucu eksplantları, vitrifikasyon / tek aşamalı

dondurma tekniği ile kriyoprezerve edilmiş ve çözme sonrasında %15 canlılık oranı elde edilmiştir. Shibli ve ark. tarafından (2000) yapılan çalışmada ise zeytin bitkisinin somatik embriyoları enkapsülasyon-dehidratasyon ve enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi kullanılarak kriyoprezerve edilmiş ve %48’e varan canlılık elde edilmiştir. Sánchez-Romero ve arkadaşları tarafından 2009 yılında zeytin embriyonik kültürleri kullanılarak yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında, ultra hızlı dondurma, yavaş soğutma ve damlacık dondurma yöntemleri karşılaştırılmış ve en iyi rejenerasyon (%100) damlacık dondurma yöntemi ile elde edilmiştir.

### Zeytin Bitkisinde Transformasyon Çalışmaları

Zeytin bitkisinin transformasyonu ile ilgili ilk çalışmada *in vitro* çoğaltılan “Dolce Agogia” gövdelerinin köklenme yeteneğini arttırmak için mikro gövdeler *A. rhizogenes* ile inoküle edilmiştir (Rugini, 1986). Daha sonra zeytin bitkisinin adventif köklenme potansiyeli *A. rhizogenes*’in rol genleri ile arttırılmaya çalışılmıştır (Rugini ve Mariotti, 1992). *A. rhizogenes* ile inoküle edilen zeytin gövdelerinden köklerde transformasyon etkinliği düşük olmasına karşın, ikincil köklerin oluşmasında görülen artış transforme olmayan komşu hücrelere T-DNA’nın kısmi integrasyonuna işaret etmektedir. Bu çalışmaya ek olarak çeşitli araştırmacılar tarafından, zigotik olgunlaşmamış embriyolara (Rugini ve Fedeli, 1990) ve yaprak

petiyollerine (Mencuccini ve ark., 1999) *A. tumefaciens* aracılığıyla rol ABC genlerinin transformasyonu çalışılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu transgenik bitkiler, İtalya’da deneysel tarım alanlarında halen değerlendirme aşamasındadır (Rugini ve Gutierrez-Pesce, 2006a). Lambardi ve ark. (1999) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise “Canino” çeşidine ait somatik embriyolarının transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Zeytin transformasyonu ile ilgili diğer bir çalışmada, bitkinin fungal hastalıklara direncinin artırılması için, “Canino” çeşidine ait somatik embriyolar 35S promotörünün kontrolü altında *osmotin* genini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 soyu ile trans-forme edilmiştir (Rugini ve Gutierrez-Pesce, 2006b). Son zamanlarda zeytin somatik embriyolarının transformasyonu hem *A. tumefaciens* (Torreblanca ve ark., 2008) hem de biyolistik yöntemi ile (Pérez-Barranco ve ark., 2007) başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yakın gelecekte, transformasyon çalışmalarının protokol geliştirmenin ötesine geçebilmesi için zeytine ait daha çok geninin belirlenmesi gerekmektedir.

## Sonuç

Zeytin bitkisi sahip olduğu uzun juvenil periyot ve geleneksel yöntemlerle üretilmesinde karşılaşılan köklenme sorunları nedeniyle genetik ıslahının yapılması henüz tam olarak başarılamamıştır. Pek çok çalışma, bu problemi ortadan kaldırmak için alternatif bir çözüm üretme üzerine yapılmaktadır. Bununla birlikte, geleneksel tekniklere alternatif olarak gösterilen pek çok yöntemde örneğin doku kültürü çalışmalarında, odunsu bitki türlerinde sıklıkla görülen bir takım zorluklar da türün çoğaltımında karşımıza çıkmaktadır. Türe ait doku kültürü çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorun olan apikal dominans, farklı derişimlerde ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı, besiyeri makro ve mikro elementlerinin optimizasyonu ve biyoreaktör sistemlerinin denemesi gibi yöntemlerle çözülmeye çalışılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda yaygınlaşan genetik çeşitliliğinin korunmasına yönelik çalışmalarda, zeytin bitkisine ait türaltı taksonların ve akrabalık derecelerinin belirlenmesinde moleküler belirteçlerin kullanımı önem kazanmaktadır.

## Kaynaklar

- Alcántara, E., Cordeiro, A.M., Barranco, D., 2003. Selection of olive varieties for tolerance to iron chlorosis. *J. Plant Physiol.*, 160:1467–1472.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., 1999. Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 411-421.
- Baldoni, L., Pellegrini, M., Mencuccini, M., Angiolillo, A., Mulas, M., 2000. Genetic Relationships Among Cultivated and Wild Olives Revealed by AFLP Markers. *Acta Hort.* 521:275–284.
- Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B. 2002. DNA Fingerprinting of Olive Varieties by Microsatellite Markers. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 40, no. 3, p. 185-190.
- Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B. 2004. Assessment of Genetic Variability of Olive Varieties by Microsatellite and AFLP Markers. *Euphytica*, 136: 93-102.
- Banilas, G., Minas, J., Gregoriou, C., Demoliou, C., Kourti, A., Hatzopoulos, P. 2003. Genetic Diversity Among Accessions of an Ancient Olive Variety of Cyprus. *Genome*, 46:370-376.
- Bartolini, G., Petrucelli, R. 2002. Classification, Origin, Diffusion and History of the Olive. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*. pp. 74.
- Belaj A., Diez, C., Satovic, Z., Baldoni L., Barranco D. 2005. Collection and Study of wild Olive Populations in Spain by Means of SSR Markers *V<sup>th</sup> International Symposium on Olive Growing*, İzmir, Turkey, 123.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I . 2003. Comparative Study of the Discriminating capacity of RAPD, AFLP, and SSR Markers and of Their Effectiveness in Establishing Genetic Relationships in Olive. *Theor. Appl. Genet.*, 107:736–744.
- Belaj, A., Trujillo, I., de la Rosa, R., Rallo, L., Gimnez, M.J. 2001. Polymorphism and Discriminating Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm bank. *J Am Soc Hortic Sci.*, 126:64–71.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., Bervillé, A. 2001. *Olea europaea* (Oleaceae) Phylogeography based on Chloroplast DNA polymorphism. *Tag Theoretical And Applied Genetics*, Vol. 104, No, 8. pp. 1353-1361.

- Binet, M. N., Lemoine, M. C., Martin C., Chambon C., Gianinazzi S. 2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43:473–478.
- Bourgin, J.P., Nitsch, J.P., 1967. Production of haploid *Nicotiana* from excised stamen. *Ann Physiol Veg* 9:377–382
- Busconi, M., Sebastiani, L., Fogher, C. 2006. Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europaea* L). *Mol. Breed.*, 17:59-68.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, February 2002, vol. 104, no. 2-3, p. 301-307.
- Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 223-228.
- De la Rosa, R., Angiolillo A., Guerriero C., Pillegrini M., Rallo L., Besnard G., Berville A., Martin A., Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 1273-82.
- Diaz Bermudez., A., 2005. Desarrollo y caracterización de nuevos microsatélites y SNPs y aplicación en la mejora genética del olivo (*Olea europaea* L.), Ph.D. tesis, Departamento de Genética, Universidad de Córdoba—ETSIAM Córdoba, Spain, 180 pp.
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19:507-509.
- Durgac, C., Kiyga, Y., Ulas, M., 2010. Comparative molecular analysis of old olive (*Olea europaea* L.) genotypes from Eastern Mediterranean Region of Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(4), pp. 428-433.
- Fabbri, A. 2006. Olive propagation: new challenges and scientific research. Proc. “2nd Int. Seminar OLIVEBIOTEQ 2006”, Special Seminars and Invited Lectures. Marsala- Mazara del Vallo, Italy, pp.411-421.
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., Kailis, S., 2004. Olive Propagation Manuel. CSIRO Publ., Australia, pp.130.
- Fabbri, A., Hormaza, J.I., Polito, V.S., 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120 (3):538–542.
- Farahani, F., Peyvandi, M., Ataii, S., Hosseini Mazinani, M., 2006. *In vitro* micrografting: a technique to improve multiplication and rooting plantlets. Proc. “2nd Int. Seminar OLIVE-BIOTEQ 2006”, Vol I. Marsala-Mazara del Vallo, Italy, pp.307-309.
- Fiorino, P., Leva, A.R., 1986. Investigations on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. *Olea*, 17:101–104.
- Gallitelli, M., Semeraro, L., Antonelli, N.M., 1991. RFLP analysis in the olive (*Olea europaea* L.). EMBO Course, Cologne, Germany.
- Ganino, T., Fabbri, A. 2005. Genetic characterization of *Olea europaea* L. germplasm in northern Italy. 5th international symposium on olive growing, 27 September–2 October 2004, Izmir (Turkey), pp.127.
- García-Ferriz, L., Ghorbel, R., Ybarra, M., Mari, A., Belaj, A., Trujillo, I., 2002. Micropropagation from adult olive trees. *Acta Hort.* 586, 879–882.
- Gemas, V.J., Rijo-Johansen, M.J., Tenreiro, R., Fevereço, P., 2000. Inter-varietal and intra-varietal analysis of 3 *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 75: 312-319.
- Gemas, V.J.V., Almadanim, M.C., Tenreiro, R., Martins, A., Fevereço, P., 2004. Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 51:501–511.
- Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milioni, D., Haralampidis, K., 2002. Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 104:574-586.
- Lambardi M., Benelli C., Amorosi A., Branca C., Caricato G. and Rugini E., 1999. Microprojectile-DNA delivery in somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.*, 474: 505-509.
- Lambardi, M., Benelli, C., De Carlo, A., Fabbri, A., Grassi, S., Lynch, P.T., 2002, Medium- and long- term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea Europaea* L.). ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing, pp. 165-174.
- Lambardi, M., Benelli, C., Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E.A., Gumusel, F., 2006. A Novel Approach to olive Micropropagation: the Temporary Immersion system, Proc. “2nd Int. Seminar OLIVEBIOTEQ 2006”, Vol I: Marsala del Vallo, Italy, pp: 319-326.
- Leva, A.R., Petruccelli, R., Goretti, R., Panicucci, M., 1992. Ruolo di Alcuni Microelementi e Carboidrati Nella Proliferazione *in vitro* di cv. di olivo (*Olea europaea* L.). *Atti Conv. “Olive oil quality” Firenze 1992*, 333–334.



- Lloyd, G., McCown, B.H. 1980. Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of Shoot Tip Culture. Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc., 30: 421-427.
- Mekuria, G.T., Collins, G.G., Sedgley, M., 1999. Genetic variability Between Different Accessions of Some Common Commercial Olive Cultivars. J. Hort. Sci. Biotechnol., 74: 309-314.
- Mencuccini, M., 2003. Effect of Medium Darkening on *in vitro* Rooting Capability and Rooting Seasonality of Olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Sci. Hort., 97:129–139.
- Mendoza-de Gyves, E., Mira, F.R., Ruiu, F., Rugini, E., 2008. Stimulation of Node and Lateral shoot Formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using Dikegulac. Plant Cell Tiss Organ Cult 92:233–238.
- Montemurro, C., Simeone, R., Pasqualone, A., Ferrara, E., 2005. Genetic Relationships and Cultivar Identification Among 112 Olive Accessions Using AFLP and SSR Markers. J. Hort. Sci. Biotechnol., 80: 105-110.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant., 15:473–497.
- Owen, C.A., Bitá, E.C., Banilas, G., Hajjar, S.E., 2005. AFLP Reveals Structural Details of Genetic Diversity Within Cultivated Olive Germplasm from the Eastern Mediterranean. Theor. Appl. Genet. 110: 1169-1176.
- Özden, Y., Özüdođru, E.A., Kaya, E., Akdemir, H., 2010. Zeytin (*Olea europaea*) Bitkisinin Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri (TIS) ile *in vitro* Sürgün Çoğaltımının İyileştirilmesi. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1-1; 1-6.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenc, R., Cardoso, H., Macedo, E., 2007. Coconut water and BAP Successfully Replaced Zeatin in Olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Scientia Horticulturae 113; 1–7.
- Pérez-Barranco, G., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C., 2007. Genetic Transformation of Olive Somatic Embryos Through Biolistics. ISHS Acta Horticulturae 738: International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. Daytona Beach, Florida, USA.
- Peyvandi, M., Farahani, F., Noormohamadi, Z., Banihashemi, O., Mazinani, M.H., Ataee, S., 2009. Mass Production of *Olea europaea* L. (cv. Rowghani) Through Micropropagation, General and Applied Plant Physiology, Vol 35(1–2), pp. 35–43.
- Pontikis, C.A., Loukas, M., Kousounis, G., 1980. The use of Biochemical Markers to Distinguish Olive Cultivars. J. Hort. Sci. 55, pp. 333–343.
- Rallo, L., 2009. Iberian Olive Growing in a Time of Change. Chronica Horticulturae, vol. 49-4. pp.15-17.
- Revilla M. A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R. (1996). *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 32: 257-261.
- Roselli, G., Vendramin, G., Rossi, P., 1990. Patterns Isoenzimatici in Cultivar di Olivo. Atti XXXIV Convegno Societa di Genetica Agraria, Lecce, Italy.
- Rugini, E., 1984. *In vitro* Propagation of Some Olive (*Olea europaea sativa* L.) Cultivars With Different Root-Ability, and Medium Development Using Analytical data from Developing Shoots and Embryos. Sci. Hort., 24:123–134.
- Rugini, E., 1986. Olive, in: Bajaj, Y.P.S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 10. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. pp.253-267
- Rugini, E., 1990 *In vitro* Culture of Olive: an Overview of the Present Scientific Status. Acta Hort., 286:93–96.
- Rugini, E., Baldoni, L., 2004 *Olea europea* Olive. In: Litz RE (ed) Biotechnology of Fruit and Nut crops. Chap 15 CABI Publishing, Noworty Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK, pp 404–428.
- Rugini, E., Caricato, G., 1995. Somatic Embryogenesis and Plant Recovery From Mature Tissues of Olive Cultivars (*Olea europaea* L.) “Canino” and “Moraiolo”. Pl. Cell Rep., 14: 257-260.
- Rugini, E., Fedeli, E., 1990. Olive (*Olea europea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj, Y.B.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 10. Legumes and Oilseed crops I. Springer, Heidelberg, pp. 593±641.
- Rugini, E., Gutierrez-Pesce, P. 2006b. Genetic Improvement of Olive. Pomologia Croatica 12:43–74
- Rugini, E., Gutierrez-Pesce, P., 2006a. Overview in the Olive biotechnologies. In: Caruso T, Motisi A, Sebastiani L (eds) Recent Advances in Olive Industry, 5–10 Nov 2006, Marsala, Italy, pp 317–329.
- Rugini, E., Jacoboni, A., Luppino, M., 1993. Role of Basal Darkening and Exogenous Putrescine Treatment on *in vitro* Rooting and on Endogenous Polyamine Changes in Difficult-To-Root Woody Species. Sci. Hort. 53, 63– 72.
- Rugini, E., Mariotti, D., 1992. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA Genes and Rooting in Woody Species. Acta Hort. 3:301-308.
- Sánchez-Romeroa, C., Swennen, R., Panis, B., 2009. Cryopreservation of Olive Embryogenic Cultures. Cryoletters, Volume 30, Number 5, pp. 359-372.
- Santos, C.V., Brito, G., Pinto, G., M.A.C. Fonseca, H., 2003. Sci. Hort. 97(1):83-87.
- Seker, M., Dulger, S., Kaynas, N., 2005. Investigation of Genetic Diversity in Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars and Types Using Isozyme Analysis. Vth International Symposium on Olive Growing, İzmir, Turkey.105.

- Shibli, R.A., Al-Juboory, K.H., 2000. Cryopreservation of 'Nabali' Olive (*Olea europea* L.) Somatic Embryos by Encapsulation-Dehydration and Encapsulation-Vitrification. *CryoLetters*, 21(6):357-366.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A., 2004. Lipoxygenase Activity and Proline Accumulation in Leaves and Roots of Olive Tree in Response to Drought Stress. *Physiol Plant*, 121:58-65.
- Taamalli, W., Geuna, F., Banfi, R., Bassi, D., Daoud, D., Zarrouk, M. 2006. Agronomic and Molecular Analyses for the Characterisation of Accessions in Tunisian Olive Germplasm Collections. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 Vol.9 No.5, Issue of October 15, 2006.
- Torreblanca, R., Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., 2008. Agrobacterium-Mediated Transformation of olive (*Olea europaea* L.) Embryogenic Cultures. *ISHS Acta Horticulturae* 839: I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT 2008. Dresden, Germany.
- Troncoso A., Liñan J., Cantos M., Acebedo M. M., Rapoport H. F. (1999) *J. Hort. Sci. Biotech.*, 74: 584-587.
- Trujillo, I., Rallo, L., 1995. Identifying Olive Cultivars by Isozyme Analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 120 pp. 318-324.
- Tsao, C.W.V., Reed, B.M., 2002. Gelling Agents, silver Nitrate, and Sequestrene iron Influence Adventitious Shoot and Callus Formation from Rubus Leaves. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 38: 29-32.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., 1995. AFLP: a new Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F. J., 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 267.
- Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975. Beginings of Fruit Growing in the World. *Science* 31, vol. 187, no. 4174, pp. 319-327.

## İLETİŞİM

Ergün KAYA  
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
Bitki Biyoteknolojisi Labotatuvarı,  
41400, Gebze, Kocaeli  
E-posta: e.kaya@gyte.edu.tr