

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hojjat MAHMOUDZADEH

**BAZI PORTAKAL ÇEŞİTLERİNDE GENETİK FARKLILIKLARIN SSCP
MARKIRLARI İLE BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI PORTAKAL ÇEŞİTLERİNDE GENETİK FARKLILIKLARIN SSCP
MARKIRLARI İLE BELİRLENMESİ**

Hojjat MAHMOUDZADEH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez .../.../2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Selahattin SERİN
Enstitü Müdürü**

**Bu çalışma Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu Tarafından desteklenmiştir.
Proje No: ZF2011YL17**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI PORTAKAL ÇEŞİTLERİNDE GENETİK FARKLILIKLARIN SSCP MARKIRLARI İLE BELİRLENMESİ

Hojjat MAHMOUDZADEH

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Yıl: 2012, Sayfa: 79

Jüri : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU

: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ

: Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Bazı portakal çeşitlerinde genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Ç.Ü. Tuzcu turunçgil koleksiyonundan seçilen bazı portakal çeşitleri ile diğer turunçgil gruplarını temsil eden Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*), şadok (*Citrus maxima* c.v reinking) ve Marsh seedless altıntop (*Citrus paradisi*) genotipleri kullanılmıştır. SSCP analizlerini gerçekleştirmek amacıyla 19 çift SSCP primeri ve DNA materyalleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri Origins electrophoreses (Elchrom Scientific USA) cihazı kullanılarak, hazır olarak temin ettiğimiz GMA (Genetic Mutation Analysis) jelinde koşturulmuştur. Elde edilen DNA bant profillerinin cluster analizleri DARWİN 5.0.158 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows) bilgisayar paket programı ile Neighbor-Joining metoduna göre yapılarak dendrogramlar oluşturulmuştur. Yapılan PCR reaksiyonları sonucunda sadece 14 SSCP primerin amplifikasyonu sağlanmıştır. Dendrogram sonuçları incelendiğinde; portakallar ile diğer turunçgil gruplarını temsil eden çeşitler arasında yüksek oranda polimorfizm gözlenirken, portakalların kendi içerisindeki polimorfizm oranı düşük çıkmıştır. Ayrıca, portakal çeşitleri içerisinde Sanguinello B 2/10 16-7 ve Kozan yerlisi 17-10 genotipleri 0.1 benzerlik düzeyi oranıyla birbirine çok yakın çıkarken, tüm portakal çeşitleri ile en farklı çeşitliliği göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Portakal, *Citrus sinensis*, SSCP, Genetik Farklılık.

ABSTRACT

MSc THESIS

IDENTIFICATION OF GENETIC VARIABILITY IN SOME SWEET ORANGE GENOTYPES BY USING SSCP MARKERS

Hojjat MAHMOUDZADEH

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

Supervisor : Assoc. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2012, Pages: 79
Jury : Prof. Dr.Turgut YEŞİLOĞLU
: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Assoc. Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

SSCP (Single Strand Confirmation) analyses were performed in order to determine genetic relationship among 40 sweet orange genotypes and 3 other Citrus cultivars (Satsuma (*Citrus unshiu*), Pummelo (*Citrus maxima reiking*) and Marsh seedless (*Citrus paradise*)) selected from Ç.U, Tuzcu Citrus Collection. Totally 19 SSCP primer pairs and DNA of plant materials were used for PCR amplification. Fourteen SSCP primers successfully amplified in PCR reactions. PCR products were separated using GMA (Genetic Mutation Analysis) gels. Data obtained from the gel results were scored as 1 presence of DNA bands, as 0 absence of DNA bands. cluster analysis were performed by using DARWIN 5.0.158 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows) program. Dendrogram was constructed based on Neighbor-Joining method. According to the dendrogram high genetic polymorphism was detected between sweet orange and the other cultures used in this thesis. On the other hand low polymorphism level was detected among sweet orange genotypes. However Sanguinello B 2/10 16-7 and Kozan yerlisi 17-10 genotypes separated from the other sweet orange genotypes in the dendrogram.

Keywords: Sweet orange, *Citrus sinensis*, Identification, SSCP.

TEŞEKKÜR

Adana' ya geldiğim ve Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden itibaren tez çalışmam, laboratuvar çalışmaları ve bunların dışında yurt dışında eğitim almamı sağlayan ve her türlü konuda bilgisini ve desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiren çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR' a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bölümün tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve derin bilgilerinden faydalanmama izin veren sayın hocam Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU' na sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Biyoteknoloji konusunda tecrübelerinden yararlandığım her zaman her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ' ye çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren her türlü bilgi, tecrübe ve deneyimini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmam sırasında her konuda yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Özhan ŞİMŞEK'e, çalışmamın her aşamasında yanımda olan değerli arkadaşlarım Biyolog Melda BONCUK, Biyolog Fatma ASLAN, Biyolog Taner BOZKURT, Biyolog Tolga İZGÜ, Biyoteknolog Dicle DÖNMEZ, ve tüm Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve her zaman arkamda duran ve benim için her türlü zorluğa katlanan ve fedakarlığı yapan, canım Aileme çok çok teşekkür eder derin ve sonsuz sevgilerimi sunarım.

Son olarak her türlü tecrübe ve arkadaşlığını tam anlamı ile esirgemeyen can dostum Dr. Masoud AKHOUNDİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Turunçgiller.....	1
1.2. Genetik Markırlar.....	6
1.2.1. Morfolojik Markırlar.....	6
1.2.2. Biyokimyasal Markırlar.....	7
1.2.3. Moleküler Markırlar.....	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Turunçgillerde Yapılan SSCP Çalışmaları.....	17
2.2. Turunçgillerde Yapılan Diğer Moleküler Yöntemler.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Normal Portakallar.....	27
3.1.1.1. Hamlin.....	27
3.1.1.2. Valencia.....	27
3.1.1.3. Yafa.....	28
3.1.1.4. Salustiana	29
3.1.1.5. Kozan Portakalı.....	30
3.1.1.6. Finike Yerli.....	30
3.1.1.7. Alanya Dilimi.....	30
3.1.2. Göbekli Portakallar.....	31
3.1.2.1. Washington Navel.....	31
3.1.2.2. Navelina.....	32

3.1.2.3. Navelate.....	33
3.1.2.4. Lane Late.....	33
3.1.2.5. New Hall.....	34
3.1.3. Kan (Pigmentli) Portakalı.....	34
3.1.3.1. Moro.....	35
3.1.3.2. Sanguinelli.....	36
3.1.3.3. Tarocco.....	36
3.1.4. Şeker (Asitsiz) Portakalları.....	37
3.1.4.1. Succari.....	37
3.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Diğer Turunçgil Grupları.....	37
3.1.5.1. MANDARİN.....	37
3.1.5.2. ALTINTOP.....	38
3.1.5.3. PUMMELO (Şadok).....	38
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	38
3.2.1.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması	39
3.2.1.2. DNA İzolasyonu Aşamaları.....	39
3.2.1.3. DNA Kalitesi Ve Kantitesinin Belirlenmesi.....	41
3.2.2. DNA Amplifikasyonu.....	41
3.2.2.1. SSCP Anallizlerinde Kullanılan Primerler.....	43
3.2.2.2. GMA Wide Mini S-2x13 Jeli.....	45
3.2.2.3. Origins Elektroforez Cihazı.....	46
3.2.3. Örneklerin Hazırlanması.....	46
3.2.4. Örneklerin GMA Jele Yerleştirilmesi ve Elektroforez.....	46
3.2.5. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi.....	48
3.2.6. SSCP Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Dendrogramların Oluşturulması.....	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. İzolasyon.....	51
4.2. SSCP analizleri.....	53

4.2.1. SSR Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendogramın	
Değerlendirilmesi.....	61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 1.1. Dünya Turunçgil Üretiminin Ülkeler Bazında Dağılımı.....	2
Çizelge 3.1. Genetik farklılıkları araştırılmış olan portakal çeşit/tipleri.....	25
Çizelge 3.2. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Tampon Çözeltilisinin İçeriği.....	39
Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan SSCP primerleri.....	44
Çizelge 4.1. Çeşitlere ait DNA kalite ve kantitesi.....	51
Çizelge 4.2. SSCP analizlerinde amplifikasyonu sağlanan Forward ve Reverse primerleri.....	53
Çizelge 4.3. SSCP analizlerinde amplifikasyonu sağlanmayan Forward ve Reverse primerleri.....	54
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan Tatlı portakal, Pummelo, Mandarin ve Altıntop çeşit ve tiplerine ait, her primer çifti için Toplam Bant Sayısı (TBS), Polimorfik Bant Sayısı (PBS), Polimorfizm Oranı (PO), Polimorfik bantların ait olduğu çeşitler (PÇ).....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Tilling ve EcoTilling analiz aşamaları.....	13
Şekil 1.2. SSCP Analiz Aşamaları.....	15
Şekil 3.1. Valencia çeşidine ait meyvelerin görünümü.....	28
Şekil 3.2. Yafa portakalına ait meyvelerin görünümü.....	29
Şekil 3.3. Washington Navel portakalına ait meyvelerin görünümü.....	32
Şekil 3.4. Navelina portakalına ait meyvelerin görünümü.....	33
Şekil 3.5. Moro Portakalına Ait Meyvelerin Görünümü.....	35
Şekil 3.6. (A).Yaprakların sıvı azota daldırılması, (B-C). Yaprakların sıvı azotta öğütülmesi, (D). Örneğin Saklanması için santrifüj tüplerine doldurulması.....	40
Şekil 3.7. (A). Öğütülmüş Bitkisel Materyalin 65° C’de Bekletilmesi,(B) (C). Tüplerin Üzerine Solüsyonların Eklenmesi, (D). Santrifüj İşlemi.....	41
Şekil 3.8. Termal Cycler Cihazı.....	43
Şekil 3.9. (A). Agaroz jelin dökülmesi, (B). Agaroz jelin yüklenmesi, (C). Agaroz jelin koşturulması.....	45
Şekil 3.10. Jelin poşetinden çıkartılıp tutulma şekli.....	47
Şekil 3.11. Jelin Elektroforez Tankına Yerleştirilmesi.....	47
Şekil 3.12. Jelin Katamaranla Sabitlenmesi.....	47
Şekil 3.13. Origins Elektroforez Cihazı (Elchrom Scientific USA).....	48
Şekil 3.14. Jelin Plastik İp Yardımı ile Alt Kısımdan Ayrılması.....	48
Şekil 3.15. Jelin Boyama Tankına Alınarak Boyanması.....	49
Şekil 4.1. İki no’lu SSCP Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....	55
Şekil 4.2. Üç no’lu SSCP Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....	56
Şekil 4.3. On Altı Numaralı Primere Ait Jel Görüntüsü.....	58
Şekil 4.4. On Yedi Numaralı Primere Ait Jel Görüntüsü.....	59

KISALTMALAR

AFLP	: oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
°C	: Centigrade
DNA	: Deoxyribonucleic acid
FAO	: Food and Agriculture Organization
GMA	: Genetic Mutation Analysis
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
ng	: Nanogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RE	: Restriksiyon Enzimi
RFLP	: Restriction fragment Length Polymorphism
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
SCAR	: Sequence-Characterized Amplified Regions
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorphism
SSCP	: Single Stranded Conformation Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat
TE	: Tris-EDTA
rcf	: Santrifüjün ayırma gücünü belirleyen rölatif santrifugal güç
dk	: Dakika
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Tilling	: Targeting Induced Local Lesions In Genome
UV	: Ultra Violet
C.V	: Cultivar Variation

1. GİRİŞ

1.1. Turunçgiller

Turunçgillerin anavatanı Arap Yarımadası'nın doğusundan Filipinler' in doğusuna kadar ve Himalayalar ile Hindistan'dan Avustralya'ya kadar olan bölgeyi içine alan geniş bir coğrafya olmasına rağmen, asıl anavatanı Güneydoğu Asya'dır. Diğer bitki gruplarına göre genç bir grup olan turunçgillerin yaklaşık 20 milyon yıllık bir geçmişi vardır ve evrimi devam etmektedir. Turunçgillerin dünyanın diğer bölgelerine yayılmaya başlaması milattan öncesine uzanmaktadır (Kafa ve Canihoş, 2010).

Turunçgillerin ilk defa M.Ö 500'lü yıllarda kültüre alındığı sanılmaktadır (Anonim, 1975) ve Turunçgillere ait ilk yazılı eser 17. yy' a aittir. Dünyaya yayılımı toplumsal, ticari ve kültürel gelişmelerle olmuştur. M.Ö. 400-500 yıllarında Ortadoğu'ya geldiği, sonra Fenikeliler ve Yunanlılar aracılığıyla Akdeniz'e ulaştığı bildirilmiştir. Daha sonra coğrafi keşiflerle Amerika'ya (Florida) geçmiştir. Portekizliler vasıtasıyla Brezilya; İngilizler vasıtasıyla Avustralya'ya götürülmüştür. Anadolu'ya M.Ö. 3. yy' da geldiği sanılmaktadır. Portakal ve limon İtalya'dan; altıntop ise Amerika' dan Türkiye' ye giriş yapmıştır. Bildiğimiz anlamda turunçgil yetiştiriciliğine ise 19. yy' da başlanmıştır. (Tuzcu, 2002).

2010 yılı verilerine göre turunçgiller yaklaşık 124 milyon ton üretim ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur. Turunçgil yetiştiriciliğinde dünyada en büyük üretici ülke yaklaşık 24 milyon tonluk üretim ile Çin olup, onu sırasıyla Brezilya ve Hindistan izlemektedir. Türkiye ise Dünya sıralamasında 7. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1). Dünya üretiminin % 56.12'sini portakal, % 17.23'ünü mandarin, % 11.52'sini limon ve laym, % 5.62'sini altıntop ve şadok oluştururken, % 9.51'ini diğer turunçgiller oluşturmaktadır (FAO, 2012).

Çizelge 1.1. Dünya turunçgil üretiminin ülkeler bazında dağılımı (2010)(FAO, 2012).

No	Ülke	Üretim (ton)
1	Çin	23.938.044
2	Brezilya	21.327.480
3	Hindistan	10.391.600
4	Amerika Birleşik Devletleri	9.985.530
5	Meksika	6.857.006
6	İspanya	5.456.400
7	Türkiye	3.572.376
8	Mısır	3.522.958
9	Nijerya	3.488.400
10	İtalya	3.190.790
11	İran	2.619.258
12	Arjantin	2.559.423
13	Pakistan	2.203.000
14	Güney Afrika	2.127.750
15	Endonezya	2.032.670
16	Fas	1.359.729
17	Cezayir	998.640
18	Yunanistan	982.700
19	Japonya	934.100
20	İsrail	563.532
21	Avustralya	523.245
22	Tunus	393.900
23	Portekiz	244.700
24	G. Kıbrıs	120.980
25	KKTC	119.965
TOPLAM		123.694.474

Türkiye’de oldukça eski bir geçmişe sahip olan turunçgil yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren ise üretimde önemli artışlar olmuştur. Türkiye, turunçgil yetiştiriciliğine ekolojik koşullar açısından son derece uygundur. Türkiye toplam turunçgil üretimi 3.557.493 tondur. Bunun 1.706.504 tonunu portakal, 853.722 tonunu mandarin, 786.580 tonunu limon, 213.988 tonunu altıntop ve 2.346 tonunu diğer turunçgiller oluşturmaktadır. En çok turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı bölge Akdeniz Bölgesi’dir. Bu bölgede en fazla üretim 1 milyon ton ile Mersin ilinde yapılmakta olup ardından Adana, Hatay ve Antalya illeri gelmektedir. Akdeniz Bölgesinden sonra en çok üretim Ege Bölgesi’nde yapılmakta olup en fazla üretim sırasıyla İzmir, Aydın ve Muğla illerinde yapılmaktadır. Çok az miktarda Doğu Karadeniz bölgesinde de turunçgil yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yeşiloğlu, 2012).

Bugüne kadar geçen binlerce yıllık süre içerisinde turunçgil türlerinde seleksiyon, doğal hibritleme ve spontan mutasyonlar aracılığı ile yeni turunçgil tür ve çeşitler ortaya çıkmıştır. Bu durum turunçgillerde geniş bir tat, asitlik, renk, şekil ve irilik çeşitliliği sağlamıştır (Göksel, 1999).

Turunçgil grubunun sahip olduğu tür ve çeşit zenginliği, meyvelerinin olgunlaşması ve olgunlaşan meyvelerin ağaç üzerinde bekletilebilmesi turunçgillerin önemini arttırmaktadır. Turunçgiller, yüksek oranda C vitamini ve insan sağlığı için gerekli olan A vitamini içermesi ile stratejik ürün grupları arasında değerlendirilip yetiştirilmektedir (Burry ve ark., 2011). Aynı zamanda insan beslenmesindeki önemi, kendine has renk ve kokusu, kozmetik sanayi hammaddeleri arasında yer alması dünya pazarlarında turunçgil ihtiyacını arttırmıştır (Karahocagil, 2003).

Turunçgiller içerisinde portakallar en yaygın şekilde üretilen ve tüketilen türdür. Kökeni Portekiz’ den gelmektedir. Dünyada yetiştiriciliği yapılan 1000 - 1100 çeşit portakal bulunmaktadır. Turunca benzemekte ancak tacı yuvarlaktır. Dikenlidir, yapraklarında ve meyvelerinde kendine özgü kokusu vardır. Meyve büyüklüğü küçükten orta büyüklüğe kadar değişim gösterir. Kabuk rengi çok değişik renkte olup açık sarıdan koyu kırmızıya değişiklik gösterir. Aynı zamanda meyve kabuğu pürüzlü veya parlak pürüzsüz olabilir. Meyve eti açık sarıdan koyu şarap rengine kadar değişir ve tatlıdır. Bazı çeşitlerde yalancı göbek bulunur ve puflaşmaz

Hudgson' nın sistematığıne göre portakallar 4 grupta toplanmıştır. Bunlar; normal portakallar, göbekli portakallar, kan portakalları ve şeker portakallarıdır. Portakalın tam bir tür olmadığı ve şadok ile mandarin hibriti olduğu görüşü de vardır. Ancak bu durum tam olarak kesinlik kazanmamıştır (Yeşiloğlu, 2012).

Turunçgil yetiştiriciliği dünyada çok hızlı gelişme göstermektedir. Bu gelişmede en büyük katkı anaçlardan sağlanmaktadır. Anaçların değişik ve farklı özellikleri nedeniyle yetiştiricilikte karşılaşılan sınırlayıcı ve engelleyici faktörlerin (toprak, iklim, hastalıklar vb.) çözümlenmesinde ve gerek yetiştirici, gerekse pazar isteklerinin (verimlilik, erken meyveye yatma, meyve kalitesi vb.) karşılanmasında çok çeşitli yararlar sağladıkları bir gerçektir (Tuzcu ve ark., 1999). Ticari amaçla yetiştirilen turunçgil ağaçlarının hemen hemen tamamı aşılantmakta ve kalem olarak kullanılan çeşidin performansı üzerine anacın büyük bir etkisi olmaktadır. Yeni bahçelerin kurulması sırasında ise, uygun anaç seçimi oldukça önemli bir konudur (Şimşek, 2009). Türkiye' de yoğun olarak kullanılan turunç anacı, üzerine aşılant portakal çeşitlerine iyi uyum göstermesine, bölge topraklarına uyum sağlamasına, meyve verim ve kalitesine olumlu etkide bulunmasına karşın; tuzlu topraklar, nematodlar ve özellikle de Göçüren (Tristeza) virüs hastalığına duyarlı olması nedeniyle araştırmacıları yeni anaçlar bulma yolunda araştırmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu konuda dünyada ve Türkiye' de pek çok çalışma yapılmış ve değişik anaçlar üzerine aşılant çeşitlerin meyve verim ve kalitesi ile diğer birçok özellik üzerinde olumlu etkide bulundukları görülmüştür. Son yıllarda ise Ege ve Akdeniz bölgesinde Carrizo sitranjının portakal türlerine anaç olarak kullanımı hızlı bir artış göstermiştir (Tuzcu ve ark, 2001).

Portakalların genetik ilişkilerinin araştırıldığı birçok moleküler çalışmada portakallar arasında morfolojik olarak farklılıkların olmasına rağmen genetik olarak yeterli düzeyde farklılığın tespit edilemediği görülmüştür (Moore, 2001). Genetik çeşitlilik, bir türün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği, zenginliği olarak tanımlanabilir. Her canlı türünün değişen çevre koşullarına uyum sağlayabilmesi için genetik çeşitliliğe sahip olması şarttır. Yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmayan canlı türleri, değişen çevre koşullarına ayak uyduramayarak yok olurlar. Genetik çeşitlilik aynı zamanda son yıllarda hızla ilerleyen biyoteknoloji alanında, üstün nitelikli bitki

ve hayvan soylarının geliştirilebilmesi için gerekli hammaddeyi meydana getirmektedir (Kence, 2005).

Genetik zenginliklerin yeterince tanınmaması ve bilinmemesi, bu kaynaklardan yararlanmada biyoteknoloji uygulamalarının sınırlı kalmasına ve bu alandaki yatırımların istenilen verimi sağlayamamasına sebep olmaktadır (Kence, 2005). Bu nedenle, dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan meyve türlerinin başında gelen turunçgillerde genetik çeşitliliğin bilinmesi, izlenmesi ve korunması, erkenci ıslah çalışmalarının sağlanması ve daha birçok biyoteknoloji çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Nicolosi ve ark. (2000) ile Novelli ve ark. (2004)'ün yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarına göre; turunçgil taksonomisi, Citrus ve akrabaları arasında melezlemelerin olması, yaygın bir şekilde göz mutasyonlarının meydana gelmesi, poliembriyoni, turunçgillerin evrimini tamamlamamış olması, uzun yıllardır yetiştiricilik yapılması nedenleriyle karmaşık ve tartışmaya açık bir yapı göstermektedir (Uzun, 2009). Geçmişte yapılan turunçgil türleri ve akraba grupları ile ilgili taksonomik çalışmalar daha çok morfolojik karakterleri temel almıştır. Bitki genetik kaynakları ve bitkisel çeşitlilik açısından dünyadaki nadir ülkelerden birisi olan Türkiye'de bitki genetik kaynaklarının korunmasına yönelik çalışmalar 1960'lı yıllardan bu yana yürütülmektedir. Turunçgillerde varyasyonu sınırlayan diğer temel faktörlerden biri apomiksis'e olan yüksek eğilimdir. Ticari açıdan önemli dört turunçgil türünden biri olan portakallar ise başlangıçta şans çöğürü olarak doğal melezlemeler sonucu meydana gelmiştir. Tür içerisindeki varyasyonlar ise çoğunlukla doğal mutasyonlar sonucu oluşmuştur (Gülşen ve Roose, 2001; Nicolosi ve ark, 2000).

Aynı zamanda bazı türlerde, ana bitkinin nusellus dokusundan gelişen apomiktik embriyo oranı %100'e yakındır. Turunçgillerde düşük seviyede görülen varyasyon, seçme olanaklarını daralttığından ıslah programları açısından son derece önemli bir olumsuz faktördür. Bu nedenle Türkiye'de genellikle doğal mutasyonlar sonucu oluşan sınırlı seviyede olan varyasyonu korumak kritik bir önem arz etmektedir.

1.2. Genetik Markırlar

Genetik koleksiyonlarda, genetik çeşitliliğin analiz edilmesi, genotiplerin güvenilir bir şekilde sınıflandırılmasını ve özel ıslah amaçlı kullanılmak üzere temel genotiplerin tanımlanmalarını kolaylaştırmaktadır. Genetik çeşitlilik çalışmaları bireyler ile gruplar arasında veya bireyler ile popülasyonlar arasındaki varyasyonların özel bir metotla veya farklı metotların kombinasyonlarıyla analiz edildiği bir süreçtir (Mohammadi ve Prasanna, 2003).

Genetik markırlar morfolojik, biyokimyasal (protein) ve moleküler (DNA) markırlar olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

1.2.1. Morfolojik Markırlar

Bitki popülasyonu içinde, bir bitki ya da bir grubu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir markır olarak değerlendirilir. Meyve kabuğu, yaprağın şekli, çiçeğin rengi, bitki ağaç özellikleri bu grup markırları oluşturur. Bu tip markırlar, genetik olarak uzak akraba olarak kabul edilen bitki toplulukları arasında etkili olarak kullanılabilmesine karşın, yakın akraba olan bitki toplulukları için etkili bir markır değildir. Morfolojik özellikler tek genle kontrol edilebilir ve genetik markır olarak kullanılabilir. Görsel olarak değerlendirilebilen kalitatif özelliklerdir. Bu markırlar bitki doğasında vardır ve mutasyon sonucu ortaya çıkmışlardır (Aka-Kaçar, 2001). Morfolojik markırlar, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımlarının mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve bitkilerde aranan bazı fenotipik özelliklerin ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markır sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir.

1.2.2. Biyokimyasal Markırlar

İzoenzimler, tohum kabuğu proteinleri, sekonder metabolitler, yapraklarda bulunan kimyasallar vs. bu gruba girerler. İzoenzimler, bir tek enzimin alternatif formlarıdır ve elektrik ortamında farklı hız ve yönlerde hareket ederler (Markert ve Moller, 1959). Kaba enzim ekstraktları jel ortamında nişastadan yapılan jeller üzerinde ayrıldıktan sonra biyokimyasal olarak tespit edilir (Hunter ve Markert, 1957). Bu markırların maliyeti, moleküler markırlara oranla daha düşüktür ve daha az iş gücüyle elde edilirler. Ancak bitki türlerinde bugüne kadar yeterince biyokimyasal markır üretilenmemiştir. Bu markırlardaki varyasyonlar, kodlayıcı DNA bölgelerindeki benzer olmayan değişikliklerden ya da translasyon sonrası protein modifikasyonlarından kaynaklanır. Ancak bu markırların kullanılabilirliği, çalışılan popülasyonların yapısına bağlıdır (Staub ve Sequen, 1996). Bu markırların dezavantajlarından biri, sayısal olarak çalışılacak izoenzimlerin veya proteinlerin azlığıdır. Test edilen izoenzimlerin bitkilerde, bolca ve sürekli biçimde sentezlenmesi gerekmektedir. Bir tek enzim sisteminde tespit edilen bantların sayısı; 1) enzimi oluşturan alt ünitelerin (subunit) sayısına, 2) bitkinin çalışılan enzim sistemi için heterozigot veya homozigot olmasına, 3) çalışılan enzimi kodlayan lokus sayısına bağlıdır. Belirli bir lokus için homozigot ve heterozigot bireylerin ayırt edilebildiği kodominant markırlar oluşturur. Sistematikte ve genom haritalama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tohum proteinleri, oldukça polimorfik ve tekrarlanabilir markırlar oluşturmaktadır. Protein polimorfizmi DNA düzeyindeki baz değişiklikleri, kromozomlardan bir bölümünün kaybı veya yer değiştirmesinden kaynaklanabilir. Bu tip markırların en önemli dezavantajı, çalışılabilecek lokus sayısının azlığıdır (Gepts, 1990). Bir diğer dezavantajı ise, enzimlerdeki translasyon sonrası görülen yapısal değişikliklerdir (Staub ve ark., 1982). Bu olayda, o enzimi kodlayıcı DNA'lar aynı olmasına karşın, bir bilinmeyen lokus o enzimin yapısını değiştirecek ve bu yüzden de jelin analizinde yanlış yorumlamalara neden olabilecektir.

1.2.3. Moleküler Markırlar

Moleküler markırlar ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili biyolojik etkisi olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA parçasını temsil edilmektedir. Moleküler markır yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Moleküler markırlar görünür özelliklere dayanan morfolojik markırlardan ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markırlardan farklı olarak DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markırları olarak bilinirler (Uncuoğlu, 2010).

Moleküler markırların hızlı gelişimi biyoteknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesine olanak sağlamıştır. Moleküler markır kullanımı bu sürecin ilk basamağını oluşturmaktadır ve bu nedenle büyük öneme sahiptir (Tamam, 2008).

Markırlar yardımıyla yapılan erken seleksiyon çalışmaları, genetik haritalama çalışmaları, DNA parmak izlerinin belirlenmesi ile yapılan taksonomik çalışmalar, mutasyonların belirlenmesi, bilinen genlerin genetik çeşitliliğinin araştırılması ve Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların tanımlanması gibi birçok çalışma moleküler markırların kullanım alanlarıdır. Aynı zamanda genetik kaynakların yönetiminde genotiplerin tanımlanması ve fenotipik olarak benzer olanların birbirlerinden ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Bu anlamda moleküler markırların kullanılması, özellikle polimorfizm saptamalarında hız ve kolaylık sağlamaktadır (Roose, 1988).

DNA polimorfizmi bireylerin genomları arasında bazların dizilimi yönünden farklılıklar göstermesidir. Mendel yasalarına göre nesilden nesile aktarılan bu kalıtsal değişiklikler çoğunlukla DNA düzeyinde tek bir bazın değişimi ya da genin küçük ya da büyük bir bölümünün eksilmesinden ve eklenmesinden kaynaklanabilir. Eğer bu değişiklikler bir restriksiyon enziminin kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına sebep olursa kolaylıkla saptanabilir.

Son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar çeşitli avantajlara sahiptir; 1) çevre faktörlerinden etkilenmezler, 2) çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, 3) genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotropiktir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), 4) her bir

ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir, 5) sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir. DNA markırlarında amaç, bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın başlıca avantajı, herhangi bir DNA zincirinin, iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir. Bunun için DNA dizininin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığını bilmeye gerek yoktur. Kullanılacak markır sistemini etkileyen bazı faktörler vardır. Polimorfizmin seviyesi veya popülasyonun tipi, farklı çevrelerdeki stabilitesi, lokus sayısı, kolaylık, analiz maliyeti ve altyapı bu kriterlerden bazılarıdır. Markır seçimi bütün bu kriterleri göz önünde bulundurularak amaca uygun olarak yapılır.

DNA markırları turunçgil türleri arasındaki filogenetik ilişkilerin saptanma çalışmaları için önemli bir araçtır (Barkley ve ark., 2006). Farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkan moleküler markırlar, hibridizasyona ve PCR'a dayalı olmak üzere ikiye ayrılır. Hibridizasyona dayalı olanlar; RFLP, PCR'a dayalı markırlar; RAPD (Randomly Amplified Polimorphyc DNA), SCAR (sequence-characterized amplified regions), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) dir.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek, DNA problemleriyle etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP markörleri ile türler arasındaki ve içindeki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eş baskın (ko-dominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001). En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır (Walton, 1993).

RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA): PCR (Polymerase Chain Reaction)'ın keşfi ile DNA polimorfizmini araştıran yeni markör sistemleri ortaya

koyulmuştur. Williams ve ark., (1990) tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği, basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. Amplifikasyon ürünleri bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduktan sonra gümüş nitrat ya da etidyum bromid boyaması ile bantlar görünür hale gelir. RAPD markörleri, RFLP'nin tersine düşük kalitede ve miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen, dominant markör (Corazza-Nunes ve ark., 2002) olmaları nedeni ile yorumlanmasının zor, güvenilirliğinin çok sınırlı ve tekrarlanamaması, dezavantajları arasında yer almaktadır (Lavi ve ark., 1994). RAPD, turunçgil yetiştiriciliğinin tanımlanmasında ve genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır (Deng ve ark, 1995, 1997). Ayrıca RAPD, RFLP ile birlikte kullanılarak Citrus ve akrabaları arasında filogenetik çalışmalar yapılmıştır (Federici ve ark., 1998).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions): İstenilen bir RAPD markırının kullanımı, uç kısımlarının dizilerinin belirlenmesi ve daha uzun primerler (24 nükleotid gibi) oluşturmakla arttırılabilir (Paran ve Michelmore 1993). Bu tür dizileri belirlenmiş çoğaltılmış bölgelerde (SCAR) DNA dizi farklılıkları tek eşsiz bir bandın varlığı/yokluğu ile belirlenir. SCAR ve RAPD'e göre daha fazla tekrarlanabilir ve elektroforeze ihtiyacın olmadığı var/yok dağılımlarına dönüştürülebilirler. SCAR' lar genelde dominant markırlar olmalarına rağmen 4 baz çifti restriksiyon enzimleri ile parçalanmaları ve DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) veya SSCP (Single Strand Comformation Polymorphism) teknikleri ile tanımlanmaları suretiyle kodominant markırlara dönüştürülebilirler (Turunç, 2010). Turunçgillerde CTV (Citrus tristeza virus)'nin analiz edilmesinde kullanılmıştır (Deng ve ark., 1997).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat): RAPD ile maliyeti yaklaşık olarak aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markır bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fang ve Roose, 1997).

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism): PCR tekniğine dayalı olup, DNA'daki açık okuma bölgeleri dediğimiz (ORFs) bölgelerin çoğaltılması esasına dayanır. SRAP primerleri geliştirirken ilk önce çekirdekte CCGG bazlarını kullanarak ORF bölgelerindeki ekzonlar hedef alınır. Forward primeri 17 nükleotit, Reverse primeri 18 nükleotit uzunluğundadır. Reverse primerleri DNA'nın intron ve promoter bölgelerini, Forward primeri ise DNA'nın ekson bölgelerini amplifiye eder. Forward primerlerinde 5' ucundaki 14, Reverse primerlerinde 15 nükleotit aynıdır. 3' ucuna yakın olan üç nükleotit tesadüfi seçim sonucu oluşturulmuştur. Primerin başındaki 10 veya 11 nükleotitten sonra gelen dört nükleotit dizini Forward primerinde CCGG dizinine; Reverse primerinde AATT primer dizinine sahiptir (Tamam, 2009; Turunç, 2010).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir (Özcan ve ark., 2001). Bu teknikte ilk olarak genomik DNA önce birisi 6, diğeri 4 taban tanıyan 2 kesim enzimi tarafından kesildikten sonra (EcoRI/MseI), bunlara ait adaptörler eklenmekte ve bu adaptörlere uygun primerler kullanılarak seçici bir şekilde çoğaltılmaktadır. Seçici şekilde çoğaltılan parçalar arasındaki polimorfizm PAGE ile belirlenir (Ergül, 2000). Polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolaydır. Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır (Maughan ve ark., 1995).

SSR (Simple Sequence Repeat): STR (short tandem repeats) veya mikrosatellit olarak da bilinen tekrarlı nükleotid dizileridir (1-6 nükleotid). Tekrarlanan DNA'ların sağındaki ve solundaki zincirler o dizine özgüdür, yani spesifikler. Bu dizinler SSR primerlerini dizayn etmede kullanılır. Elde edilen 18-22 nükleotid uzunluğundaki primerler ile genomik DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon ürünleri poliakrilamid jelde gözlenir. Polimorfizm kaynağını tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir allele işaret eder. Tekrar sayısındaki farklılıkların kaynağı ise DNA replikasyonu sırasında kaymalar (slippage) (Schlotterer ve Tautz, 1993).

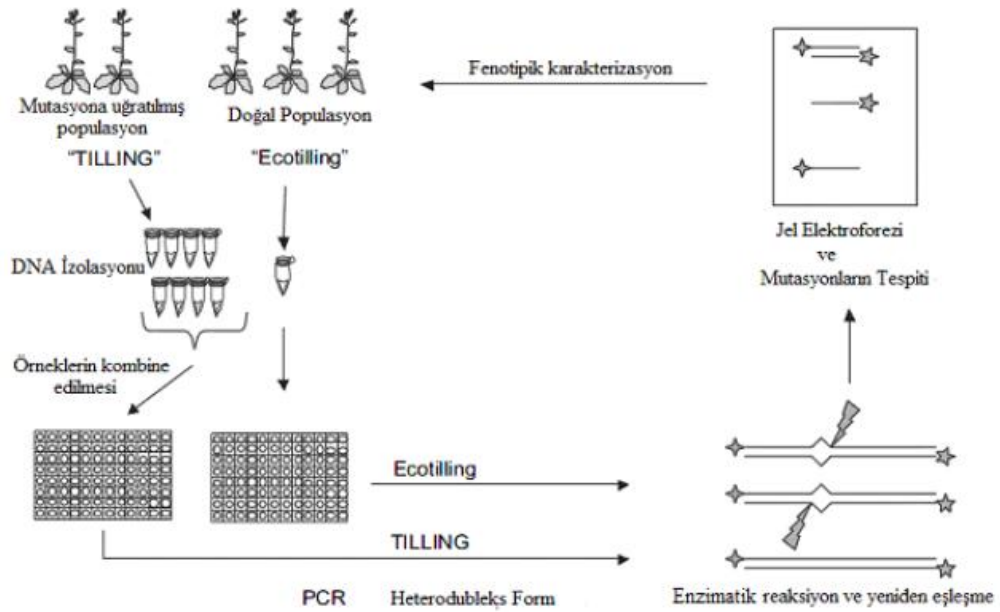
SSR markörlerinin, PCR'a dayalı olması, yüksek yapılı bitkilerin genomlarında çok yaygın olarak bulunmaları, bitki genomlarında yüksek oranda

polimorfizm göstermeleri, tekrarlanabilmeleri, teknik olarak hızlı, kolay olması ve ko-dominant olmaları avantajları arasında yer alır. SSR markörlerinin dezavantajları ise yüksek oranda çözünürlük veren jellerin hazırlanması, bir türe ait yeni mikrosatelitlerin elde edilmesi (Büyükcinal-Bal, 2003), klonlama ve dizi analizi çalışmalarını gerektirmesidir. SSR markörlerinin yüksek polimorfizme sahip olması ve ko-dominant olması ile genetik çalışmalarda kullanımı artmıştır (Turunç, 2010).

TILLING ve EcoTILLING (Targeting Induced Local Lesions InGenome): Genetik yapıdaki farklılıkların ve özellikle mutasyonların ve tespitinde kullanılan bir yöntemdir. TILLING ve EcoTILLING doğal polimorfizmler ve mutasyonların hızlı şekilde belirlenmesinde kullanılan birbirlerine çok yakın yöntemlerdir (Henikoff ve Comai, 2004). TILLING yöntemi birkaç basamaktan oluşan ve birbirini takip eden bir çalışma yöntemidir. (Till ve ark., 2006). Bu yöntemde ilk işlem EMS gibi nokta mutasyonu teşvik eden bir kimyasalla tohumlarda mutasyon teşvikidir. Tohumlardan M1 bitkilerinin elde edilmesi ve M1 bitkilerinin kendilenmesi sonucunda M2 bitkileri elde edilir ve bu bitkilerden mutasyon taraması için DNA izolasyonu gerçekleştirilir (Colbert ve ark., 2001). Mutasyona teşvik edilen bitkisel materyale ait DNA'lar uygun şekilde karıştırılarak bir havuz oluşturulur ve PCR reaksiyonu hazırlanır. PCR amplifikasyonu için Forward 5' ucu floresan boya ile etiketlenmiş primer ve Reverse 5' ucu floresan boya ile etiketlenmiş primerler kullanılır. PCR amplifikasyonundan sonra amplifikasyonu sağlanan DNA materyalinin ilk önce denatürasyonu ve ardından tekrar renatürasyonu gerçekleştirilir. Bu basamakta mutasyon içeren DNA zinciri ile mutasyon olmayan DNA zinciri arasında yanlış bir eşleşme sonucu heterodupleks bir yapı oluşacaktır.

Oluşan bu yanlış eşleşmeler ilgili DNA materyalinde mutasyon olduğunun tespitidir. Bu yanlış eşleşmeleri kesmek için tek zincir spesifik nükleazlar ile örnekler inkübasyona tabi tutulur. Reaksiyon sonlandıktan sonra DNA saflaştırılması yapılır ve DNA'lar floresan etiketle çoğaltılmış DNA parçalarını tanıyan poliakrilamid jel sistemlerinde koşturulur. PCR amplifikasyonunda kullanılan Forward ve Reverse primerlerin farklı dalga boylarına göre etiketlenmesinden dolayı çoğalan DNA parçaları farklı iki tabaka ile görüntülenebilir. Mutasyon içeren DNA parçaları yanlış eşleşme sonrasında uygun kesim enzimiyle kesildiği için bu iki

tabakada PCR ürününün genel boyutunu oluşturan ve birbirini tamamlayan iki DNA bandı gözlenir. Bu şekilde birbirini tamamlayan iki DNA bandı gözlemlendiği zaman bu örnekte mutasyon olduğu tespit edilmiş olmaktadır ve ilgili DNA'ya ait sekanslama işlemi gerçekleştirilerek mutasyonun tipi belirlenebilir (Till ve ark., 2006; Şimşek, 2009). Tilling ve EcoTilling analiz aşamaları Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil.1.1. Tilling ve EcoTilling analiz aşamaları (Till ve ark., 2006; Şimşek, 2009).

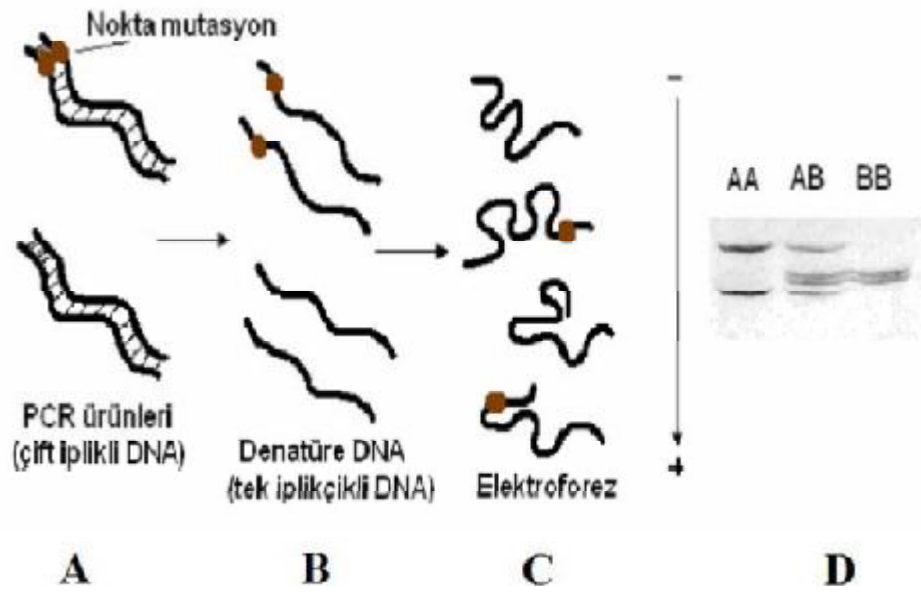
SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism): Bu tez çalışmasında kullanılmış olan ve mutasyonların tespiti için kullanılan diğer bir yöntem ise SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)' dir. SSCP, PCR kullanımını içeren mutasyon saptama yöntemlerinden birisidir (Öner, 2002). Tek zincir DNA' nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (=ikincil yapının) oluşmasına ve poliakrilamid jel elektroforezinde yada mutasyon çalışmaları için özelleştirilmiş her hangi bir jel üzerinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir.

Mutasyon içeren DNA molekülü tek bir baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir bant oluşturacağı için nondenatüre jel elektroforezinde normalden farklı yerlerde bantlar gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek bu yöntem ile

karşılaştırıldığında normalden farklı bant(lar)ın bulunması örnekte mutasyonun varlığını göstermektedir (Öner, 2002; Tuli, 2001; Kocatürk Sel., 2005; Şimşek, 2009).

SSCP analizinin duyarlılığı yani mutasyonları tarama özelliği %35-100 arasında değişir (Solak ve ark., 2000). Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri incelenen DNA fragmentinin uzunluğudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığında düşme olur. Örneğin 300 bp'den kısa DNA parçalarında başarı %99 dolayında iken 300-450 bp'lik DNA parçalarının incelenmesinde aynı oran %90 seviyesine düşmektedir. SSCP'nin uygulandığı mutasyon analizlerinde PCR ürünlerinin küçük tutulması istenir. Bu yöntemde önce, ya uzun DNA molekülünün RE (restriksiyon enzimi) ile kesimi ya da PCR yöntemi ile küçük DNA fragmentleri elde edilir. Sonra bu çift sarmallı DNA fragmentleri denatüre edilerek tek sarmallı hale getirilir. Daha sonraki aşamada ise non-denatüre koşullarda poliakrilamid jel elektroforezi yapılır (Solak ve ark., 2000; Şimşek, 2009).

SSCP mutasyon analizleri için olduğu kadar, polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem jel üzerindeki molekülün elektroforetik hareketine bağlı olarak işlemektedir. Bu yöntemde denatüre olmayan ortamlarda tek sarmal DNA'nın katlanıp molekül içindeki etkileşimlerle aldığı konuma (konformasyona) göre değerlendirme yapılmaktadır. Tek sarmal konformasyon polimorfizmi analizinde tek bir nükleotiddeki değişim katlanmayı ve yeniden şekillenmeyi değiştirir. Bu değişim elektroforetik mobilitateye de aynı düzeyde etki yapmaktadır. Dolayısıyla diğer bazı mutasyon analiz yöntemlerinde olduğu gibi heterozigot konumdaki bir değişim elektroforetik olarak dört farklı tek sarmal DNA bandı vermektedir (Şekil 1.2. D). Bu dört bant normal allelin anlamlı ve anlamsız dizisi ile mutant allelin anlamlı ve anlamsız dizisini içermektedir (Solak ve ark., 2000). SSCP'nin kullanım alanları arasında, mutasyonların tespiti, allelik çeşitliliğin belirlenmesi, genetik ilişkilerin belirlenmesi, genetik haritaların oluşturulması gibi analizler sayılabilir. SSCP tekniğinin ko-dominant özellik göstermesi de önemli bir avantajdır, böylece heterozigot karakterlerin ortaya çıkarılmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır (Şimşek, 2009).



Şekil 1.2. SSCP Analiz Aşamaları; A) PCR reaksiyonu sonucu elde edilmiş mutasyon içeren DNA ürünleri. B) PCR ürünlerinin denatürasyonu sonucu elde edilmiş tek zincirli DNA parçaları. C) Denatüre edilmiş PCR ürünlerinin kendi konformasyonlarında kıvrılmaları sonucu jelde farklı hareket etmeleri. D) Kendi konformasyonlarında kıvrılmış DNA parçalarının non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda ki görüntüleri (Şimşek, 2009).

Bu tez çalışmasının amacı; Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümündeki “Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonu” ndaki bazı portakal genotiplerinin, genetik farklılıklarının SSCP markırları ile araştırılmasıdır. Elde edilen verilerin turunçgil taksonomi çalışmalarına yardımcı olacağı ayrıca ıslah çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez kapsamında elde edilen bilgiler koleksiyonların daha planlı olarak korunması ve turunçgil taksonomi çalışmaların yardımcı olması bakımından önem taşımaktadır. Bu çalışmanın aynı zamanda bundan sonraki turunçgil ıslah programlarının düzenlenmesinde yardımcı olacak önemli çıktılarının sağlaması bakımından da başvuru kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgillerde genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla moleküler düzeyde birçok çalışma yapılmıştır ve halen yapılmaya devam etmektedir. Bu bölümde, portakallarda ve diğer turunçgillerde genetik farklılıkları belirlemek amacıyla gerçekleştirilen SSCP çalışmalarına ve diğer moleküler yöntemlere yer verilmiştir.

2.1. Turunçgillerde yapılan SSCP çalışmaları

Şimşek ve ark (2011), turunçgil anaçlarında demir klorozundan sorumlu genlerde allelik çeşitliliği tespit etmek amacıyla SSCP analizleri gerçekleştirmiştir. Çalışmada ilk olarak turunçgil EST'lerinden demir klorozundan sorumlu iki aday gen belirlenmiştir. Turunçgil anaçlarını temsil eden 8 farklı turunçgil genotipi seçilerek, belirlenen aday genlere özgü PCR primerleri kullanılarak genlerin PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiş ve PCR ürünlerinden direk DNA sekans yapılarak genlerin seçilen 8 genotip açısından DNA sekansları belirlenmiştir. SSCP analizlerini gerçekleştirmek amacıyla DNA sekanslar kullanılarak yeni SSCP primerleri dizayn edilmiş ve SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir. Fe-S geni için elde edilen dendrogramda, demir klorozuna duyarlı oldukları bilinen üç yapraklı genotipler aynı grup içinde kümelenmiş, üç yapraklı melezleri ise kendi içerisinde aynı alt kollarda yer almışlardır. IRT1 geni için oluşturulan dendrogramda ise benzer sonuçlar bulunmuştur, üç yapraklı ve melezleri aynı alt kollarda kümelenmişler ve mandarin genotipleri arasında yüksek bir varyasyon tespit edilmiştir.

Turunçgillerde şeker ve asit seviyesi, meyve kalitesi ve meyve suyu sanayi'inde önemli bir kriter olarak bilinmektedir. Luro ve ark (2011), şeker (glukoz, fruktoz ve sukroz) ve asitliğin (organik asitler) altyapısını oluşturan ve düzenlenmelerinde rol oynayan genleri kullanarak turunçgil genetik farklılıkları ve varyasyonları tesbit etmişlerdir. Meyve suyu içeriğini, aynı çevre ve büyüme koşulları altında gelişen 8 turunçgil türüne ait 87 çeşitte HPLC analizleri ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada, dokuz aday genin polimorfizm sekanslaması şeker ve asitliğin metabolik süresinin anahtar enzimlerine göre SSCP ile araştırılmıştır.

Hem moleküler hem de biyokimyasal analizlere göre, turunçgillerde gözlenen farklılık, üç atasal grupta (mandarin, pummelo ve citron) organize edilmiştir. Biyokimyasal farklılıklar, cins düzeyinde SSCP farklılıklar ile çok yakın bir korelasyon sağlamıştır, fakat aynı durum tür içi düzeyde geçerli olmamıştır. Diğer moleküler markırlar ile kıyaslandığında, daha yüksek farklılık sağlayan SSCP teknolojisi, turunçgillerdeki asitlik ve tatlılığın düzenlenmesinde gelecek QTL haritalama çalışmaları için uygun bulunmuştur.

Aka-Kaçar ve ark (2012), bazı turunçgil anaçlarında, belirlenen demir klorozundan sorumlu 2 farklı aday genle (Fer 3, PMT 4) allelik çeşitliliği tespit etmek amacıyla DNA sekans çalışmaları ve SSCP analizleri yapmışlardır. SSCP analizleri sonucu cluster analizleri yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur. Cluster analizleri incelendiğinde, allelik çeşitliliğin tespit edilmesi amacıyla kullanılan mandarin genotiplerinde yüksek oranda farklılıklar tespit edilmiştir. Demir klorozuna duyarlı olduğu bilinen üç yapraklı genotipleri aynı kolda yer almıştır. Demir klorozuna dayanıklı olan turunç genotipleri arasında polimorfizm tespit edilmiştir.

2.2 Turunçgillerde genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla yapılan diğer moleküler yöntemler

Albanese ve ark (1992), Farklı limon çeşitlerinin genetik ilişkilerini belirlemek amacıyla RFLP analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada Femminello, Apireno, Continella, F. comune, F.S Tresa, İnterdonato ve Monachello limonları kullanılmış ve genetik ilişkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda çeşitler arasında polimorfizm olduğu belirlenmiş ve RFLP yönteminin test edilen çeşitler arası genetik farklılıkları belirlemek için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Luro ve ark (1992), bazı turunçgil türlerinde RAPD markırları ile genetik ve taksonomi çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada 3 farklı RAPD primeri kullanılmış ve her primer için ayrı dendrogram oluşturulmuştur. Dendrogramlar arasında bazı farklılıklar olmakla birlikte genel olarak benzer sonuçlar vermiştir. Turunçgillerin iki veya üç ayrı gruba ayrılabilceği belirtilmiştir. Mandarin ile portakal, laym ile ağaç kavunu ve altıntop ile şadok aynı grup içerisinde yer almıştır.

Motohashi ve ark (1992), 25 turunçgil çeşidinde RFLP markırlarını kullanarak DNA parmakizi analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada Kara ve King mandarinleri birbirlerinden ayırt edilebilmiştir. Duncan altıntopu ile Dancy mandarinini melezleri olan Semineola ve Minneola, tangeloları Duncan altıntopuna daha yakın bulunurken, Orlando tangelo, Dancy mandarinine daha yakın olarak tespit edilmiştir. Semineola %92 oranında, Minneola ise %67 oranında Duncan altıntopu ile aynı bantları göstermişlerdir. Orlando Tangelo ise %88 oranında Dancy mandarinini ile aynı bantları vermiştir. DNA parmakizi çalışmalarının çeşit tanımlaması ve melezlerde ebeveyn belirleme çalışmaları için kullanılabilecek yöntem olduğu belirtilmiştir.

Fang ve Roose (1997), yapmış oldukları çalışmada, 22 ISSR primerini 68 turunçgil çeşidine ait 94 ağaç örneği arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla test etmişlerdir. Çalışma sonucunda ISSR markırları mutantların seçiminden orijin alan 33 portakaldan 14'ünü ve 7 altınoptan 1'ini ayırabilmiştir. Altı limon kültüründen 5'i ISSR markırları ile ayrılabilmiştir. Çalışmada kullanılan mandarinler arasında çok fazla farklılık bulunmuştur.

Portakalların sahip olduğu morfolojik değişikliği moleküler seviyede belirlemede RAPD veya isoenzim markırlar uygun değildir. Bu nedenle Novelli ve ark (1998), yapmış oldukları çalışmada, portakal (*C. sinensis* [L.] Osbeck)'pera çeşidinin genomik DNA kütüphanesinden geliştirdikleri mikrosatellit markırları 31 portakal çeşidinde değerlendirmişlerdir. Değerlendirilen 18 mikrosatellit primeri portakal çeşitleri arasındaki farklılıkları ortaya çıkaramamıştır. Bu nedenle araştırmacılar portakalda genetik farklılıkları belirlemek için yeni mikrosatellit primerlerinin geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Targon ve ark (2000), portakal çeşitlerinden izole ettikleri genomik DNA'ları, çeşitler arasındaki polimorfizmleri belirlemek ve karakterize etmek amacıyla RAPD analizleri yapmışlardır. Çalışmada kullanılan çeşitler arasında fenotipik farklılıklar olmasına rağmen polimorfizm bulunamamıştır. Araştırmacılar, RAPD analizlerinin portakal çeşitleri arasındaki farklılıkları belirlemek için uygun bir yöntem olmadığını, daha hassas yöntemlerin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Yeşiloğlu (2002), Turunçgil cins, tür ve akrabalarından oluşan 30 adet türü RAPD markırları kullanarak tanımlamış ve çalışma sonucunda turunçgil cins, tür ve akrabaları arasındaki polimorfizm oranının 0.26-0.85 arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmada, ‘İlkel Turunçgil Grubu’nda yer alan *Pleiospermium alatum* ve *Severinia buxifolia* ile ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *C. fortunella* ve *Microcitrus* cinslerine ait türler arasındaki polimorfizmin genel olarak yüksek bulunduğu, ‘İlkel Turunçgil Grubu’nda yer alan *Pleiospermium alatum* ile ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *C. micrantha* türleri arasındaki polimorfizm oranının denemeye alınan türler içerisinde en yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir. *Pleiospermium alatum* ile ‘Yakın Turunçgil Grubu’ içerisinde yer alan *Citropsis gilletiana* arasındaki polimorfizmde yüksek olduğu saptanmıştır. En düşük polimorfizm oranı ise ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *C. limonia* ve *C. pennivesiculata* türleri arasında bulunmuştur.

Ahmad ve ark (2004), turunçgil genom analizlerinde mikrosatellit markırlarının potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, Washington Navel portakalının DNA dizisini kullanarak mikrosatellit markırları geliştirilmiştir. Tasarlanan mikrosatellitlerden biri hariç diğer tüm mikrosatellitler polimorfik bulunmuştur. Toplam 26 primer çifti kullanılarak 118 allel tanımlanmıştır. Allellerin sayısı her primer için 1 ile 9 arasında değişmiş ve ortalaması 4.5 bulunmuştur. Mikrosatellit markırlar portakallar (*C. sinensis* L. Osbek), mandarin (*C. reticulata* Blanco), altıntop (*Citrus paradisi* Macf.), limon (*Citrus limon* L Burm.f.) ve sitranj (üç yapraklı ve portakalın melezi) arasındaki tür seviyesinde olan farklılıkları ortaya çıkarmıştır.

Novelli ve ark (2004), yapmış oldukları çalışmada, tek nükleotid polimorfizm analizlerini (SNP) Citrus tür ve akrabalarından oluşan 58 genotipte araştırmışlardır. ‘Pera IAC’ portakalı’nın genomik dizisi primer dizaynı ve SNP’lerin tanımlanması için STS’lerin seçiminde kullanılmıştır. Analiz edilen 36 STS bölgelere bakıldığında, kullanılan 41 portakal genotipinin 40’ünde dizilerin özdeş olduğu görülmüştür. Ancak bu genotipler çoğu SNP markırı için heterozigot bulunmuştur. Diğer genotipler ile karşılaştırıldığında, ‘Pera IAC’ portakal genotipinde toplam 150 polimorfik nükleotid tanımlanmış ve bunlardan %52’si değişken bulunmuştur.

Zhang ve ark (2005), portakalların genetik kaynaklarını ISSR markırları yardımı ile tanımlamak amaçlı yaptıkları çalışmada kullandıkları 22 ISSR primerinden 13 tanesinden PCR amplifikasyonu sağlamışlardır. Çalışmada kullanılan 22 örnekten 11 tanesi ISSR markırlar ile tanımlanmış, aynı isimlerdeki bazı örnekler birbirinden farklı bulunmuştur. Çalışmada polimorfizm oranı %6.9 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler portakallarda germplasm farklılığının çok düşük olduğunu göstermiştir.

Chen ve ark (2008), NCBI resmi web sitesinden aldıkları turuncgil EST dizilerinden bilgisayar programı yardımıyla mikrosatellit ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Toplamda 3.278 SSR içeren diziler 56.199 turuncgil EST'lerinden karakterize edilmiştir. Ortalama 1 SSR her 5,2 kb'lık EST dizisinde bulunmuştur. SSR primer dizileri 2.295 turuncgil EST'lerinden tanımlanmıştır. Bunlar arasından 100 primer çifti sentezlenmiş ve portakal ile *Poncirus* cinsleri içerisindeki/arasındaki heterozigotiyi ve polimorfizmi belirlemek için test edilmiştir. PCR amplifikasyonu veren 87 primer çiftinden portakallar için 52'si homozigot, 35'i heterozigot bulunurken, *Poncirus* için 67'si homozigot, 20'si heterozigot bulunmuştur.

Novelli ve ark (2006), turuncgiller için yeni SSR markırları geliştirmek ve bunları portakallarda karakterizasyon çalışmalarında kullanmak amacıyla araştırmalar yapmışlardır. Çalışmalarda normal, göbekli, kan ve düşük asitli portakal çeşitleri kullanılmıştır. CCSM17 ve CCSM147 SSR lokusları bazı düşük asitli ve göbekli portakallarda, CCSM13 lokusu normal portakallarda ve CCSM18 lokusu ise normal ve kanlı portakallarda polimorfik bulunmuştur. Araştırmacılar, elde edilen polimorfik lokusların nuseller ve zigotik bitkilerin ayırt edilmesinde ve fidanların tanımlanmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmadan, genel olarak portakallar arasında dar bir genetik temel olduğu ve var olan morfolojik farklılıkların mutasyonlardan kaynaklanabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Aka Kaçar ve ark (2009), turuncgillerde anaç olma özelliği olan yirmi üç genotipin genetik ilişkilerini SSR markırları ile belirlemişlerdir. Çalışmada genotiplerin genetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla toplam 10 SSR primer çifti kullanılmıştır. Değerlendirmeye alınan 9 mikrosatellit primer çifti her genotip için 1

ile 3 arasında değişen bantlar vermiştir. CI03D12a primer çifti, 10 bant vererek en yüksek polimorfizm oranını sergilemiştir. Bu primer için elde edilen bantlar 238 bp-58bp uzunluğunda dağılmışlardır. Elde edilen genetik veriler ile genetik benzerlikler hesaplanmış ve genetik benzerliklere dayalı dendrogram oluşturulmuştur.

Baig ve ark (2009), RAPD markırları kullanarak, 13 tür ve 5 hibriti içeren 18 turuncgil çeşidi arasındaki genetik benzerliği araştırmışlardır. Toplamda 250 markır geliştirilmiştir. Polimorfizm gösteren 231 markır arasından 25'i seçilmiştir. Genetik benzerliği hesaplamak için Jaccard katsayısı kullanılmıştır. Dendrogram UPGMA yöntemine göre oluşturulmuş ve benzerlik katsayısı 0.61 olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda, Jaffa portakalı ve kan portakalı %82 benzerlik oranı ile maksimum benzerlik göstermiştir.

Fang ve ark (2009), yapmış oldukları çalışmada, 57 portakal çeşidini kullanmışlar ve genotipler arasındaki genetik ilişkileri AFLP markırları kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmada toplam 10 adet AFLP primer çifti kullanılmıştır. Çalışma sonucunda portakallar arasındaki polimorfizm oranının düşük olduğu belirtilmiş, ancak araştırmacılar, bu yöntemin ISSR ve SSR markırları ile kıyasladığında portakal çeşitleri için daha tercih edilebilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Jannati ve ark (2009), 23 turuncgil genotipi ve 4 doğal hibrit arasındaki polimorfizm seviyesini belirlemek için 15 SSR primer çifti kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan tüm primerler yüksek polimorfizm göstermiş ve her lokustaki allel sayısı 4-12 arasında değişmiş ve her lokustaki allel sayısı ortalama 8.27 olarak bulunmuştur. Yapılan cluster analizi sonucunda, iki cluster grubu oluşmuştur. Birinci grupta Yuzo ve *Poncirus* yer almıştır. İkinci grup kendi arasında *Fortinella* cinsi, mandarin alt grubu ve *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium*, *Citrus medica* ve *Citrus grandis* olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır.

Uzun (2009), yaptığı çalışmada, Türkiye turuncgil koleksiyonlarında bulunan turuncgil türleri ve bunların akraba gruplarına ait 825 adet genotipte SRAP markırları ile genetik çeşitliliği ortaya koymuştur. Çalışmada 21 adet primer kombinasyonu kullanılmış ve materyaller tür gruplarına göre sekiz ayrı gruba ayrılarak çalışılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde her grup ayrı olarak değerlendirilmiş ve daha sonra gruplar kombine edilerek toplam on ayrı değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen

sonuçlara göre, portakal, türleri içerisinde düşük düzeyde varyasyon olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada portakal grubunda toplam 137 adet bant elde edilmiş, bunlardan 46 tanesi polimorfik bulunmuş ve polimorfizm oranı %34 olarak tespit edilmiştir. Portakal grubunda elde edilen toplam bant sayısı ve polimorfik bant sayısı çalışmada değerlendirilen diğer gruplara göre daha az tesbit edilmiştir. Bunun nedeni portakal grubunda yer alan bireylerin pek çoğunun hibrit orijinli olmayıp mutasyon orijinli olmalarına işaret edilmiştir.

Malik ve ark (2012), 22 portakal çeşidi arasındaki genetik farklılıkları belirlemek amacıyla RAPD ve morfolojik analizler yapmışlardır. Çalışmada kullanılan 20 RAPD primeri ile toplam 99 bant elde edilmiş, bantlardan 48'i polimorfik bulunmuş ve polimorfizm oranı %51.83 olarak belirlenmiştir. Çeşitler arasındaki benzerlik 0.48 ile 1.00 arasında değişmiş ve ortalama 0.77 olarak bulunmuştur. Portakal çeşitleri arasındaki orta seviyedeki polimorfizm ve yüksek orandaki genetik benzerlik, portakal çeşitlerinin yüksek morfolojik farklılığına rağmen düşük genetik farklılığın olması görüşünü desteklemiştir. Çalışma sonucunda elde edilen dendrogramda tüm çeşitler Delta Valensiya ve portakal olmak üzere iki ana kümeye ayrılmıştır. Bu çalışmada, portakal çeşitleri arasındaki düşük genetik farklılık, bazı somatik mutasyonlardan elde edilen fenotipik varyasyonlar ile açıklanabilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında Ç.Ü.Z.F. Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonunda bulunan 40 portakal çeşidi ve ek olarak 3 farklı turunçgil genotipinin (Satsuma, pumelo, marsh seedless) SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir ve genetik akrabalıkları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan materyel Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Genetik farklılıkları araştırılmış olan portakal çeşit/tipleri

N O	Çeşit/Tip	Latince ismi
1	Valencia 75 A	<i>C.sinensis</i> 'cv.Valencia'
2	Succary (şeker) B 3/12 15-6	<i>C.sinensis</i> 'cv.Succary'C.V
3	Kozan yerlisi 17-10	<i>C.sinensis</i> 'cv.Kozan yerlisi
4	Midknight Valencia	<i>C.sinensis</i> 'cv.Midknight Valencia'
5	Moro (5293 R)	<i>C.sinensis</i> 'cv.Moro'
6	Washington 28A	<i>C.sinensis</i> 'cv.Washington Navel'
7	Akçay şekeri (A-39)	<i>C.sinensis</i> 'cv.Akçay şekeri'C.V
8	Washington (18m)	<i>C.sinensis</i> 'cv.Washington Navel'
9	Navelina IV/A 7-5	<i>C.sinensis</i> 'cv.Navelina'
10	Navelate IVI A 2-7	<i>C.sinensis</i> 'cv.Navelate'
11	Tarocco Rosso portakalı SRA 574	<i>C.sinensis</i> 'cv.Tarocco Rosso'
12	Fukumoto Navel	<i>C.sinensis</i> 'cv.Fukumoto'
13	Tarocco (7323)R	<i>C.sinensis</i> 'cv.Tarocco' Group
14	Şeker Portakalı (Zerrefin Ist. - İsrail)	<i>C.sinensis</i> 'cv.Zerrefin 'Şeker portakalı'
15	Washington (37A)	<i>C.sinensis</i> 'cv.Washington Navel'
16	Finike Yerli portakalı (Antalya)	<i>C sinensiscv.</i> 'Finike yerli'
17	Hamlin SRA 41	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Hamlin'

18	Pine apple B 3/19 18-10	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Pineapple'
19	Lane Late IVI A 198-1	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Lane late'
20	Olinda Valencia (7229 R)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Olinda' nuceller Valencia
21	Salustiana	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Salustiana'
22	Yafa seleksiyon 46/A	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Yafa 46 A'
23	Valencia (571)	<i>C.sinensis</i> 'cv. Valencia'
24	Dört yol Yerlisi (17-2)	<i>C.sinensiscv.</i> 'Dört yol Yerlisi'17-2
25	Şeker portakalı (Ö.Özler Teksas)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Şeker portakalı'Ö.Özler-Teksas
26	Alanya dilimi Portakalı (Antalya)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Alanya Dilimi portakalı'Antalya
27	Newhall Navel(7322T)	<i>C.sinensis</i> ;cv. 'Newhall' Nuceller Navel
28	Maltaise Blonde Portakalı SRA 239	<i>C.sinensis</i> 'cv. Maltaise
29	Parson Brown(5297R)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Parson Brown'
30	Tulegold Navel	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Tulegold'
31	Carter Navel (9321 c)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Carter Navel'
32	Sanguinello B 2/10 16-7	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Sanguinello'
33	Cara Cara	<i>C. sinensis</i> 'cv.'Cara Cara'
34	Moro (A,17)	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Moro'
35	Valencia (76 A)	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Valencia'
36	Succary (kan) B 3/12 154	<i>C.sinensis</i> 'cv. Succary-Kan'3/12 154
37	Compbell Valencia (7246 R,N)	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Campbell Nuceller Valencia'
38	Rhode Red Valencia SRA 360	<i>C. sinensis</i> 'cv. 'Rhode Red Valencia'
39	Spring Navel	<i>C.sinensis</i> 'cv. 'Spring'
40	Shamouti (5291 T)	<i>C.sinensis</i> 'cv.'Shamouti'5291 T
41	Satsuma (S2-29)	<i>C.unshiu</i>
42	Pummelo- Reinking (K1-35)	<i>C.maxima</i> 'cv. 'Reinking'
43	Marsh seedless(N-36)	<i>C.paradisi</i> 'cv.marshseedless(N-36)

Bu çalışmada kullanılan ve portakal çeşitlerini temsil eden gruplar ve farklı turunçgil grupları arasındaki bazı çeşitlerin genel özellikleri aşağıda sunulmuştur.

3.1.1. Normal Portakallar

3.1.1.1. Hamlin

Florida'da tesadüf çöğüründen elde edilmiş bir çeşittir. Büyük taç oluşturur. Özellikle semitropik iklime uygun bir çeşittir. Portakallar içinde düşük sıcaklıklara en dayanıklı çeşittir. Verimlidir ve fazla periyodisite göstermez. Meyveleri orta büyüklükte ve yuvarlaktır. Aralık ayı başında olgunlaşır. Subtropik iklimlerde meyve kalitesi ve kabuk renklenmesi daha iyi olmaktadır. Kuru madde içeriği ve meyve suyu miktarı bakımından dikkat çeken bir çeşittir. Brezilya'da hem meyve suyu için hem de sofralık olarak kullanılır. Meyve kabuğu orta ince ve çekirdek sayısı azdır. Florida ve Brezilya'nın başlıca çeşitlerinden biridir (<http://www.mycitrustree.com>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Hamlin SRA 41 genotipi kullanılmıştır.

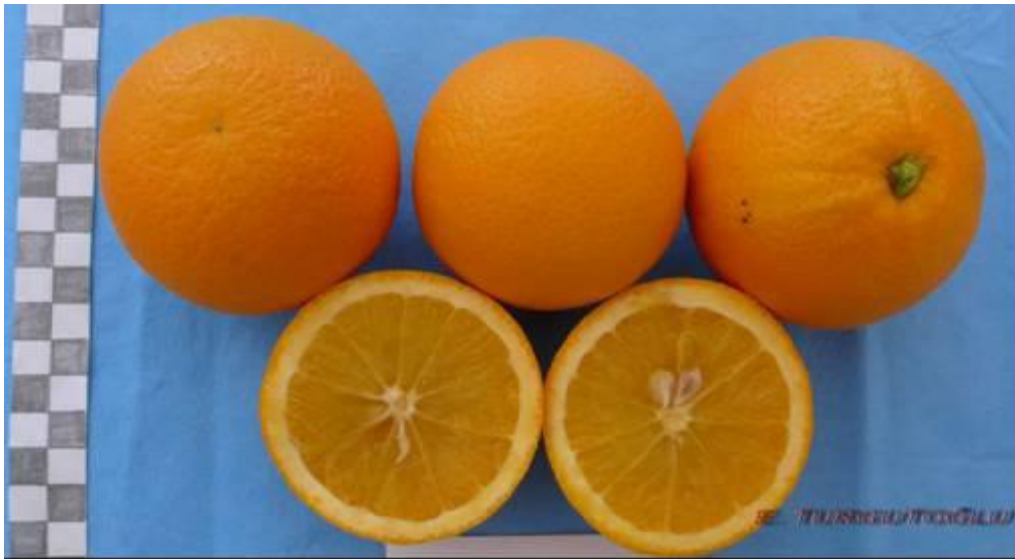
3.1.1.2. Valencia

İspanya kökenli bir çeşittir. Göz mutasyonu ile meydana gelmiştir. Küresel şekilli ve sık taç oluşturur. Ağaçları orta büyüklüktedir.

Meyveler yuvarlak, meyve kabuğu hafif pürüzlü ve orta kalınlıktadır. Meyve eti kalitesi yüksektir. Usare miktarı % 45 olup, şeker asit oranı dengelidir. Hem sofralık hem de sanayiye yönelik (sıkmalık) bir çeşittir. Verimliliği düzenlidir ve ekoloji seçmez. Soğuk subtropik iklimden çöl iklimine kadar geniş bir yelpazede ekonomik olarak yetiştirilebilir. Geçici bir çeşittir. Mart ortasından temmuz ortasına kadar değişik zamanlarda olgunlaşan tipleri vardır. Özellikle subtropik koşullarda olgun meyve ve çiçekler aynı anda ağaç üzerinde görülebilir.

Meyvelerde önemli bir sorun yeniden yeşillenmedir. Kışın oluşan portakal rengi marttan itibaren sıcaklığın yükselip sıcaklık farkının azalmasıyla kaybolur, meyve kabuğunda klorofil oluşumu meydana gelir. Bu, Valencia'nın tipik özelliğidir.

Dünyada yetiştirilen değişik klonları vardır. Bunlardan önemlileri Olinda, Frost, Campbell, Cutter, Midnight ve Delta'dır. Geç mevsim çeşidi olduğundan bazı bölgelerde kış soğuklarından meyvelerin zararlanma riski vardır (<http://users.kymp.net/citruspages/home.html>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Valencia 75 A, Midnight valencia, Olinda valencia, Valencia (571), Valencia (76 A), Compbell valencia (7246R,N) ve Rhode red valencia SRA 360 genotipleri kullanılmıştır.

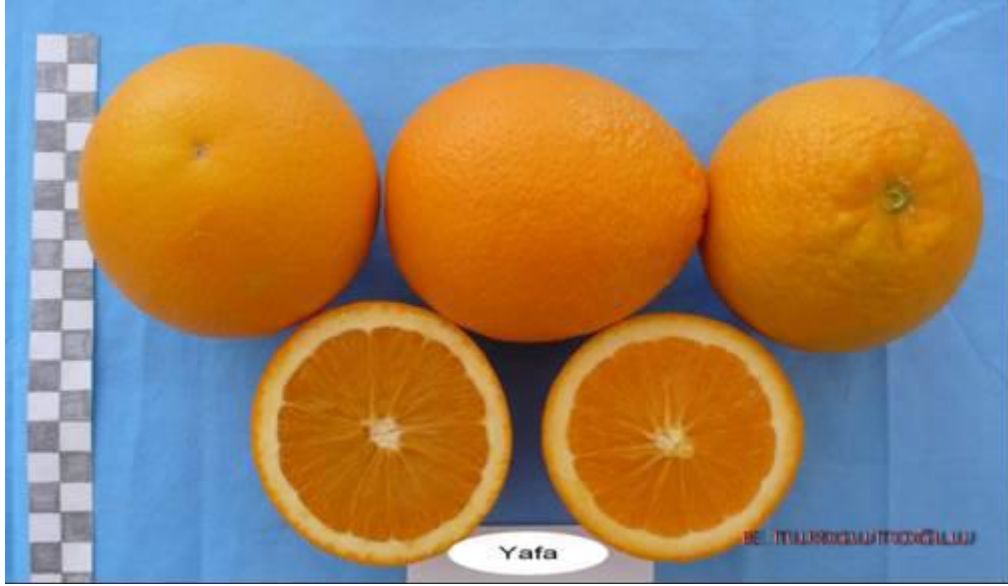


Şekil 3.1. Valencia çeşidine ait meyvelerin görünümü (Kafa ve Canihoş, 2010).

3.1.1.3. Yafa

Çıkış noktası İsrail'in Yafa şehridir. 1844 yılında Beledi portakalından göz mutasyonu sonucu oluşmuştur. Mutasyona elverişli olduğundan birçok tipi vardır. Büyük taç oluşturur. Yapraklar büyük ve diğer portakallardan daha açık renklidir. Dallar ve gövde kırılkan bir yapıya sahiptir. Meyveler orta irilikte, oval şekilde olmakla birlikte, sap tarafında bir düzlük de bulunabilir. Kabuğu hafif pürüzlüdür. Sap tarafına doğru kalınlaşan orta kalınlıkta bir kabuğa sahiptir. Ticari anlamda çekirdeksiz bir çeşittir (Şekil 3.2). Meyve eti gevrek, sulu ve çok lezzetlidir. Ekoloji seçen bir çeşittir ve periyodisiteye eğilimlidir.

Ekolojiye ve kullanılan anaca göre kalite özellikleri değişmektedir. İsteddiği en iyi ekoloji Mersin’dedir. Orta mevsim çeşidi olup olgunlaşma dönemi ocak ortası şubat başlarıdır (Kafa ve Canihoş, 2010). Tez kapsamında bu gruba ait olan Yafa seleksiyon 46/A genotipi kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Yafa portakalına ait meyvelerin görünümü (Kafa ve Canihoş, 2010).

3.1.1.4. Salustiana

Daha çok Batı Akdeniz ülkeleri tarafından yetiştirilir. İspanya’da 1950 yılında göz mutasyonu ile elde edilmiş erkenci bir çeşittir. Valencia’dan sonra İspanya’nın en önemli çeşididir. Kasım sonlarında olgunlaşır. Meyveler orta büyüklükte ve yuvarlaktır. Stil ucu tarafında “mühür” denen tam veya eksik daire şeklinde bir iz bulunur. Çekirdeksiz ve çok yüksek kalitelidir. Erkenci olması nedeniyle çok iyi renklenmez ve meyve kabuğu orta kalınlıktadır. Olgunluktan sonra ağaç üzerinde Nisan ayına kadar kalabilir. Meyve eti yumuşak, sulu ve lezzetlidir. Verimli bir çeşit olup İspanya’nın önemli ihraç çeşitlerindendir. Tez kapsamında bu gruba ait olan Salustiana genotipi kullanılmıştır.

3.1.1.5. Kozan Portakalı

Türkiye’de özellikle Adana ili Kozan ilçesi ve çevresinde yetiştirilen yerli bir çeşittir. Meyveler yuvarlak, meyve kabuğu orta kalın ve pürüzlüdür. Meyve eti koyu portakal renkli, çok sulu, kuru maddece zengin ve ortalama 8 çekirdeklidir. Bu nedenle Türkiye’de sanayiye yönelik en önemli çeşitlerden biridir. Verimde düzensizlik gösterir ve orta geç mevsimde olgunlaşır. Tez kapsamında bu gruba ait olan Kozan yerlisi 17-10 genotipi kullanılmıştır.

3.1.1.6. Finike Yerli

Genellikle Finike–Kumluca yöresinde yetiştirilen yerli bir çeşittir. Kökeninin Rodos adası ve ya İtalya olduğu sanılmaktadır. Meyveleri orta büyüklükte, yuvarlak ve sitil ucunda mühür bulunmaktadır. Usare miktarı yüksektir. Ağaç ömrü uzun, verimli, verim düzensizliğine eğilimlidir. Ekoloji seçer ve ekolojisi dışında meyve kalitesi düşer. Orta mevsim çeşididir ancak meyveler ağaç üzerinde uzun süre kalabilir. Batı Akdeniz bölgesinde hem sofralık, hem meyve suyu için kullanılır. Bu bölgede Washington Navel’in pazardan çekilmesiyle pazara bu çeşit girmektedir. Tez kapsamında bu gruba ait olan Finike yerli portakalı (Antalya) kullanılmıştır.

3.1.1.7. Alanya Dilimli

Kökeni bilinmeyen sadece Alanya ve çevresinde yetiştirilen ve önemini gittikçe kaybeden bir çeşittir. En önemli özelliği sap tarafından sitil ucuna doğru 4–8 adet oluk bulunmasıdır. Meyveler küçük ve orta büyüklükte, yuvarlak, meyve eti koyu portakal renginde ve çok suludur.

Kirece en dayanıklı portakal çeşididir. Verimlidir, ancak verim düzensizliğine eğilimi yüksektir. Orta mevsim çeşididir. Alanya’da ocak ayında olgunlaşır. Tez kapsamında bu gruba ait olan Alanya dilimi (Antalya) kullanılmıştır.

3.1.2. Göbekli Portakallar

Göbekli portakallar turunçgiller içerisinde meyvede göbek denilen ikincil bir meyve içermelerinden dolayı diğer çeşitlerden ayrılırlar. Genel olarak çekirdeksiz çeşitlerdir. Çevre koşullarına karşı diğer çeşitlerden daha hassastır. En kaliteli olarak yetiştirildikleri ekolojiler Akdeniz havzası ve Kaliforniya'dır.

3.1.2.1. Washington Navel

Göbekli portakalların temelini oluşturan bu çeşit Brezilya'nın Bahia yöresinde Celesta portakal çeşidinden mutasyonla oluşmuştur. Orta büyüklükte ve yuvarlak taçlı ağaçlar oluştururlar. Meyve yuvarlak ve meyve kabuğu hafif pürüzlüdür. Çekirdeksiz (Partenokarp) bir çeşittir. Çiçek tozu oluşturmaz. Olgunlaşma zamanı orta erkencidir (Aralık sonu). Orta sulu bir çeşittir. Uygun bakım koşullarında düzenli verim verir. Çevre koşullarından özellikle de kuru rüzgâr ve soğuktan etkilenir. Yafa kadar olmasa da ekoloji seçicidir. Dünyadaki en iyi Washington Navel ekolojilerinden biri Mersin bölgesidir. Dökümlere karşı duyarlıdır. Olgunluktan sonra ağaçta uzun süre bekleyemez dökülür. Türkiye'de hem iç tüketim, hem de ihracat için aranan başlıca çeşittir (<http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Washington 28A, Washington (18m) ve Washington (37A) genotipleri kullanılmıştır.



Şekil 3.3.Washington Navel Portakalına Ait Meyvelerin Görünümü (Kafa ve Canihoş, 2010).

3.1.2.2. Navelina

Kaliforniya kökenli olan bu çeşit Washington Navel'den göz mutasyonu ile meydana gelmiştir. Ağacı Washington Navel'den daha küçüktür fakat daha erken olgunlaşır. Bu erkencilik yaklaşık iki haftadır. İspanya'da ekim ortalarında kabuk rengi henüz yeşil iken hasat için kabul edilebilir minimum kalite standartlarına ulaşmaktadır. Meyveler Washington Navel'den biraz küçük ve daha ovaldir (<http://users.kymp.net/citruspages/sweetoranges.html>).

Değişik ülkelerde yetiştiriciliği yapılmasına karşın esas olarak İspanya'da yetiştirilmektedir. Erkenci olması, kış soğuklarından önce hasat edilmesi ve kaliteli olmasından dolayı Türkiye koşulları için uygun bir çeşittir. Tez kapsamında bu gruba ait olan Navelina IVIA 7-5 genotipi kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Navelina Portakalına Ait Meyvelerin Görünümü (Kafa ve Canihoş, 2010).

3.1.2.3. Navelate

İspanya kökenli olan bu çeşit Washington Navel'den doğal mutasyonla meydana gelmiştir. Ağacı Washington Navel'den biraz daha büyük fakat biraz dikenlidir. Meyveler ve göbek Washington Navel'den küçüktür ve soyulması daha zordur. Şubat ayında olgunlaşır. Meyve iç kalitesi kabul edilebilir seviyeye gelmesine rağmen kabuk renklenmesi daha sonra meydana gelir. Meyveler ağaç üzerinde pazar değerini yitirmeden dört ay veya daha fazla kalabilir. En kaliteli olarak yetiştiği ekolojiler İspanya benzeri ekolojilerdir (Kafa ve Canihoş, 2010). Tez kapsamında bu gruba ait olan Navelate IVI A 2-7 genotipi kullanılmıştır.

3.1.2.4. Lane Late

Avustralya kökenli olup, Washington Navel'den göz mutasyonu ile meydana gelmiştir. Ağaç özellikleri Washington Navel'le aynıdır ancak meyve kabuğu daha düzgün ve göbek daha küçüktür. Muhafaza ve taşımaya Navelate'den daha uygundur. Geç mevsim çeşididir. Son dönemlerde İspanya'da Navelate'nin yerini

almaktadır (<http://users.kymp.net/citruspages/sweetoranges.html>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Lane late IVI A 198-1 genotipi kullanılmıştır.

3.1.2.5. Newhall

Washington Navel'den göz mutasyonu ile oluşmuş Kaliforniya kökenli bir çeşittir. Meyve özellikleri bakımından Navelina'dan ayırt edilmesi zordur. Ancak olgunlaşma zamanı farklıdır ve asit içeriği daha düşüktür. Navelina'dan yaklaşık 1 hafta sonra olgunlaşır. Kaliforniya koşullarında Washington Navel'den daha erken kabuk renklenmesi meydana gelir. İspanya'da Navelina ile aynı derecede popülerdir. Navelina gibi erkenciliği ve kış soğuklarından önce hasat edilmesinden dolayı Türkiye için uygun bir çeşittir. Bu çeşitler dışında Avustralya orijinli ve geç dönem çeşitleri olan Powell, Chislett ve Barnfield gibi bazı göbekli portakal çeşitleri, Kaliforniya ve İspanya'da denemeye alınmış ve bu çeşitlerin üretimine başlanmıştır (<http://users.kymp.net/citruspages/sweetoranges.html>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Newhall Navel (7322T) genotipi kullanılmıştır.

3.1.3. Kan (Pigmentli) Portakalları

Kan portakallarının çıkış noktasının Malta veya Sicilya adası olduğu sanılmakla beraber, son dönemlerde Çin kaynaklı olduğu şeklinde görüşler de vardır. Bu portakallar normal portakallara benzemekle birlikte, yetiştirilme bölgeleri, meyve eti ve bazen de meyve kabuğunda kırmızı renk oluşturmaları nedeniyle farklıdır. Bu renk pigmenti birçok bitki dokusunda yer alan antosiyanindir. Renk maddeleri ancak düşük gece sıcaklığında oluşturulabilmektedir. Tropik ve semitropik bölgelerde bu renk maddeleri meydana gelememektedir. Ancak hasat sonrası soğukta depolama sırasında bu renk maddeleri oluşmaktadır. Kan portakalları özellikle Batı Akdeniz'de (İspanya, Fas, Tunus, Cezayir ve İtalya) yetiştirilmektedir. Özellikle İtalya'da kan portakalı suyu meşhurdur. Meyvelerin genellikle küçük olması ve yeni göbekli kan portakallarının elde edilmesi yetiştiriciliği sınırlayıcı faktörlerdir (http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus/blood_oranges.html).

3.1.3.1. Moro

Özellikle İtalya ve Sicilya’da yetiştirilen kökeni Sanguinello Moscata çeşidine dayanan bir çeşittir. Ağacı orta büyüklükte ve verimlidir. Meyveleri küçükten orta boya kadar değişiklik gösterirken, meyve şekli, kabuk yapısı ve renk açısından fazla çeşitlilik gösterir. Hatta bu konuda standart bir Moro özelliği ortaya koymak zordur. Meyve içindeki renklenme iklime bağlı olmakla beraber renkli portakallar içinde meyve eti en koyu renkli olan çeşittir. Uygun koşullarda kırmızı renk meyve etini tamamen kaplamaktadır (Şekil 3.5). Bazı durumlarda renklenme meyve kabuğunda da görülmektedir. İç ve dış renklenmesinden dolayı belli miktarda Kaliforniya’da da yetiştirilmektedir. Meyve az çekirdekli veya çekirdeksiz, kabuğunun soyulması kolaydır. Usare miktarı yüksek, meyve eti yumuşak ve aroma, renklenme derecesine bağlı olarak artmaktadır. Ocak ayında hasat edilir, şubat’tan sonra kalitesini ve taşınmaya karşı dayanıklılığını kaybeder (http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus/moro_3811.html). Tez kapsamında bu gruba ait olan Moro (5293 R) ve Moro (A, 17) genotipleri kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Moro Portakalına Ait Meyvelerin Görünümü (Kafa ve Canihoş, 2010)

3.1.3.2. Sanguinello

İspanya kökenli olup, Doble Fina'dan göz mutasyonu sonucu oluşmuştur. Ağaçlar orta boyda, dikensiz ve verimlidir. Meyveler küçükten orta boya kadar değişiklik gösterir ve oval şekillidir. Meyve kabuğu düzgün, genellikle pigmentli, soyulması zor olan hatta albedo kısmı dilimlere yapışan bir çeşittir. Meyve eti koyu kırmızı değildir ve renklenme genelde dilim duvarlarına yakın kısımlardadır. Meyve eti yumuşak, usare miktarı yüksek, tatlı ve asitliği Doble Fina'dan düşüktür. Birkaç çekirdeklidir ve çekirdeksiz sayılabilir. Ocak ayında olgunlaşır ve ağaç üzerinde kalitesini kaybetmeden Doble Fina'dan daha uzun süre kalır. İspanya'da yaygın olarak yetiştirilir (Kafa ve Canihoş, 2010). Tez kapsamında bu gruba ait olan Sanguinello B 2.10 16-7 genotipi kullanılmıştır.

3.1.3.3. Tarocco

Kökeni, en eski ve şu anda nadiren yetiştirilen hafif renkli Sicilya çeşidi Sanguigno'ya dayanmaktadır. Ağaçları orta büyüklükte düzensiz şekilli ve verimliliği ortadır. Güneydoğu İtalya'da yetiştirilen seleksiyonları vardır. Tarocco del Francofonte, orta ve iri meyveli, hafif boyunlu olmasıyla diğer seleksiyonlardan ayrılan bir çeşittir. Meyve kabuğu olgunlukta portakal renklidir ve kırmızı renk oluşturmamaktadır. Kabuğu kolay soyulmaktadır. Dilim zarları yumuşak ve hafif renklidir. Ocak sonuna kadar bekletilirse tam olgunlaşır ve çok güzel aromaya sahip olur. Çevre koşullarına karşı duyarlıdır. Toprak kireçli ve pH yüksek olursa şiddetli kloroz görülür. Güzel kokulu, dengeli tadı ve asitliliği ile en iyi Akdeniz portakalları arasında yer alan bir çeşittir. Ticari anlamda çekirdeksiz ve muhafazaya uygundur. Tarocco del Muso, daha belirgin boyun meydana getirmesiyle diğerlerinden farklıdır. Tarocco Rosso, kabukta belirgin renklenme yapan ve diğer özellikleri bakımından Tarocco del Francofonte'ye benzeyen bir seleksiyondur (<http://users.kymp.net/citruspages/bloodoranges.html#tarocco>). Tez kapsamında bu gruba ait olan Tarocco rosso SRA 574 ve Tarocco (7323)R genotipleri kullanılmıştır.

3.1.4. Şeker (Asitsiz) Portakalları

Bu portakallar çok düşük miktarda asit içermektedir. Yetiştirildikleri bölgelerde özellikle çocuklar tarafından sevilir. Ancak dünya ticaretindeki payları azdır. Avrupa ve Kuzey Amerika’da çok az bilinir. Özellikle Brezilya, Ortadoğu ve Hindistan gibi sıcak iklimlerde yetiştirilir.

3.1.4.1. Succari

Kökeni bilinmeyen ve özellikle Mısır ve çevresinde yetiştirilen bir çeşittir. Ağaçları güçlü ve verimlidir. Ekim ayından itibaren hasat edilebilir ve meyve ağaç üzerinde puflaşma ve granülasyon problemi olmadan uzun süre kalabilir. Meyve küçük ve orta boylarda ve yuvarlaktır. Kabuk düzgün, güzel renkli ve meyve etine sıkı bağlıdır. Ağaç üzerinde çok uzun süre bekletilirse kabuk üzerinde buruşukluk görülebilir. Çok çekirdeklidir, meyve başına ortalama 25 çekirdek bulunur. Meyve eti portakal renkli, sulu, yumuşak ancak lezzetsiz ve alışılmamış bir tada sahiptir. Kuru madde miktarı yaklaşık % 10, asit miktarı % 0.1’ dir (Kafa ve Canihoş, 2010). Tez kapsamında bu gruba ait olan Succary (Şeker) B 3.12 15-6 ve Succary (kan) B3.12 154 genotipleri kullanılmıştır.

3.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Diğer Turunçgil Grupları

3.1.5.1. Mandarin

Güneydoğu Asya’da mandarin yetiştiriciliğinin M.Ö.19 yüzyıla dayandığı bildirilmektedir. 1805 yılında İngilizlerce Malta Adasına getirilen mandarinin, Akdeniz Bölgesinde asıl gelişmesini gösterdiği bildirilmektedir. Mandarinin diğer turunçgil türlerine göre soğuklara daha dirençli olması geniş bir adaptasyon yeteneği sağlamıştır. Çöl iklimi, semi tropik ve subtropik iklimlerde yetiştirilebilmektedir. Ancak bazı çeşitler kaliteli ürün için belli iklimleri istemektedir. Örneğin Dancy, Ellendale ve Ponkan semitropik iklimleri tercih etmektedir (Kafa ve Canihoş, 2010).

Tez kapsamında mandarin grubuna ait olan Satsuma (5291T) genotipi kullanılmıştır.

3.1.5.2. ALTINTOP

Orijini tam olarak bilinmemekle birlikte, son çalışmalar doğal bir portakal-şadok (pummelo) melezi olduğunu ortaya koymuştur. Barbados adasında bir şans çöğürü olarak ortaya çıktığı sanılmaktadır. Grapefruit olarak isimlendirilmesinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte bunun nedeni olarak, bir görüşe göre tadının üzüme benzemesi, diğer görüşe göre ağaç üzerinde salkım şeklinde meyve bağlaması gösterilmektedir. 1880'li yıllarda A.B.D'de ticari olarak üretilmeye başlanmıştır (users.kymp.net/citruspages., Kafa ve canihoş, 2010).

3.1.5.(3). PUMMELO (Şadok)

Şadok büyük narenciye olarak optimal koşullarda bir futbol topu boyutuna ulaşabilir. Yaprakları alternatif, ovat, veya eliptik, 5-20 cm uzunluğunda, 2-12 cm genişliğinde, donuk yeşil, ve inceden tüylüdür. Geniş bir yaprak sapına sahiptir. oldukça çok sulu ve lezzeti hafif tatlı ve mülayim mayhoştur. (users.kymp.net/citruspages). Tez kapsamında bu gruba ait olan Pummelo- Reiking (K1-35) genotipi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu

Tez kapsamında SSCP analizlerine dayanarak genetik ilişkilerinin araştırılacağı 43 genotipe ait DNA'ların izolasyonu MiniPrep DNA izolasyon yöntemine göre yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiş ve DNA'ların miktar ve kaliteleri Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre cihazında 1,5 µl DNA örneği kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.1.1. DNA İzolasyonu için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Johnstone ve Thompson, 1991). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.2’de sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform: izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1M pH:8, EDTA: 0.5M pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

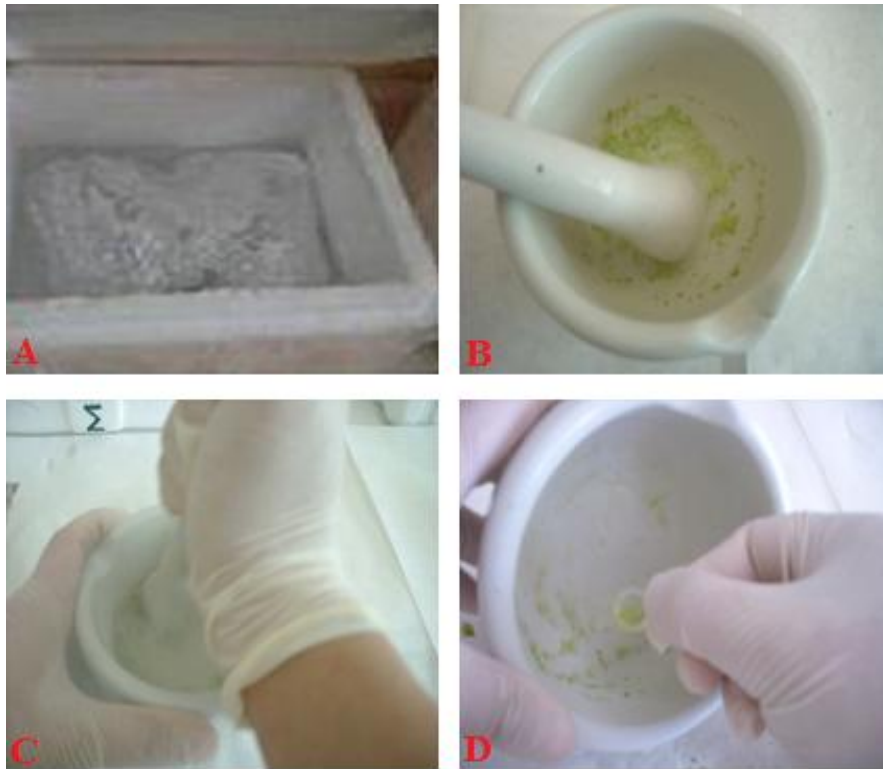
Çizelge 3.2. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Tampon Çözeltisinin İçeriği

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	%2.00
NaCl (5 M)	1.4M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0.2M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0.1M

3.2.1.2. DNA İzolasyon Aşamaları

1. Hazırlanmış olan ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396µl ve 4µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.
2. Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmış ve daha sonra tüpler 65°C’de 20 dakika bekletilmiştir ve iki defa karıştırılmıştır.
3. Her tüpe 400µl kloroform: izoamilalkol eklenerek 15 dakika vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
4. Tüpler 5 dakika 13.000 rpm/dk santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiştir ve tüplerin içine 400µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
5. Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 mikrolitre soğuk (-20°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C’de bekletilmiştir.

6. 5 dakika 13.000 rpm/dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir.
7. Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözölmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
8. Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C’de bekletilmiştir.
9. 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
10. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökölmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir.
11. Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözölmüştür.
12. Örnekler -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.6. A.Yaprakların Sıvı Azota Daldırılması, B-C. Yaprakların Sıvı Azotta Öğütölməsi, D. Örneğın Saklanması için Santrifüj Tüplerine Doldurulması.



Şekil 3.7. A. Öğütülmüş Bitkisel Materyalin 65° C’de Bekletilmesi, B. Tüplerin Üzerine Solüsyonların Eklenmesi, C-D. Santrifüj İşlemi.

3.2.1.3. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA’ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Ölçümleri gerçekleştirilen DNA’lar ile ilgili hesaplamalar yapılmış ve DNA miktarları aynı olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.2.2. DNA Amplifikasyonu

Tez çalışmasında, 40 portakal genotipinde ve ek olarak 3 farklı turruçgil çeşidinde genetik farklılıklar tespit edilmiştir. Aşağıda SSCP analizleri için uygulanan PCR koşulları, PCR protokolü ve döngü koşulları belirtilmiştir.

Kullanılan Kimyasallar	Her Örnek için kullanılan miktar
PCR Master	Mix 2X 15.8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
Forward Primer (5 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (5 µM)	0.5 µl
ddH ₂ O	2 µl
Taq Polimraz (1 Ünite)	0.2 µl
DNA (50 ng/µl)	3 µl
Toplam Hacim	23 µl
94°C	2 dk ön denatürasyon
94°C	30 sn denatürasyon
55°C	45sn bağlanma
72°C	2dk polimerizasyon
72°C	10dk son uzama
4°C	saklama
} 40 döngü	

DNAlar, daha önceden dizayn edilen ve laboratuvarımızda hazır bulunan primerler ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek ‘termal cyclers’ içerisine yerleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Termal Cycler Cihazı

3.2.2.1. SSCP Analizlerinde Kullanılan Primerler

PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl çekilerek + 2µl yükleme bufferı eklenmiş ve % 1'lik agaroz jelde (Şekil 3.9), 1X TAE (Trizma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA (Na₂.EDTA.H₂O) buffer eklenerek koşulmuştur. Jel %0.1 oranındaki ethidium bromide solusyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek amplifikasyon ürünlerinin varlığı belirlenmiştir.

Agaroz jelde kontrol edildikten sonra, toplamda kullandığımız 19 SSCP primer çiftinden, 14 tanesinde amplifikasyonun sağlandığı gözlenmiş ve SSCP analizlerini başlamak üzere hazır olarak satın alınan GMA (Elchrom Scientific-USA) jelinde koşturulmuştur.

Araştırmada kullanılan ve amplifikasyonu sağlanan ve sağlanmayan primerlerin listesi ve dizi bigileri Forward ve Reverse olarak Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan SSCP primerleri

Primer No	Sekans	Uzunluğu
1	F: GACCACTTTGATGGCTGTGA	20
	R: GCAGAAGTCAGTAAACC	17
2	F: CATCACCAGCATATGGGACA	20
	R: CAGAAGCGGCAAGAATGT	18
3	F: ATCGTGTTATCGCCATGGTT	20
	R: CGTAACGTGCCAAAGTTTT	20
4	F: CGTGTTGCCTGATTCATTTG	20
	R: GCTTCAGGAATAACCCCAAGA	20
5	F: AGTGAAATGCATTATCTGTTGCAG	24
	R: TTATCAATATCTCTTGATTGCACA	24
6	F: TGTTGGAGTTTGTGGGCTGTA	22
	R: CCCCTTTGCAAAAACAGTTG	20
7	F: CTGACCCCACTGAGATGGAT	20
	R: CCCTTATTGCCATGATGCTT	20
8	F: CGTCGACTATGCCTGCTACA	20
	R: GCAGGTCTCTTCACCGAGTC	20
9	F: CAAAATTCACGATCGCCTTT	20
	R: AGGGCCAAACCTTTTCTCAT	20
10	F: TGGAATTGAAGGCAAAAAGG	20
	R: TGCTCTTCTGGCAGTTCTCA	20
11	F: TGCTAGCTCCAAGGACAGGT	20
	R: CGACCACAAGCTGATAGCAA	20
12	F: CCCAAATGTTCTTCGTCGAT	20
	R: AGAAATGCAGCGGAATCATC	20
13	F: GCACGGAAGCTTTGAAGAAC	20
	R: AGCTTCCCTCTCTTGCTTCC	20
14	F: TGGAGCTTGAATTGTGTCA	20
	R: GCCATTATGGTCGCTGATTT	20
15	F: GCGTCGTCTTTCAATTCTC	20
	R: TTAAGCCCAAATGGCAAGAG	20
16	F: AGCAACTGGCTGGTCTTACAA	21
	R: CCTCTTCGAATGGCTGAAAC	20
17	F: TTCTCTCTCAGGTTCTTGTACTTT	25
	R: GCTTTCTTTTCTATTTGTTTTCTGA	25
18	F: TGTTTCCCCTCTGCTTTCAC	20
	R: ATTTGGCAAGGCCTCTCAG	19
19	F: AAGAAGAAATGGGGGAAACG	20
	R: CTTGAGGCCATGGAGGATT	19



Şekil 3.9. A. Agaroz Jelin Dökülmesi, B. Agaroz Jelin Yüklenmesi, C. Agaroz Jelin Koşturulması

3.2.2.2. GMA (Genetic Mutation Analysis) Wide Mini S-2x13 Jeli

Tez kapsamında SSCP analizleri için özel hazırlanan ve hazır olarak temin edilen GMA jelleri, aşağıda belirtilen bazı avantajlardan dolayı kullanılmıştır. Bunlar;

- ▼ Mutasyon çalışmaları için uygun bulunması ve yüksek polimorfizmleri ayırt edilebilmesi,
- ▼ Radyoaktif işaretleyicilerin yerine Sayber gold ya da Red Gel gibi boyaların kullanılabilmesi,
- ▼ Sabit sıcaklıklarda polyacrilamid jeline göre daha iyi performans göstermesi
- ▼ Kolay boyanabilmesi,
- ▼ Tekrarlanabilir ve güvenilir olması,
- ▼ Kaliteli bantların elde edilmesidir.

3.2.2.3. Origin Elektroforez Cihazı

Çalışmada aşağıda belirttiğimiz avantajlardan dolayı Origins elektroforez cihazı (Elchrom Scientific USA) kullanılmıştır:

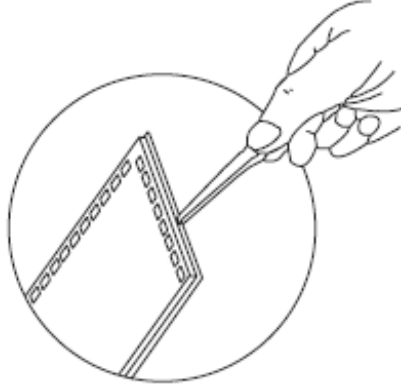
- ▼ Koşma süresi boyunca sirkulasyon sağlanması ve elektrik akımının eşit tutulması,
- ▼ Soğutucu özelliğinin olması,
- ▼ Güvenilir olması,
- ▼ Eğimsiz ve düz bantların elde edilmesi ve niteliğinde daha net sonuçların elde edilmesidir.

3.2.3. Örneklerin Hazırlanması

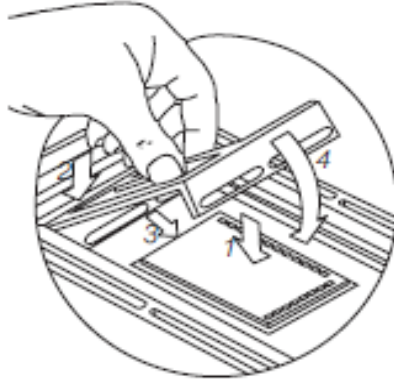
- a) 7 µl PCR ürünü 3 µl formamide-NaOH stok solüsyonu ile karıştırılmıştır.
- b) 95°C’de 5-6 dk tutulduktan sonra (Denaturasyon) hızlıca buz üzerine alınıp 5dk buz üzerinde bekletilmiştir.

3.2.4. Örneklerin GMA Jele Yerleştirilmesi ve Elektroforez

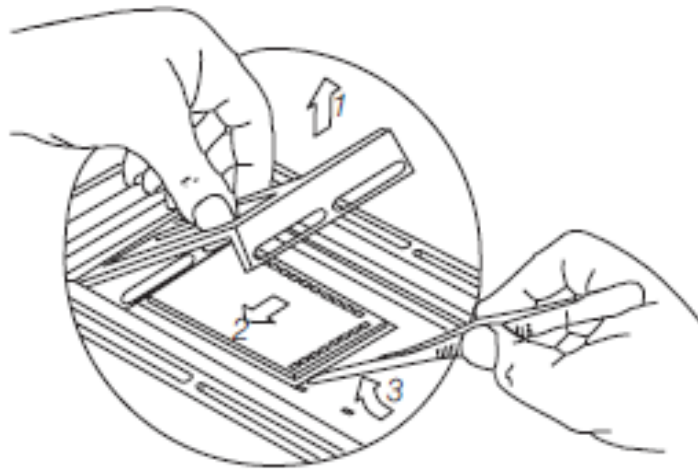
Denatüre edilen ve tek sarmallı hale getirilen DNA’lar, hızla GMA jele yüklenmiştir. GMA jel yükleme öncesinde plastik koruma poşetinde plastik bir tutucu yardımı ile jele zarar vermeden plastik taban bölgesinden tutularak çıkartılmış ve soğutuculu Origins elektroforez cihazına (Elchrom Scientific-USA) yerleştirildi ve katamaranla tank içerisinde sabitlenmiştir. Örneklerin yanı sıra 1000 bp’lik DNA ladderi kullanılmıştır.



Şekil 3.10. Jelin Poşetinden Çıkartılıp Tutulma Şekli



Şekil 3.11. Jelin Elektroforez Tankına Yerleştirilmesi



Şekil 3.12. Jelin Katamaranla Sabitlenmesi

Örnekler 10 µl lik kapasiteye sahip olan bir pipetle hızla GMA jele yüklendi ve 72V (6V/cm), 7C’de 12 saat elektroforeze tabi tutulmuştur.



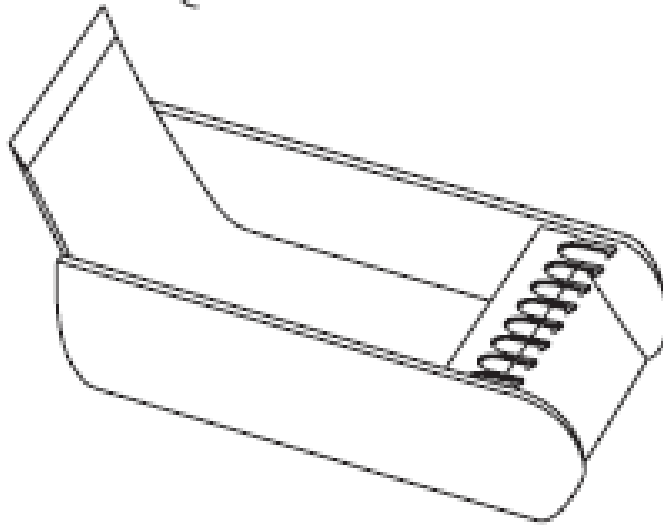
Şekil 3.13. Origins Elektroforez Cihazı (Elchrom Scientific USA)

3.2.5. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi

Oniki saat sonrasında jel dikkatlice plastik kısımlarından tutularak tanktan alınarak çıkartılmış ve plastik bir ip yardımı ile jel alt plastik tabanından ayrılmış ve 400 µl’ sinde 20µl Red Gel boyama solüsyonu bulunan bir boyama tankı içerisinde çalkanarak yarım saat boyanmış ve UV ışık altında incelenmiştir.



Şekil 3.14. Jelin Plastik İp Yardımı ile Alt Kısımdan Ayrılması



Şekil 3.15. Jelin Boyama Tankına Alınarak Boyanması

3.2.6. SSCP Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Dendrogramların Oluşturulması

SSCP analizleri sonucunda PCR ürünlerinin varlığı, mutasyon ve SSCP çalışmaları için özel hazırlanan ve hazır temin edilen GMA jel içerisinde tespit edilmiş bantlar, bant olma veya olmama durumlarına göre “1” veya “0” şeklinde değerlendirilmiştir. Bu veriler üzerinden cluster analizleri yapılarak dendrogramlar oluşturulmuştur. Cluster analizleri DARWİN 5.0.158 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows) bilgisayar paket programı, Neighbor-Joining metoduna (Saitou ve Nei, 1987) göre yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonu

Tez kapsamında kullanılan turuncgil genotiplerinden DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmış, izolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir. DNA'ların miktar ve kaliteleri Çizelge 4.1' de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Kullanılan bitkisel materyale ait DNA miktar ve saflıkları

Genotip	DNA miktarı (ng DNA μl^{-1})	DNA saflığı (A260/A280)
Valencia 75 A	1611.90	1.97
Succary (şeker) B 3/12 15-6	657.72	1.89
Kozan yerlisi 17-10	596.10	1.88
Midknight Valencia	1275.25	1.94
Moro (5293 R)	446.81	1.92
Washington 28A	522.90	1.85
Akçay şekeri (A-39)	785.96	1.92
Washington (18m)	1206.67	1.76
Navelina IV/A 7-5	171.03	1.31
Navelate IVI A 2-7	376.58	1.64
Tarocco Rosso Portakalı SRA 574	117.45	1.83
Fukumoto Navel	1279.60	2.00
Tarocco (7323)R	681.65	1.87
Şeker Portakalı (Zerrifin İst. - İsrail)	1297.48	1.94
Washington (37A)	580.44	1.91
Finike Yerli Portakalı (Antalya)	954.65	1.89
Hamlin SRA 41	649.31	1.85
Pine apple B 3/19 18-10	1209.37	2.01
Lane Late IVI A 198-1	514.40	1.77
Olinda Valencia (7229 R)	1221.69	1.97
Salustiana	1065.92	1.96

Yafa seleksiyon 46/A	1142.48	1.96
Valencia (571)	531.49	1.89
Dört yol Yerlisi (17-2)	1419.64	1.93
şeker portakalı (Ö.Özler _Teksas)	562.54	1.91
Alanya dilimi Portakalı (antalya)	1033.85	1.93
Newhall Navel(7322T)	1104.91	1.86
Maltaise Blonde Portakalı SRA 239	867.13	1.88
Parson Brown(5297R)	119.90	1.60
Tule gold Navel	151.16	1.90
Carter Navel (9321 c)	765	1.89
Sanguinello B 2/10 16-7	674	1.88
Cara Cara	1300.74	1.87
Moro (A,17)	1115.77	1.88
Valencia (76 A)	887.48	1.95
Succary (kan) B 3/12 154	343.32	1.92
Compbell Valencia (7246 R,N)	952.41	1.71
Rhode Red Valencia SRA 360	146	1.70
Spring Navel	1059.13	1.65
Shamouti (5291 T)	828.73	1.95
Satsuma (S2-29)	639.31	1.70
Pumelo- Reiking (K1-35)	274.44	1.90
Marsh seedless(N-36)	310.23	1.67

Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül, 2000). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışmada kullanılan turuncgöl anaçlarına ait DNA'lar incelendiğinde DNA miktarları oldukça yüksek bulunmuştur. DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Elde edilen değerin 2,0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,6 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunun göstergesidir (Hoisington, 1992). Tez kapsamında izolasyonları

gerçekleştirilen DNA'ların saflık oranları 1.31 – 2.01 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1). Tez kapsamında izole edilen tün DNA'lar yeterli miktarda ve kalitede bulunmuştur.

4.2. SSCP analizleri

Tez çalışmasında detayları materyal ve yöntem'de verilen toplam 19 tane primer çifti kullanılmıştır. SSCP-PCR analizleri yapılarak non-denatüre poliakrilamid jel analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlerden 14 tanesinden amplifikasyon sağlanmıştır. Amplifikasyon sağlanmayan primerler yada istenilen amplifikasyonu vermeyen primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Elde edilen sonuçlardan dendrogram oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2. SSCP analizlerinde amplifikasyonu sağlanan Forward ve Reverse primerleri

Primer No	Sekans	Uzunluğu
1	F: GACCACTTTGATGGCTGTGA	20
	R: GCAGAAGTCAGTAAACC	17
2	F: CATCACCAGCATATGGGACA	20
	R: CAGAAGCGGCAAGAATGT	18
3	F: ATCGTGTATCGCCATGGTT	20
	R: CGTAACGTGCCAAAGTTTTT	20
4	F: CGTGTTGCCTGATTCATTTG	20
	R: GCTTCAGGAATAACCCGAGA	20
5	F: AGTGAAATGCATTATCTGTTGCAG	24
	R: TTATCAATATCTCTTGATTGCACA	24
7	F: CTGACCCCACTGAGATGGAT	20
	R: CCCTTATTGCCATGATGCTT	20
8	F: CGTCGACTATGCCTGCTACA	20
	R: GCAGGTCTCTTCACCGAGTC	20
9	F: CAAAATTCACGATCGCCTTT	20
	R: AGGGCCAAACCTTTTCTCAT	20
10	F: TGGAATTGAAGGCAAAAAGG	20
	R: TGCTCTTCTGGCAGTTCTCA	20
11	F: TGCTAGCTCCAAGGACAGGT	20
	R: CGACCACAAGCTGATAGCAA	20
16	F: AGCAACTGGCTGGTCTTACAA	21
	R: CCTCTTCGAATGGCTGAAAC	20
17	F: TTCTCTCTCAGGTCCTTGACTTT	25
	R: GCTTTCTTTTCTATTTGTTTCTGA	25
18	F: TGTTTCCCCTCTGCTTTTAC	20
	R: ATTTGGCAAGGCCTCTCAG	19
19	F: AAGAAGAAATGGGGGAAACG	20
	R: CTTGAGGCCATGGAGGATT	19

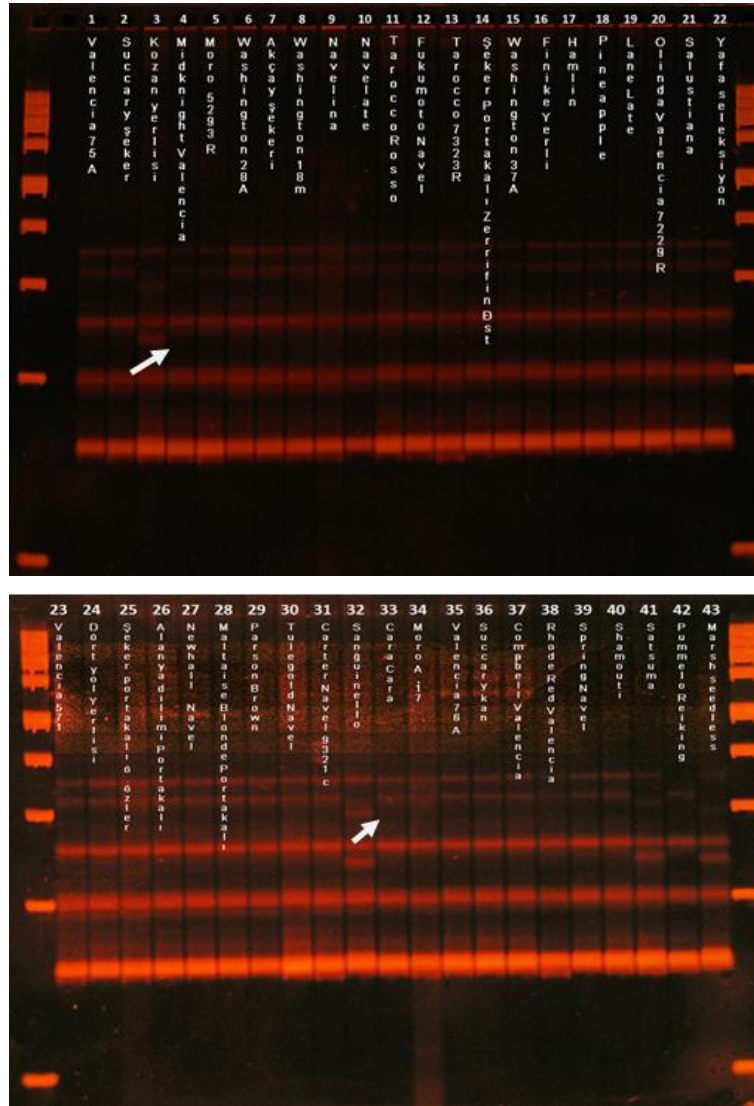
Çizelge 4.3. SSCP analizlerinde amplifikasyonu sağlanmayan Forward ve Reverse primerleri

Primer No	Sekans	Uzunluğu
6	F: TGTTGGAGTTTGTGGGCTGTA	22
	R: CCCCTTTGCAAAAACAGTTG	20
12	F:CCCAAATGTTCTTCGTCGAT	20
	R: AGAAATGCAGCGGAATCATC	20
13	F:GCACGGAAGCTTTGAAGAAC	20
	R:AGCTTCCCTCTCTTGCTTCC	20
14	F: TGGAGCTTGGAATTGTGTCA	20
	R: GCCATTATGGTCGCTGATT	20
15	F: GGCATCGTCTTTCAATTCTC	20
	R: TTAAGCCCAAATGGCAAGAG	20

Aşağıda istenilen kalitede amplifikasyonu sağlanan primerler ait bilgiler sunulmuştur.

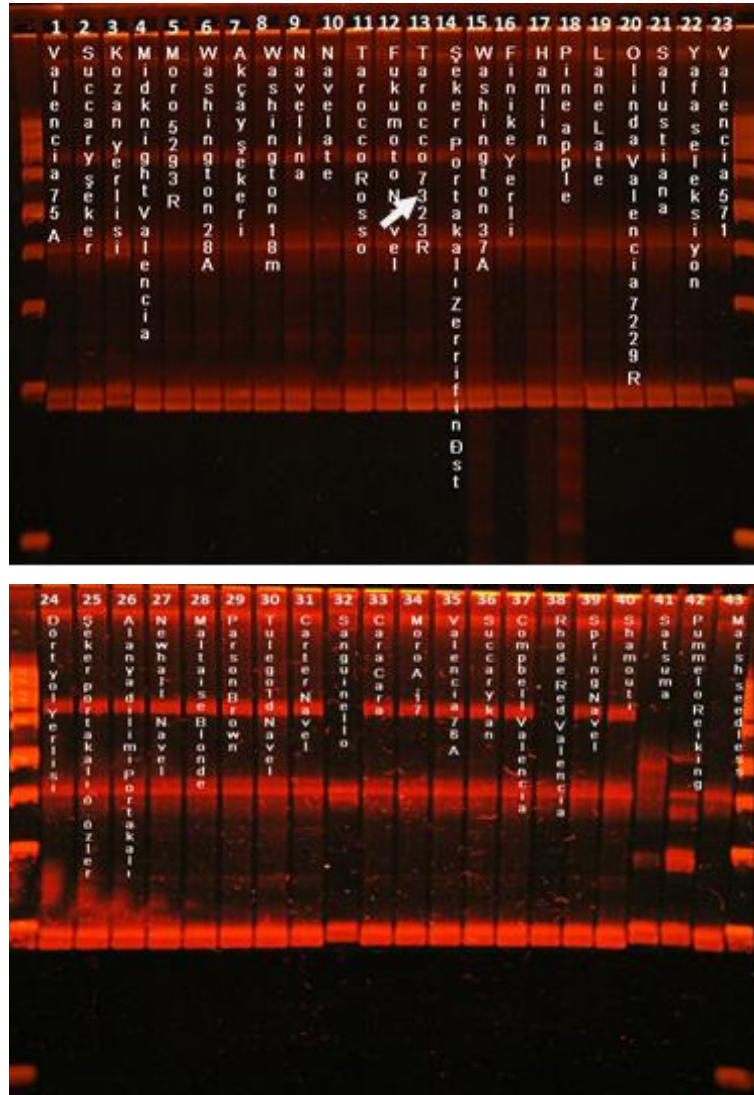
Primer #1: Toplam olarak 5 farklı bant elde edilmiştir. Elde edilen 5 DNA bantının 2'si polimorfik, 3'ü monomorfik sonuçlar vermiştir. Her genotip için en az üç, en fazla beş adet bant elde edilmiştir ve primerin polimorfizm oranı %40 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar Kozan yerlisi ve Pummelo Reiking (*C. maxima*)'e ait lokuslarda bulunmuştur.

Primer #2: Toplam elde edilen bant sayısı 9 adettir. Polimorfik bant sayısı ise 6 adet bulunmuştur. SSCP protokolü ile istenilen amplifikasyon elde edilmiş, karakterizasyon çalışmaları için analiz edilebilecek ve skorlanabilecek bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az beş, en fazla 7 adet bant elde edilmiştir. Primerin polimorfizm oranı %66.66 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen farklı bantlar, Navelate ıvı A 2-7, Valencia 75a, Succary şeker B 3/12, Kozan yerlisi, Satsuma S2-29, marsh seedless, Sanguinello B 2/10 ve Pummelo Reinking'e ait lokuslarda bulunmuştur. Bu primere ait jel görüntüleri Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. İki numaralı primere ait jel görüntüsü

Primer #3: Elde edilen toplam bant sayısı 7'dir. Toplam 5 polimorfik bant bulunmuş ve kaliteli bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az üç, en fazla altı adet bant elde edilmiş ve primerin polimorfizm oranı %71.42 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar Rhode Red Valencia, Kozan yerlisi, Satsuma S2-29, marsh seedles, Sanguinello B 2/10 ve Pummelo Reinking'e ait lokuslarda bulunmuştur. Bu primere ait jel görüntüleri Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4. 2. Üç numaralı primere ait jel görüntüsü

Primer #4: Elde edilen toplam bant sayısı 4 adettir. Toplam 1 adet polimorfik bant bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmaları için istenilen kalitede bantlar elde edilememiştir. Elde edilen tek polimorfik bant, Satsuma S2-29 genotipinde bulunmuştur. Polimorfizm oranı %25 olarak hesaplanmıştır.

Primer #5: Elde edilen toplam bant sayısı 6 adettir. Bu primer için her hangi bir farklılık ve polimorfizm gözlenmemiştir. Bu primer araştırılan genotipler için monomorfik olarak kabul edilmiştir.

Primer #7: Elde edilen toplam bant sayısı 3 adettir, ancak polimorfik bant elde edilmemiştir. Tüm genotipler için monomorfik olarak değerlendirilmiştir.

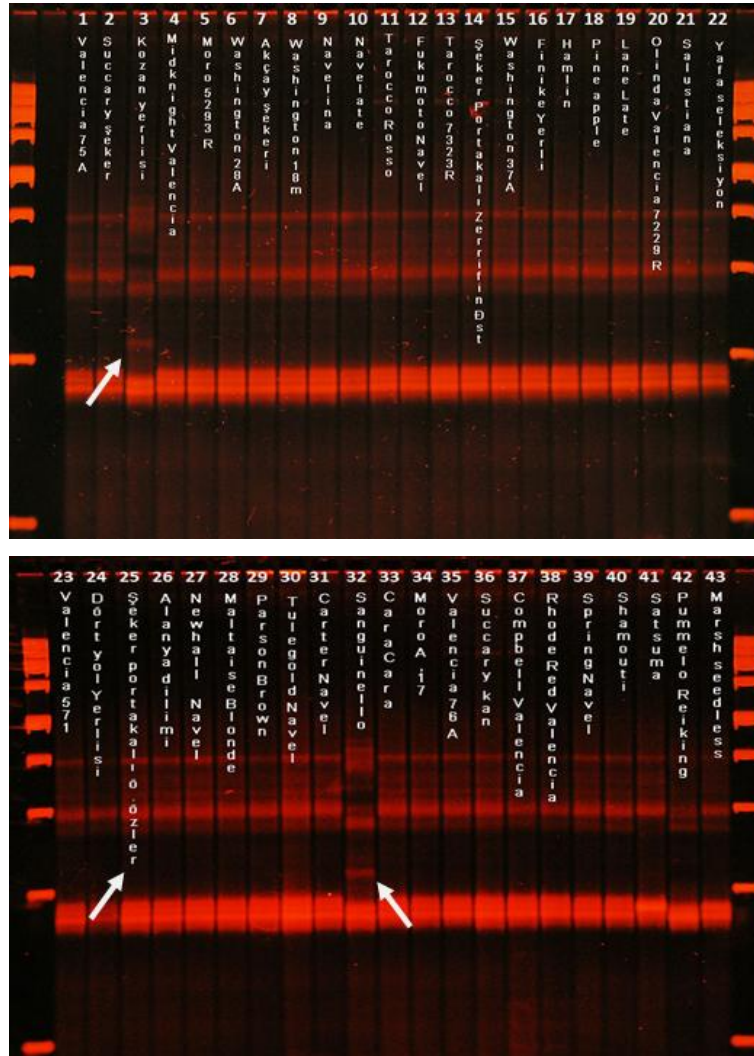
Primer #8: Elde edilen toplam bant sayısı 5 adettir. Polimorfizm bant sayısı ise 2 tanedir. Tezde belirtilmiş olan SSCP protokolü ile istenilen amplifikasyon elde edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları için kaliteli bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az üç, en fazla beş adet bant elde edilmiş ve primerin polimorfizm oranı %40 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar Kozan yerlisi, Pummelo Reinking, Satsuma S2-29, Sanguinello B 2/10 ve Marsh seedles, genotiplerine ait lokuslarda bulunmuştur.

Primer #9: Elde edilen toplam bant sayısı 6 adettir. Elde edilen bantlardan 5 tanesi polimorfiktir. Her genotip için en az bir, en fazla beş adet bant elde edilmiştir ve primerin polimorfizm oranı %83.3 olarak hesaplanmıştır. GMA jeli üzerinde elde edilen polimorfizm bantlar, Valencia 571, Kozan yerlis, Pummelo Reinking, Satsuma S2-29, Sanguinello B 2/10 ve Marsh seedles genotiplerinde saptanmıştır.

Primer #10: Elde edilen toplam bant sayısı 5 adettir. Toplam 4 polimorfik bant bulunmuştur. Belirtilmiş olan SSCP protokolü ile istenilen amplifikasyon elde edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları için kaliteli bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az üç, en fazla beş adet bant elde edilmiş ve primerin polimorfizm oranı %80 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar Rhode Red Valencia, Spring Navel, Pummelo Reinking, Satsuma S2-29, ve Marsh seedles genotiplerinde bulunmuştur.

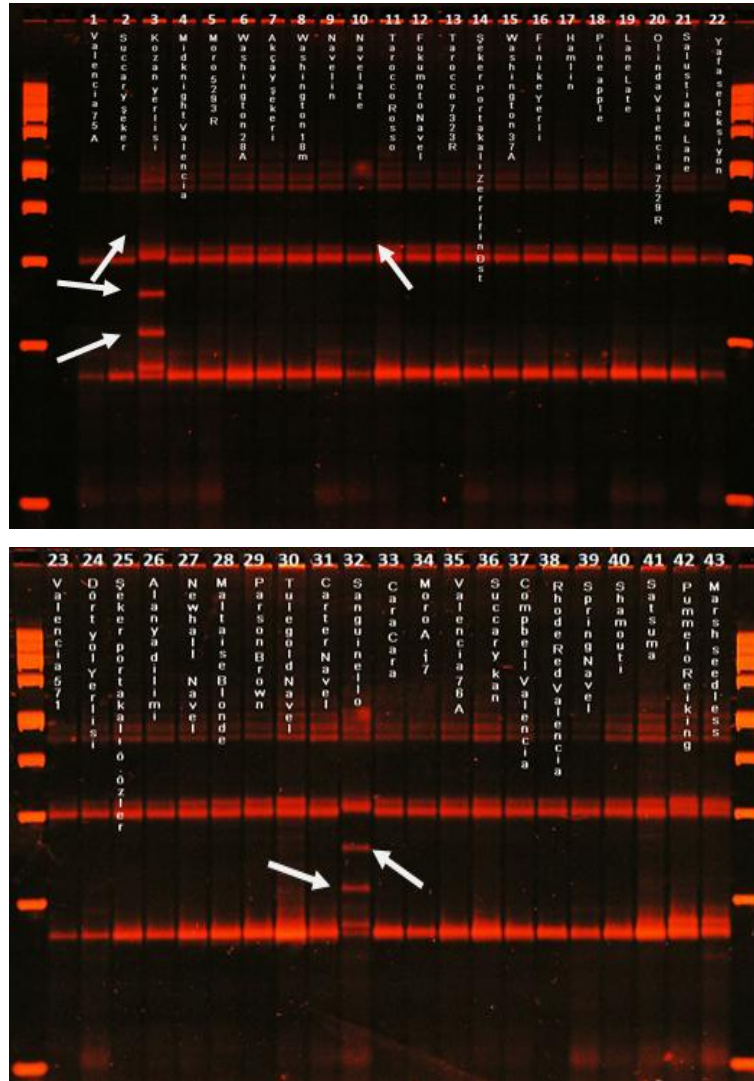
Primer #11: Elde edilen toplam bant sayısı 5 adettir. Toplam 2 tane polimorfik bant bulunmuştur. Her genotip için en az dört, en fazla beş adet bant elde edilmiştir ve primerin polimorfizm oranı %40 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar, Dört Yol yerlisi 17-2, Olinda Valencia, Salustina, Yafa 46/A, Valencia 571 ve Pummelo Reinking genotiplerinden elde edilmiştir.

Primer #16: Elde edilen toplam bant sayısı 5 adettir. Toplam 2 bant polimorfik olarak belirlenmiştir. Her genotip için en az üç, en çok dört adet bant elde edilmiş ve primerin polimorfizm oranı %40 olarak hesaplanmıştır. GMA jeli üzerinde elde edilen polimorfizm bantlar Kozan yerlisi ve Sanguinello B 2/10 genotiplerinde bulunmuştur. Bu primere ait jel görüntüleri Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3. On altı numaralı primere ait jel görüntüsü

Primer #17: Elde edilen toplam bant sayısı 7 adettir. Toplam 3 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az 3, en fazla 7 adet bant elde edilmiş ve primerin polimorfizm oranı %42.8 olarak hesaplanmıştır. GMA jeli üzerinde elde edilen polimorfik bantlar, Kozan yerlisi, Pummelo Reinking, Satsuma S2-29, Sanguinello B 2/10 ve Marsh seedles genotiplerinde saptanmıştır. Bu primere ait jel görüntüleri Şekil 4.4 de görülmektedir.



Şekil 4.4. On yedi numaralı primere ait jel görüntüsü

Primer #18: Elde edilen toplam bant sayısı 4 adettir, ancak polimorfik bant elde edilmemiştir. Tüm genotipler için monomorfik olarak değerlendirilmiştir.

Primer #19: Elde edilen toplam bant sayısı 4 adettir. Toplam 2 polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az üç, en çok dört adet bant elde edilmiştir ve primerin polimorfizm oranı %50 olarak hesaplanmıştır. GMA jeli üzerinde elde edilen polimorfizm bantlar, Parson Brown, Rhode Red Valencia, Spring Navel, Valencia 571, Kozan yerlisi, Pummelo Reinking, Satsuma S2-29, Sanguinello B 2/10 ve Marsh seedless genotiplerine ait lokuslarda bulunmuştur.

Amplifikasyonu sağlanmayan yada kaliteli bantlar vermeyen primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Tez kapsamında kullanılan ve amplifikasyon sağlayan

her primer çifti için toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranı Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.

Primer No	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm % oranı
1	5	2	40
2	9	6	66.66
3	7	5	71.42
4	4	1	25
5	6	-	-
7	3	-	-
8	5	2	40
9	6	5	83.33
10	5	4	80
11	5	2	40
16	5	2	40
17	7	3	42.8
18	4	-	-
19	4	2	50
Toplam	75	34	-
Ortalama	5.35	2.42	45.33

GMA jel üzerinde tespit edilen görüntüler bant varlığı/yokluğu durumlarına göre “1” veya “0” şeklinde değerlendirilmiştir. Bu veriler kullanılarak cluster analizleri yapılmış ve dendrogram oluşturulmuştur. Cluster analizleri DARWIN 5.0.158 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows) bilgisayar paket programı ile Neighbor-Joining metoduna göre yapılmıştır (Şekil 4.5).

4.2.1. SSCP Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi

SSCP analizleri sonucunda oluşturulan dendogram 1.1, 1.2 olmak üzere 2 ana kola ayrılmaktadır. Bir numaralı grupta yer alan, Tarocco, Lane Late ıvı A 198-1, Pine apple B3-19 18-10, Hamlin SRA 41, Finike yerli portakalı (Antalya), Washington (37A), Şeker portakalı (zerrifin Dst. İsrail), Tarocco (7323)R, Fukumoto Navel, Tarocco rosso, Carter Navel (9321)c, Navelina IV/A 7-5, Washington (18m), Akçay şeker (A-39), Washington 28A, Moro (5293R), Moro A17, Cara Cara, Compbell Valencia (7246R)N, Shamouti (5291T), Şeker portakalı (Ö.Özler-Tektaş), Alanya dilimi portakalı (Antalya), Newhall Navel (7322T), Maltaise blonde SRA 239, Succary (Kan) B3/12 154 genotipleri arasında her hangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Fakat, morfolojik olarak normal portakallar grubunda yer alan Midnight Valencia ve Valencia (76A) çeşitleri, beklendiği gibi yaklaşık 0.0125'lik bir oranla, bu altgrupta yer alan diğer çeşitlerden daha farklı ve birbirine daha yakın bulunmuşlardır. İki numaralı grup kendi içerisinde 2.1 ve 2.2 olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılmıştır. 2.1 no'lu alt grupta yer alan ve portakallara ait fenotipe dayalı karakterizasyon çalışmaları sonucunda, sırayla şeker portakalı, normal portakallar ve göbekli portakallar grubunda yer alan Succary (Şeker) B3/12 15-6, Valencia 75A ve Navelate IVI/A 7-5 genotipleri diğer gruplardan 0.025 oranla farklı bulunmuştur. 2.2 no'lu grup 2.2.1 ve 2.2.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. 2.2.1 alt grubunda yer alan Salustiana, Olinda Valencia (7229R), Yafa seleksiyon 46/A ve Dört Yol yerlisi (17-2) genotipleri 0.025 oranlık farkla diğer alt gruptan ayrılmıştır. 2.2.2 no'lu grup 2.2.2.1 ve 2.2.2.2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. 2.2.2.1 no'lu alt grubunda, morfolojik sınıflandırmada normal portakallar sınıfında yer alan tek bir çeşit, yabancı bir genotip olarak Parson Brown bulunmaktadır. Bu grup diğer alt gruplardan 0.027 oranlık farkla ayrılmıştır. 2.2.2.2 no'lu grup ise A1 ve A2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. A1 ve A2 alt grupları her biri tekrar sırayla A1.1, A1.2 ve A2.1, A2.2 olmak üzere 4 kola ayrılmıştır.

A.1.1 no'lu alt grubunda ve normal portakallar sınıfında yer alan Rhode Red Valencia SRA 360 yaklaşık 0.075 oranla yan gruplardan ayrılmıştır. A1.2 no'lu alt grupta yer alan ve göbekli portakallar sınıfında karakterize edilen Spring Navel

çeşidi 0.01 oranında farkla ayrılmıştır. A2.1 no'lu alt grupta ise normal portakal olarak tanımlanan Valencia (571) 0.088 oranla diğer alt gruplardan ayrılmıştır. A2.2 no'lu grup, A.2.2.1 ve A2.2.2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. A2.2.1 no'lu grup A2.2.1.1 ve A2.2.1.2 olmak üzere ve A2.2.2 no'lu grup ise A2.2.2.1 ve A2.2.2.2 olmak üzere yan kollara ayrılmıştır. Bu alt gruplarda bulunan tüm çeşitler 0.1'in üzerinde bir oranla diğer tüm çeşitlerden farklılık göstermiştir.

Çalışmada Mandarin grubunu temsil eden Satsuma (S2-29) çeşidi A2.2.1.1 no'lu alt grupta yer almıştır, aynı zamanda ve beklendiği gibi A2.2.1.2 no'lu alt grubunda yer alan ve Pumelo (Şadok) grubunu temsil eden pummelo-Reinking genotipiyle yakın bulunmuştur. A2.2.2.1 no'lu grupta altıntop grubunu temsil eden Marsh seedless (N-36) yer almaktadır. A2.2.2.2 no'lu grup B1 ve B2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. B1 no'lu alt grubunda portakallar arasında normal portakal olarak tanımlanan Kozan yerlisi 17-10 çeşidi bulunmaktadır. B2 no'lu alt grubunda ise portakallar arasında kan portakalı olarak tanınan Sanguinello B 2/10 16-7 çeşidi yer almaktadır.

Bu çalışmada 0.1 oranla Sanguinello B 2/10 16-7 ve Kozan yerlisi 17-10 genotipleri birbirinden en az farklı portakal çeşitleri olarak diğer portakal çeşitlerinden ayrılmıştır. Aynı zamanda çalışmada portakal çeşitlerinin yanı sıra genetik farklılıklarını araştırdığımız altıntop, mandarin ve şadok çeşitleri en az farklı çeşitler olarak tanımlanmıştır.

Citrus sinensis en yaygın turunçgil türü olarak bilinmektedir. Portakal türü, fenotipik özelliklerine göre, giriş kısmında anlatıldığı gibi 4 ana gruba ayrılmaktadır. Bu ana gruplar arasında morfolojik olarak farklılık bulunmasına rağmen yapılan birçok çalışmada bu farklılık tespit edilememiştir. Tez kapsamında kullanılan 14 SSCP primerinin analizleri sonucunda portakal grubuna ait araştırılan bazı genotiplerin arasında her hangi bir farklılık bulunmamıştır ve daha önceki birçok moleküler markır çalışmalarında elde edilen sonuçlar bunu desteklemektedir. Fakat tez kapsamında araştırılan genotipler arasında Kozan yerlisi ve Sanguinelli çeşitleri yüksek bir oranla diğer portakal çeşitlerinden farklı bulunmuş ve aynı zamanda pummelo, mandarin ve altıntop gruplarını temsil eden çeşitlere göre en az farklı grup olarak bulunmuştur. Herrero ve ark (1996), izoenzim analizleri ile 58 portakal çeşidi

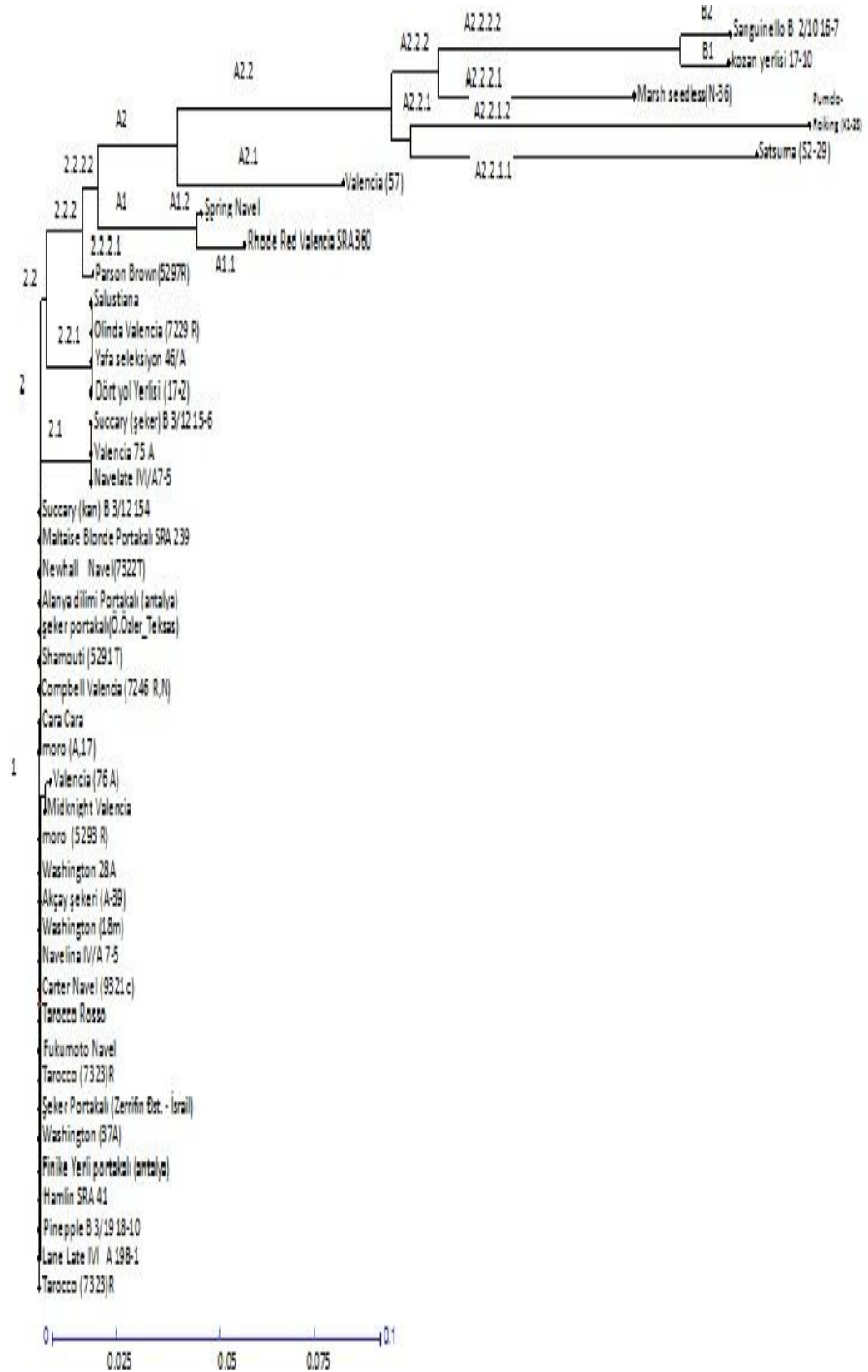
arasındaki genetiksel farklılığı belirlemek için yaptıkları çalışmada portakal çeşitleri arasında genetik farklılığın olmadığını tespit etmişlerdir. Luisa ve ark (1998), portakal çeşitleri arasında genetik farklılığı belirlemek amacıyla RAPD analizleri gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre fenotipik farklılık göstermeyen çeşitler arasında genetik olarak farklılık bulunmamıştır. Novelli ve ark (1998), mikrosatellit primeri kullanılarak yaptıkları analizlerde portakal çeşitleri arasındaki polimorfizmi belirlemeye çalışmışlar, fakat polimorfizm tespit edememişlerdir. Luro ve ark (1995), portakalların genetik olarak bir 'biotip' olduğunu, istenilen klonların seleksiyon ve somatik mutasyon sonucu ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Green ve ark (1986), *Citrus sinensis*'in doğal hibrit olduğu fakat baskın olarak mandarin özelliği gösterdiğini belirtmişlerdir. Diğer yandan portakalın %50 mandarin ve % 50 pummelo özelliği taşıdığını yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Barkley ve ark, 2006; Nicolosi ve ark, 2000). Fang ve ark (2009), yaptıkları bir çalışmada, 10 tane AFLP primeri kullanarak portakal genotipleri arasında sadece %11.8 oranda polimorfizm bulmuşlar ve tekrar portakal grubunun mutasyona dayalı bir origini olduğunu vurgulamışlar. Şadok, mandarin ve ağaç kavunu üç gerçek tür olarak belirtilmiş, laym, turunç, limon, altıntop ve portakalın ise bu türler arasında oluşan melezlemelerden meydana geldiği ortaya konulmuştur (Barret ve Rhodes, 1976).

Mandarin ve şadok arasındaki melezlemelerden turunç ve portakalın ortaya çıktığı ve bunlar arasındaki farklılıkların nedeni olarak genomlarında bulunan mandarin temelli genlerin oranlarının farklı olması gösterilmiştir. Tez kapsamında kullandığımız şadok ve mandarin genotipleri ile portakal grupları arasında benzer bant profilleri tespit edilmiştir.

Ağar (2007), yapmış olduğu çalışmada, SSR analizlerine dayalı Navelina portakal genotipleri arasındaki genetik çeşitliliği ssr markırları kullanarak araştırmıştır. Çalışma sonucunda Navelina genotipleri arasında genetik farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışma sonucunda elde edilen dendrogram incelendiğinde, Navelate IV/A7-5 genotipi Succary ve Valencia 75A genotipleriyle aynı kolda kümelenmiştir. Ayrıca, Ağar (2007)'nin yaptığı çalışma kapsamında bulunan sonuçlara göre, mandarin grubunu temsil eden Satsuma genotipine en yakın olan portakal çeşitleri Sanguinello ve Kozan yerlisi olmuştur.

Aynı çalışmada mandarin çeşitleri arasında yüksek bir oranla farklılık tesbit edilmiştir. Uzun (2009), doktora tez çalışmasında, SRAP markırları kullanarak portakal genotipleri arasında genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Çalışma sonucunda genotipler arasında az farklılık tespit etmişlerdir. Bunun nedeni portakal grubunda yer alan bireylerin pek çoğunun hibrit orijinli olmayıp mutasyon orijinli olmasıdır. Zhang ve ark (2005), 13 ISSR markırı kullanarak 22 tane portakal çeşidinden 11 tanesini tanımlamışlar ve polimorfizm oranını %6.9 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada Olinda, Delta ve Midnight aynı kümede yer almışlar. Yapmış olduğumuz çalışma, bu sonuçları doğrulamaktadır, fakat normal portakal grubunda yer alan Salustiana, Yafa seleksiyon 46/A ve Dört Yol yerlisi aynı alt grubunda yer almaktadırlar ve Midnight Valencia ve Valencia 76/A çok az bir oranla diğerlerinden farklı bulunmuşlardır.

Yapılan çalışmaların bulgularına dayanarak ve elde edilen sonuçların durumuna göre, portakal çeşitlerinin oluşmasında genel olarak doğal mutasyonların çok etkin olduğu ve dolayısıyla genetik yapısı fazla değişmeden farklı morfolojik ve pomolojik yapıda yeni çeşitlerin meydana geldiği söylenebilir. Roose (1988), portakal, turunc, altıntop gibi türler içerisinde yer alan mutasyon orijinli çeşitlerin izoenzim markırlarıyla ayırt edilemediğini bildirmiştir. Buna karşın melez orijinli olan çeşitlerde daha geniş bir izoenzim varyasyonu olduğunu ve bu tarz çalışmalarla ayırt edilebildiklerini belirtmiştir. Luro ve ark (1995), minisatellit markırları ile yaptıkları çalışmada, 10 adet portakal çeşidi arasında genetik farklılık tespit edememişlerdir. Fang ve Roose (1997), turuncgillerde mutasyonların fenotipik farklılıklarını ortaya koymasına karşın genom üzerinde çok küçük bir bölgede meydana geldiğini hatta bazen bir tek nükleotide dayanarak oluştuğunu, bu yüzden RFLP çalışmaları ile mutasyonların belirlenmesinin zor olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar portakallar içerisinde düşük düzeyde bir polimorfizm elde etmişler ve çoğu portakal çeşidinin kökeninin tek bir ata olduğunu, çeşitlerin mutasyon yoluyla meydana geldiğini savunmuşlardır.



Şekil 4.5 Genotiplere ait SSCP analizleri sonucunda elde edilen dendrogram.

Luro ve ark (2000), SSR markırları ile yaptıkları çalışmada, portakallar içerisinde varyasyonların bir atadan meydana gelen mutasyonlarla oluştuğunu ve genetik olarak birbirlerinden ayırt edilemediklerini belirtmişlerdir. Oliveira ve Radmann (2005), izoenzim markırları ile yaptıkları çalışmada, Lanelate, Navelate, Navelina ve Salustiana portakal çeşitlerinin benzerlik düzeyini 1.00 olarak tespit etmişlerdir, Ancak Salustiana çeşidi bizim elde ettiğimiz dendogram sonuçlarına göre, Olinda Valencia, Yafa seleksiyon ve Dört Yol yerlisi genotipleriyle en az farklılık göstermiştir. Novelli ve ark (2000), aralarında fenotipik farklılıklar olsa bile portakal çeşitlerini RFLP, RAPD ve mikrosatellit markırları ile ayırt etmenin çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Novelli ve ark (2006), 41 portakal çeşidinde mikrosatellit markırları ile yaptıkları çalışmada genetik benzerlik düzeyini 0.96 ile 1.00 arasında saptamışlar ve çoğu portakal çeşitleri arasında bu değeri 1.00 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar, portakal çeşitleri arasındaki morfolojik farklılıkların mutasyon orijinli olduğunu ve portakalların genetik olarak dar bir yapıya sahip olduğunu belirtmişlerdir. Orford ve ark. (1995), minisatellit markırları ile portakallar arasında genetik farklılık tespit edememiş ve portakalların moleküler markırlarla karakterizasyonun zorluğunu vurgulamışlardır. Qing-Qin ve ark (2007), SSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda kullandıkları 19 portakal çeşidi arasında bir farklılık tespit edememişler ve bu çeşitlerin mutasyonla meydana geldiğini bildirmişlerdir. El Mouei ve ark (2011), yaptıkları çalışmada portakal grubunun dar bir genoma sahip olduğunu ve genotipler arasında farklılığın kısıtlı olduğunu bir daha vurgulamışlardır. Jannati ve ark (2009), 15 SSR markırı ile hibrit ya da doğal mutasyonları belirledikleri çalışmada, Pineapple ve Washington Navel çeşitlerini doğal tipler olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada adı geçen genotipler arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

Portakal grubunda polimorfizm oranının çalışılan diğer tür ve gruplara göre daha düşük olmasının nedeni, portakalların genel olarak mutasyon orijinli olmaları, dolayısıyla genetik olarak birbirlerine çok yakın olmalarıdır (Barkley ve ark. 2006).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmada morfolojik olarak sınıflandırılan ve karakterize edilen farklı portakal gruplarını temsil eden 40 genotip ve bunlara ek olarak pummelo (şadok), mandarin, grapefruit (altıntop), gruplarını sırasıyla temsil eden, Pummelo- Reiking (K1-35) (*C.maxima Reiking*), Satsuma (S2-29) (*C.Unshiu*), Marsh seedless (N-36) (*C.paradis*) genotiplerinin arasındaki genetik farklılık, 19 çift SSCP primeri ile araştırılmıştır. No6 , No12, No13, No14, No 15, primerlerin amplifikasyonu sağlanmamıştır. Amplifikasyon elde edilen primerlerle yapılan analizlerden elde edilen dendrogram tartışılmıştır.

Araştırmaya uygun görülen çeşitler arasındaki genetik ilişkiler tartışılmıştır. Elde edilen sonuçların bazıları diğer çalışmalar ile uyumlu bulunurken bazı bulgular daha önce yapılan taksonomik sınıflandırmalardan farklı bulunmuştur.

Bir çoğu taksonomik çalışma sonucunda ve bu çalışmada olduğu gibi portakal çeşitleri arasında yüksek polimorfizm bulunmamıştır, fakat mandarin , altıntop ve şadok genotiplerine bakıldığında, portakal çeşitleri arasında en az farklılığı, birbirine yakın bulunan ve diğer portakallardan en farklı bulunan Kozan yerlisi ve Sanguinello çeşitleri ile göstermektedirler.

Daha yüksek bir polimorfizm oranı elde etmek için, daha önceden tespit edilen SNP bölgelerine dayanarak daha fazla SSCP primerleri dizayn edilip, PCR amplifikasyonları yapıldıktan sonra analiz yapılabilir.

Ayrıca ekonomik şartların sağlanması durumunda direkt genetik sekanslama yaparak, portakalların genomundaki nokta mutasyonları tespit ettikten sonra , aralarındaki farklılık daha yüksek bir polimorfizm oranı ile ortaya çıkarılabilir.

Çoğu portakallara ait sınıflandırma çalışmalarının sonuçları değerlendirdiğinde, ve bu çalışmada tartışma kısmında tartışıldığı gibi, bu türün doğal mutasyonlardan orijin aldığı ya da kendi başına bir biotip olduğu ortaya çıkmaktadır. Buna göre gelecek karakterizasyon çalışmaları ya da genomik farklılıkların ortaya çıkması için Tilling- Ecotilling gibi mutasyon tesbitinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin kullanılması önerilebilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında bu güne kadar kullanılmış SSCP primer çiftleri ile ilk kez materyel kısmında ismi geçen portakal ve ek olarak mandarin, şadok ve altıntop genotiplerinin genetik farklılıkları araştırılmış ve çeşitlere özgü spesifik bantlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- AĞAR, A., 2007. Aurantioideae Alt Familyasındaki Cinslerde Yer Alan Bazı Türlerin SSR markırlarıyla Moleküler Karakterizasyonu. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans Tezi, Adana, 104 s.
- AKA-KACAR, Y., 2001. Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No: 640, Adana, TÜRKİYE
- AKA-KAÇAR, Y., YEŞİLOĞLU, T., YILDIRIM, B., ŞİMŞEK, Ö., İNCESU, M., KAMILOĞLU, M., TUZCU, Ö., 2009. Bazı turuncğil anaçlarının SSR markırları ile moleküler tanımlanması. Alatarım, 8(2): 8-16.
- AKA-KAÇAR, Y., ŞİMŞEK, O. DÖNMEZ, D. BONCUK, M. YEŞİLOĞLU, T. OLLİTRALUT, P., 2012. Allelik Diversity Of Ferritin Iii And Pmt Iv Genes Related To Iron Chlorosis In Some Citrus Rootstocks, Xii International Citrus Congress Valencia/ Spain Book Of Abstract. PAGE:45
- ALBANESE, G., RENİS, M., RECUPERO, G.R., 1992. RFLP analysis of different lemon cultivars. Proc. Int. Soc. Citriculture, 208-209.
- ANONİM, 1975. *Citrus* Ciba Geigy Agrochemicals. Ciba-Geigy Kld. Basle,Switzerland. 88 p.
- AHMAD, R., STRUSS, D., SOUTHWICK, SM., (2004) Journal Of The American Society For Horticultural Science Volume: 128 Issue: 4 Pages: 584-590 Published: Jul 2003 Times Cited: 20
- BURRY, B, J., JASMİNE S. T. CHANG,T, T (2011). Citrus can help prevent vitamin A deficiency in developing countries. California Agriculture., Volume 65. Number 3.
- BARKLEY, N. A., ROOSE, M. L., KRUEGER, R. R., FEDERICI, C. T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm67 collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor. Appl.Genet. 112: 1519-1531.

- BAIG, M.N.R., GREWAL, S., DHILLON, S, (2009). Molecular Characterization and genetic Diversity Analysis of Citrus Cultivars by RAPD markers. Turk J Agr'c For 33 (2009) 375-384, TÜBİTAK doi: 10.3906/tar-0804-27
- BÜYÜKÜNAL BAL, E.B., 2003. Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 6(2): 34-40
- CHEN, C., BOWMAN, K.D., CHOİ, Y.A., DANG, P.M., RAO, M.N., HUANG, S., SONEJİ, J.R., MCCOLLUM, T.G., GMİTTER, F.G., 2008. EST-SSR genetic maps for Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. Tree Genetics & Genomes, 4:1–10.
- CHUNXIAN, C., ZHOU, P., CHOİ SHU HUANG, Y, A., FRED G. GMİTTER JR., (2006). MİNİNG AND characterizing microsatellites from citrus ESTs, Theor Appl Genet (2006) 112: 1248 1257 DOI 10.1007/s00122-006-0226-1.
- CORAZZA-NUNES, M.C., MACHADO, M.A., NUNES, W.M.C.,CRISTOFANI, M., TARGON, M.L.P.N., 2002. Assessment of Genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*. 126:169-176.
- COLBERT, T., TILL, B., TOMPA, R., REYNOLDS, S., STEINE, M., YEUNG, A.,MCCALLUM, C., COMAI, L., HENIKOFF, S., 2001. High-Throughput Screening For Induced Point Mutations. Plant Physiology, Vol. 126, pp. 480-484.
- DENG, Z. N., GENTILE, A., NICOLASI, E., DOMINA, F., VARDI, A., and TRIBULATO, E., 1995. Identification of *in vivo* and Lemon Mutants by RAPD Markers. Journal of Horticultural Science. 70(1): 117-125.
- DENG, Z., HUANG, S., XIAO, S., GMİTTER, F.G. JR., 1997. Development and Characterization of SCAR Markers Linked to the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene from *Poncirus trifoliata*. *Gen.Nat.Res.Coun.Canada*. 1997. 40:697-704.
- ERGÜL, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmak izi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

- EL-MOUEİ, R., CHOUMANE, W., DWAY, F. Molecular Characterization and genetic Diversity in Genus *Citrus*. International Journal Of Agriculture And Biology. Volume: 13 Issue: 3 Pages: 351-356 Published: 1 (from Web Of Science).
- FEDERİCİ, C.T., FANG,D.Q., SCORA,R.W., ROOSE, M.L., 1998. Phylogenetic Relationships within the Genus *Citrus* (Rutaceae) and Related Genera as Revealed by RFLP and RAPD Analysis. Theor. App. Genet. 96:812-822.
- FANG, D,Q. ROOSE, M.L.,1997. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter simple sequence repeat markers.Theor.Appl.Genet.95,408-417
- FANG, J., WANG, C., YU, H., ZHENG, Y., Lİ, X., SONG, C., CHEN, J., 2009. Identification of 57 sweet orange cultivars using AFLP markers. J. Hort. Sci. Biotech. 84(6): 585-590
- FAO., 2012. Statisical database of agricultural production. <http://faostat.fao.org>
- GEPTS, P, 1990. Genetic Diversity of Seed Storage Proteins in Plants. Plant Population Genetics. Breeding, and Genetics Resources (A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir, eds.), Sinauer, Sunderland, Massachusetts p: 64-68.
- GÖKSEL, Ç., 1999. RAPD Markerleriyle Bazı Mandarin Çeşitlerinin Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- GLORİA A.MOORE (2001). Orange and Lemons: clues to the taxonomy of citrus from molecular markers., Vol.17 No.9
- GREEN, R.M., VARDI, A., and GALUN, E., 1986. The Plastome of *Citrus*.Physical Map, Variation Among *Citrus* Cultivars and Species and Comparison with Related. Genera. Theo Appl Genet. 72:170-177.
- GÜLŞEN, O and ROOSE, M.L, 2001. Lemons: Diversity and Relationships with 3Selected *Citrus* Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers.Amer. Soc. Hort. Sci. 126(3):309-317.
- HERRERO, R., ASINS, M.J., CARBONELL, E.A., NAVARRO, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. Theor. Appl. Genet. 92:599-609.

- HUNTER, R.L., MARKERT, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294–1295.
- HENÍKOFF S, COMAÍ L (2004). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 375-401.
- HOISINGTON, D., 1992. Laboratory protocols. CIMMTY Applied Molecular Genetics Lab. Mexico, D.F. CIMMITY.
- JANNATÍ, M., FOTOUHÍ, R., POURJAN ABAD., SALEHÍ, Z., 2009. Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. *Journal of Horticulture and Forestry* Vol. 1(7) pp. 120-125 Available online <http://www.academicjournals.org/jhf>
- KAFA, G., CANIHOŞ, E., 2010. Turunçgil Yetiştiriciliği, No: 54. Kocatürk Sel , S., 2004. Spinal Müsküler Atrofi Hastalarında Smn Geni Ekzon 7 ve 8'in Moleküler Analizi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Adana. Doktora Tezi. s: 12–13.
- KOCATÜRK SEL , S., 2005. Spinal Müsküler Atrofi Hastalarında Smn Geni Ekzon 7 ve 8'in Moleküler Analizi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Adana. Doktora Tezi. s: 12–13.
- KARAHOCAGİL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.
- KENCE, A., 2005. Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri (giriş)
- LAVI, U., CREGAN, P., SCCHAP, T., and MILLEL, J., 1994. Amplification and Breeding of Perennial Fruit Crops. In J. Janick (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol:397-401.
- LURO, F., LAIGRET, F., BOVE, J.M., OLLITRAULT, P., 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD.) to citrus genetics and taxonomy. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 225-228.
- LURO,F., GATTO,J., COSTANTİNO, G., PAİLLY, O., 2011. Analysis of genetic diversity in Citrus. *Plant genetic Resources: Characterization and Utilization* 9(2); 218-221 doi: 10/1017/S11479262111000189.

- LURO, F., RIST, D., OLLITRAULT, P., 2000. Sequence tagged microsatellites polymorphism. An alternative tool for cultivar identification and evaluation of genetic relationships in Citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture IX. Congr. 170-171.
- LURO, F., LAIGRENT, F., BOVE, J.M., OLLITRAULT, P. 1995., DNA Amplified Fingerprinting, a Useful Tool for Determination of Genetic Origin and Diversity Analysis in *Citrus*. HortScience 30: 1063-1067.
- LUIA, M., NATIVIDADE – TARGON, P., MACHADO, M.A., FILHO, H. and CRISTOFANI, M., 1998. Genetic Polimorfizm of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Varieties Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA. First Int. *Citrus* Biotechnology Symposium, 29 November 3 December 1998.
- MARKERT, C.L. MOLLER, F., 1959. Multiple Forms of Enzymes; Tissues, Ontogenetic and Species Specific Patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45:753–763.
- MALIK, S.K. RUHINI, M.R., KUMAR, S., CHOUDHARY, R., PAL, D., CHADHURY, R., 2012. Assessment of Genetic Diversity in Sweet Orange [*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck] Cultivars of India Using Morphological and RAPD Markers. Agric Res (October-December 2012. 1(4):317 324.Doi 10.1007/s40003-012-045-3.
- MOHAMMADI, S.A., PRASANNA., B.M. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. Crop Sci. 43:1235–1248.
- MOORE, G.A., 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. Trends in Genetics, 17(9): 536–540.
- MOTOHASHI, R., MATSUYAMA, T., AKIHAMA, T., OMURA, M., 1992. DNA fingerprinting in *Citrus* cultivars. Proc. Int. Soc. Citriculture, 221-224.
- Mohammadi, S.A., PRASANNA., B.M. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. Crop Sci. 43:1235–1248.

- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R., 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome.*, 38:715-723.
- NİCOLOSÌ, E., DENG, Z. N., GENTILE, A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., TRİBULATO, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species az investigated by molecular markers. *Theor .Appl. Genet.*, 100: 1155-1166.
- NOVELLİ, V.M., CRİSTOFANİ, M., AND MACHADO, M.A., 2000. Evaluation of Microsatellite Markers in Cultivars of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Proceedings of First International Symposium on Citrus Biotechnology*, 47-50.
- NOVELLI, V .M., TAKITA, M. A., MACHADO, M. A., 2004. İdentification and analysis of single nucleotide polymorphism (SNPs) in Citrus. *Euphitica*, 138:277-237.
- NOVELLI, V.M., CRISTOFANI, M., SOUZA, A.A., MACHADO, M.A., 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers fort he sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genet. Mol. Bio.*, 29(1): 90-96.
- ORFORD, SJ., STEELE SCOTT N and TİMMİS JN (1995). A hypervariablemiddle repetitive DNA sequence from citrus. *Theoreticaland Applied Genetics* 91:1248-52.
- OLIVEIRA, R. P., RADMANN, E. B., 2005. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. *Bras. Frutic.* V:2, N:2, 332-334.
- ÖNER C., 2002. Genetik kavramlar. 6. baskı. Ankara Palme Yayıncılık, s: 517,744,746
- ÖZCAN, S., GUREL, E., BABAOĞLU, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, ISBN: 975-6652-05-5.
- PARAN, I., MİCHELMORE, R.W., 1993. Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.

- QING-QIN, C., HAI-JUN, M., XIAO-PENG, W., HUA-LIN, Y., XIU-XIN, D.,
2007. Genetic diversity of male sterile and low fertility germplasm of Citrus
revealed using SSR markers. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology
4: 99–104.
- STAUB, J.E., KUHNS, J.J., MAY, B., GRUN, P., 1982. Stability of Potato Tuber
Isozymes Under Different Storage Regimes. J. Amer. Soc. Hort. Sci.
107:405-408.
- SOLAK M, BAĞCI H, ŞENGİL AZ, ÖZTAŞ, S., 2000. Moleküler genetik ve
rekombinant DNA teknolojisi. Afyon: Uyun Ajans, : 130-133, 135
- STAUB, J.E., SEQUEN, F.C., 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their
Application in Plant Breeding. Hort. Scien. 31(5): 729-741.
- STAUB, J.E., KUHNS, J.J., MAY, B., GRUN, P., 1982. Stability of Potato Tuber
Isozymes Under Different Storage Regimes. J. Amer. Soc. Hort. Sci.
107:405-408.
- SAITOU, N., NEI, M., 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method For
Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* (1987) 4 (4): 406-425.
- SCHLOTTERER, C., TAUTZ, D., 1993. Slippage Synthesis of Simple Sequence
DNA. Nucleic Acid Research., 20:211-215.
- ŞİMŞEK, Ö., 2009. Bazi Turunçgil Aanaçlarında Demir (fe) Klorozuna
Dayanıklılıktan Sorumlu Genlerin SSCP Markirlarıyla Allelik Çeşitliliğinin
Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji
Ana bilim dalı Yüksek lisans tezi.
- ŞİMŞEK, Ö., Y, KACAR., 2011. Discovery of mutations with TILLING and
ECOTILLING in plant genomes. Scientific Research and Essays Vol. 5 (24),
pp. 3799-3802, 18 December, 2010 Available online at
<http://www.academicjournals.org/SRE> ISSN 1992-2248 ©2010 Academic
Journals.

- TARGON, M.L.P.N., MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H.D., and CRISTOFANI, M., 2000. Genetic Polimorphsim of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Varieties Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA. Proceedings of First International Symposium Citrus Biotechnonology, 51-54.
- TURUNÇ, A., 2010. Klemantin Mandarininde (*Citrus clementina Blanco*) SSR Markörleri İle Genetik Haritalama. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana bilim dalı Yüksek lisans tezi.
- TİLL BJ, ZERR T, BOWERS E, GRENE EA, COMAİ L, HENİKOFF S (2006). Hightthroughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by ECOTILLING. Nucleic Acids Res., 34: 99.
- TULI A., 2001. Single Stranded Comformational Polymorphism. *Tanıda DNA Teknikleri* Adana- Türkiye, Eylül s:52-61.
- TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., YILDIRIM, B., 2001. Citrus 2001 Reports : Turkey. Florida Grower Annual Edition. Mid.
- TUZCU, Ö. 2002. Turunçgil Lisans Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (Yayınlanmamış).
- TAMAM, A., 2009. Bazı Avokado (*Persea Americana Mill.*) Çeşitlerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Ç.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Adana. Turunçgillerde Genetik Çeşitliliğin SRAP Markırları ile Karakterizasyonu Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe bitkiler Ana bilim dalı Doktora tezi.
- ROOSE, M.L., 1988. Isozymes and DNA restrictionfragment length Polymorphism in Citrus breeding and systematics, in: Goren, R. And Mendel, K. (eds) Proc. 6th Int. Citrus. Cong. Vol: 1, Balaban Publishers, Rehovot, Israel.
- RADMANN, E., and OLIVEIRA, R.P., 2005. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. Rev. Bras. Frutic. vol.27 no.2 Jaboticabal
- UZUN, A., 2009. Turunçgillerde Genetik Çeşitliliğin SRAP Markırları İle Karakterizasyonu. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 369 s.

- UNCUOĞLU, A., 2010. Moleküler Markerlar ve Haritalama (Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları). Erciyes Üniv.yay no 180.
- WALTON, M., 1993. Molecular Markers: Which ones to use? Seed World July 1993, p: 23-29
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFAELSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acid Res. 18(22): 6531-6535.
- YEŞİLOĞLU, T., 2002. Turunçgil Cins, Tür ve Akrabalarının RAPD Markırlarıyla Tanımlanması TARP-2010 no'lu TÜBİTAK Projesi Sonuç Raporu. (Yayınlanmamış).
- YILDIRIM, A., KANDEMİR, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, (Ed. Özcan,S., Gürel, E., Babaoğlu, M.) Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- ZHANG Y. G., HUANG X. D., YİNG T. J., 2005. Identifying Sweet Orange [Citrus sinensis (L.) Osbeck] Germplasm Accession with Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. Session Resources, Genetic and Breeding 177.
- <http://www.mycitrustree.com>
- <http://users.kymp.net/citruspages/home.html>
- <http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus>

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İranın kuzey batısında yer alan Doğu Azerbaycan ilin’de, Maku’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Maku’da tamamladı. 2004 yılında başladığı, Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla bitkileri bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi’nde Biyoteknoloji anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.