

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Berken ÇİMEN

**KLASİK VE BİYOTEKNOLOJİK ISLAH YÖNTEMLERİYLE
YENİ TURUNÇGİL ÇEŞİT VE ANAÇLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

ÖZ

DOKTORA TEZİ

KLASİK VE BİYOTEKNOLOJİK ISLAH YÖNTEMLERİYLE YENİ TURUNÇGİL ÇEŞİT VE ANAÇLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Berken ÇİMEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
II: Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2018, Sayfa: 249
Jüri : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Doç. Dr. Bilge YILMAZ
: Dr. Öğr. Üyesi Müge UYSAL KAMILOĞLU
: Prof. Dr. Sinan ETİ
: Prof. Dr. Serra HEPAKSOY

Bu çalışmada, ülkemiz turunçgil endüstrisinin ihtiyaçlarını karşılamaya yönelik kurgulanmış mutasyon ve melezleme çalışmaları klasik ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanımıyla yürütülerek turunçgil çeşit ve anaç popülasyonları oluşturulmuştur. Fiziksel mutajen olarak ^{60}Co gama ışınının kullanımıyla Hernandina ve Ortanique çeşitlerinden sırasıyla 363 ve 852 adet M_1V_3 aşamasında fidan elde edilmiş ve 1215 bireyden oluşan popülasyon araziye dikilmiştir. Ayrıca çalışmada Klemantin 22D mandarini, W.Murcott mandarini ve Moro kan portakalı çeşitlerinde kimyasal mutasyon uygulamaları yapılmış, çeşitlerin aşı gözleri ve sürgünleri farklı süre ve dozlarda kolhisin çözeltisi içerisinde bekletilerek tetraploid formları elde edilmiştir.

Öte yandan, ülkemizin gereksinim duyduğu kireçli topraklara adapte olabilen, tristeza virüs hastalığı ve *Phytophthora citrophthora* etmeninin neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına tolerant yeni turunçgil anaçları geliştirilmesine yönelik olarak hem klasik hem de somatik melezleme yöntemleri kullanılmıştır. *Citrus* ve *Poncirus* cinsleri içerisinde yer alan 10 genotip kullanılarak 6 melezleme kombinasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen 736 adet bitkiden 273 bitkinin melez olduğu morfolojik olarak ve moleküler markırlar aracılığıyla tespit edilmiştir. Ayrıca 3 kombinasyon oluşturularak yapılan somatik melezleme çalışmasında 4 bitki rejenere edilmiş, fakat bu bireylerin allotetraploid somatik melez olmadığı, flow sitometri cihazıyla yapılan ploidi analiziyle belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, anaç-çeşit geliştirme, mutasyon, ploidi, somatik melezleme

ABSTRACT

PhD THESIS

IMPROVING NEW CITRUS VARIETIES AND ROOTSTOCKS BY CLASSICAL AND BIOTECHNOLOGICAL BREEDING METHODS

Berken ÇİMEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURAL PLANTS

Supervisor : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
Supervisor II : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2018, Page: 249
Juri : Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Assoc. Prof. Dr. Bilge YILMAZ
: Assist. Prof. Dr. Müge UYSAL KAMILOĞLU
: Prof. Dr. Sinan ETİ
: Prof. Dr. Serra HEPAKSOY

In this study, mutation and hybridization studies were carried out by classical and biotechnological methods in order to meet the demands for citrus industry in our country. New variety and rootstock populations were developed by mutations and hybridizations. By using the ⁶⁰Co gamma ray as a physical mutagen, 363 and 852 M₁V₃ seedlings were obtained from Hernandina and Ortanique varieties, respectively and population consists of 1215 individuals were planted on the field. In addition, chemical mutation applications were carried out in Klemantin 22D mandarin, W.Murcott mandarin, Moro blood orange varieties and tetraploid forms of these genotypes were recovered by applying colchicine treatments at different concentration levels and treatment time to budwoods and shoots.

On the other hand, both traditional and somatic hybridization methods have been used in order to develop new citrus rootstocks tolerant or resistant to high calcareous soils, CTV and *Phytophthora citrophthora*. For this purpose, six hybridization combinations were carried out using 10 genotypes belonging in *Poncirus* and *Citrus* genera. As a result, 736 plants obtained by hybridizations and 273 of them were identified as rootstock hybrids by morphological and molecular markers. In addition, four plants were regenerated from somatic hybridizations in three combinations, but these plants were not determined as allotetraploid somatic hybrids by ploidy analysis by flow cytometry.

Keywords: Citrus, variety and rootstock improvement, mutation, ploidy, somatic hybridization

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller dünyada en çok üretilen meyve grubudur. Gerek dünyada gerekse ülkemizde hızlı bir üretim artışı görülmektedir. Dünyada gerçekleşen bu üretim artışı nedeniyle turunçgil pazarlarında çok büyük bir rekabet yaşanmaktadır. Türkiye hâlihazırda turunçgil ihracatının %90'dan fazlasını tüketici refleksi tam gelişmemiş olan Doğu Avrupa ülkeleri (özellikle Rusya, Ukrayna, Romanya, Polonya, ve Bulgaristan) ve Ortadoğu ülkelerine (Irak, Suudi Arabistan ve İran) yapmaktadır. Bu pazarların büyük bir kısmı önemli ölçüde stabil olmayan ve risk taşıyan pazarlardır. Nitekim son yıllarda meydana gelen politik gelişmeler nedeniyle pazarlamada önemli sıkıntılar yaşanmaktadır. Türkiye'nin daha zengin ve istikrarlı olan ve turunçgil ithalatının yaklaşık olarak yarısını gerçekleştiren Batı Avrupa pazarlarına yönelmesi gerekmektedir. Diğer taraftan Türkiye'de turunçgil çeşitlerinin yaklaşık olarak % 85'inin pek çok özelliği bakımından ideal anaç olarak görülen turunç anacı üzerine aşıli olması, fakat turuncun tedavisi olmayan Tristeza (göçüren) hastalığına duyarlı olması turunçgil endüstrisi için çok büyük bir risk oluşturmaktadır. Çünkü bu hastalık ülkemizde vardır, ancak hastalığı taşıyan böcek ırkı zayıf olduğu için pek yayılmamıştır. Bu hastalık nedeniyle değişik zamanlarda Brezilya, Arjantin, İspanya, İtalya ve İsrail'de milyonlarca turunçgil ağacı ölmüş ve bu ülkeler turunç anacı yerine başka anaçlara yönelmişlerdir. Yakın zamanda kuvvetli taşıyıcı böcek ırkının Portekiz, İspanya ve İtalya'ya girdiği bildirilmiştir. Buradan, ticari ilişkilerin ve ulaşım imkânlarının artması nedeniyle ülkemizin de içerisinde bulunduğu diğer Akdeniz ülkelerine gelmesi ve Tristeza hastalığının epidemi yapması kaçınılmazdır. Dünyada turunca alternatif anaç arayışları devam etmektedir. Ülkemizde de turunca alternatif olacak anaçlarda tristezaya dayanıklılık yanında, kireç oranının yüksekliği nedeniyle %90 kadarı alkali karakterde olan topraklarımızda ortaya çıkan demir klorozuna tolerans, yine ağır olan topraklarımızda daha yaygın olarak görülen kök boğazı çürüklüğü hastalığına tolerans veya dayanıklılık gibi zorunlu özellikler ortaya çıkmakta ve bu

nedenle ülkemiz turunçgil sektörünün devamlılığı için bu özelliklere sahip anaçların ıslah edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında dünya pazarlarında yer bulabilecek verimli, yüksek kaliteli, özellikle çekirdeksiz ve orta-geç dönemde olgunlaşan yeni mandarin çeşitlerinin geliştirilebilmesine yönelik akut gama ışını uygulamasıyla mutant mandarin popülasyonu oluşturulmuştur. Bununla birlikte ploidi ıslahı programında çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin ve portakal çeşitlerinin geliştirilebilmesine yönelik tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi hedef alınarak kimyasal mutagen uygulamaları yürütülmüştür.

Ayrıca bu çalışmada, ülkemiz ekolojik koşullarına uygun turunca alternatif yeni anaçların geliştirilmesine yönelik popülasyonların oluşturulması için klasik ve somatik melezleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yeni mandarin çeşitlerinin mutasyon ıslahı yoluyla geliştirilmesi amacıyla Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerine gama ışını uygulamaları yapılmıştır. Gama ışını uygulamaları sonucu Hernandina çeşidinden 363 adet, Ortanique çeşidinden 852 adet olmak üzere toplam 1251 adet fidan elde edilmiş ve araziye dikilerek mandarin mutant popülasyonu oluşturulmuştur. Tez çalışması süresi içerisinde araziye dikilen 363 adet Hernandina M_1V_3 bireyinden 89 tanesi, 852 adet Ortanique M_1V_3 bireyinden ise 68 tanesinin meyve verdiği gözlemlenmiştir. Bu bireylerde ilk yıl meyve örnekleri alınarak pomolojik analizler yapılmıştır.

Hernandina popülasyonunda değerlendirilen mutantlar içerisinde H1019, H1031, H1033 ve H1077 kodlu bireylerinin ortalama tohum sayıları sırasıyla 0.5, 0.17, 0.86 ve 0.75 adet olarak belirlenmiştir. Ortanique M_1V_3 popülasyonu içerisinde ilk yıl gözlemi yapılarak değerlendirilen bireyler içerisinde 2-88 ve 5-70 kodlu bireylerin ortalama tohum sayısı “0.60”, 1-24 ve 5.90 kodlu bireylerinin ortalama tohum sayısının “1” olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında ploidi ıslahı yoluyla çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin, portakal çeşit ve hibritlerinin geliştirilmesine yönelik tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi amacıyla W.Murcott, Klemantin 22-D, Moro kan

portakalı aşı gözü kalemlerine ve sürgünlerine farklı doz ve sürelerde kolhisin uygulamaları yapılmıştır. Aşı gözü kalemlerine yapılan kolhisin uygulaması sonucunda Klemantin 22D mandarinine ait bir adet tetraploid birey, çeşidin aşı gözü kaleminin 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir. Ayrıca Moro kan portakalına yapılan uygulamadan 3 adet, W.Murcott çeşidinde ise 1 adet mixoploid birey elde edilmiştir. Sürgünlere kolhisin uygulaması denemesinde ise 6 saat süreyle %0.8 dozunda kolhisin uygulanmasından Klemantin 22D mandarininden bir adet tetraploid (4x) bitki edilmiştir. Ayrıca Klemantin 22D mandarini sürgünlerine 6 saat süreyle %0.2 dozunda yapılan kolhisin uygulaması sonucunda iki adet mixoploid (2x+4x) bitki elde edilmiştir. W.Murcott mandarininden alınan yaprak örneklerinde bir adet tetraploid (4x) ve bir adet mixoploid (2x+4x) bitki belirlenmiştir. Moro kan portakalından alınan yaprak örneklerinde ise bir adet tetraploid (4x) ve bir adet mixoploid (2x+4x) bitki tespit edilmiştir.

Ayrıca çalışmada yeni turunçgil anaçlarının geliştirilmesi hedefleri doğrultusunda belirlenen genotipler kullanılarak 6 melezleme kombinasyonu oluşturulmuş ve bu kombinasyonlarda kontrollü melezlemeler yapılmıştır. Klasik melezleme çalışmalarından elde edilen bitkiler içerisinde zigotik kökenli bireylerin tespiti morfolojik ve moleküler olarak gerçekleştirilmiştir. Çin turuncu x Rubidoux kombinasyonundan 78 adet, Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 36 adet, Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 1 adet ve Sunki mandarini x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 65 adet bitkinin melez olduğu morfolojik olarak belirlenmiştir. Volkameriana x Swingle sitrumelo kombinasyonundan elde edilen toplam 196 bitkiden 19 bitkinin zigotik kökenli olduğu, morfolojik olarak (üç yapraklılık özelliği) tespit edilmiştir. Geriye kalan 177 bitkinin zigotik (melez) veya nuseller embriyodan geliştiğini belirlemek için 5 adet SSR primer çifti kullanılmış ve 74 adet melez bitki nuseller olanlardan başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Böylece

çalışmada ele alınan kombinasyonlarda gerçekleştirilen melezlemelerden toplam 736 bitkiden 273 adet melez bitki morfolojik ve moleküler olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında klasik melezlemelerle anaç popülasyonlarının oluşturulmasının yanında ayrıca protoplast füzyonu yoluyla Kleopatra mandarini + Rubidoux üç yapraklı, Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı ile somatik melezlemeler yapılmıştır. Somatik melezleme yöntemiyle anaç popülasyonlarının oluşturulması kapsamında seçilen kombinasyonlarda protoplast kaynağı olarak embriyogenik kallusları kullanılacak genotiplerden kallus elde etmek amacıyla ovül kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen kallus hatlarında yapılan gözlemler sonucunda embriyogenik kallus oluşumu incelenmiş, kültüre alınan Yerli mandarin ovüllerinden sadece M1 ortamında %8 oranında embriyogenik kallus geliştiği, Kleopatra mandarininde M3 ortamında %2 oranında ve Sunki mandarininde M1 ortamında %3 oranında embriyogenik kallus eldesi sağlanmıştır.

Çalışmada Füzyon jeneratörü yardımıyla elektrofüzyon yöntemi uygulanmış ve füzyon işleminden sonra protoplastlar kültüre alınmıştır. Mikro-kalluslardan embriyogenik kallusların gelişimi Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonlarında gözlemlenmiştir. Kleopatra mandarini + Rubidoux üç yapraklı kombinasyonundan ise hücre kolonileri ve mikro kalluslardan embriyogenik kallus gelişimi elde edilememiştir. Füzyondan yaklaşık 80 gün sonra ilk embriyo çimlenmesi gerçekleşmiştir. Protoplast füzyonu sonrası mikro-kallus ve somatik embriyolardan Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı kombinasyonundan 1 adet ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonundan 3 adet olmak üzere toplam 4 adet bitkicik rejenere edilmiştir. Ancak flow sitometri analizi sonuçlarına göre elde edilen bitkicikler diploid Sunki ve Yerli mandarinlerinin ovül kültürü yoluyla elde edilen embriyogenik kalluslarından izole edilen protoplast hücrelerinin füzyona uğramadan rejenerasyonu sonucu geliştiği, yani somatik melez olmadığı belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen bilimsel bilgisi ve çalışma disiplini ile bana ışık tutarak yön veren ve yol gösteren, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde göreve başladığımdan bu yana her zaman her konuda yanımda olan danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübeleriyle bana daima destek olan, bitki biyoteknolojisi laboratuvarının her türlü imkanını seferber eden ikinci danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Anlayış ve sabırla doktora çalışmamın takibini yaparak her daim bana yol gösteren ve yanımda olan Sayın Doç. Dr. Bilge YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Müge UYSAL KAMILOĞLU'na, tez jürisinde bulunma nezaketini gösteren saygıdeğer Hocalarım Prof. Dr. Sinan ETİ ve Prof. Dr. Serra HEPAKSOY'a, teşekkür ederim.

Tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı Doç. Dr. Meral İNCESU'ya, SSR analizlerinde büyük desteğini gördüğüm Öğr. Gör. Dr. Dicle DÖNMEZ'e, çalışmalarımın elde ettiğim bitkisel materyallerin bakımı, arazi ve laboratuvar çalışmalarında her daim desteklerini gördüğüm Sayın Zir.Yük.Müh. H. Hüseyin KAYA, İsrail BORAN ve Cengiz BORAN'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamda flow sitometri analizleri için gerekli tüm çalışma koşullarını sağlayan 'Niğde Ömer Halis Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Genetik Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na ve Prof. Dr. Sedat SERÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanlığı'na ve maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: FDK-2015-3290) içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli annem ve babam 'Ülkü ve Nejat ÇİMEN'e ve sabır ve anlayışla her daim yanımda olan sevgili eşim Burcu ÇİMEN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
2.1. Çeşit Islahı İle İlgili Yapılan Çalışmalar	11
2.1.1. Turunçgillerde Mutasyon Islahı ile Yapılan Çalışmalar	12
2.1.2. Turunçgillerde Ploidi Islahı ile Yapılan Çalışmalar	18
2.2. Anaç Islahı ile İlgili Yapılan Çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METOT	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Gama Işını Uygulamasında Kullanılan Mandarin Çeşitlerinin Özellikleri	42
3.1.1.1. Ortanique Tangor	42
3.1.1.2. Hernandina Mandarinini.....	42
3.1.2. Ploidi Islahında Kullanılan Mandarin Çeşitlerinin Özellikleri	43
3.1.2.1. Klemantin 22D Mandarinini	43
3.1.2.2. W. Murcott Mandarinini.....	43
3.1.3. Ploidi Islahında Kullanılan Portakal Çeşidinin Özellikleri.....	44
3.1.3.1. Moro Kan Portakalı.....	44
3.1.4. Klasik ve Somatik Anaç Melezlemelerinde Kullanılan Genotiplerin Özellikleri	45

3.1.4.1. Antalya Kleopatra Mandarin (Citrus reshni Tan.).....	45
3.1.4.2. Rubidoux üç yapraklı (Poncirus trifoliata Raf.)	46
3.1.4.3. Carrizo sitranjı (Poncirus trifoliata Raf. x Citrus sinensis Osb. var “Carrizo”)	47
3.1.4.4. Pomeroy üç yapraklı (Poncirus trifoliata Raf.).....	48
3.1.4.5. Yuzu [Citrus junos (Sieb. ex. Tan.)]	49
3.1.4.6. Volkameriana CRC1 (Citrus volkameriana V. Ten. Pasq) ...	49
3.1.4.7. Swingle sitrumelo (Sitrumelo 4475) (Citrus paradisi Macf. var. Duncan x Poncirus trifoliata (L.) Raf.).....	50
3.1.4.8. Çin turuncu (Citrus myrtifolia Rafinesque).....	51
3.1.4.9. Sunki mandarini (Citrus sunki (Hayata) hort. ex Tanaka)	52
3.1.4.10. Gou Tou Turuncu (Citrus aurantium L.)	53
3.1.4.11. Yerli üç yapraklı (Poncirus trifoliata Raf).....	53
3.1.4.12. Benecke üç yapraklı (Poncirus trifoliata var. Benecke)	54
3.1.4.13. Yerli mandarin (Citrus deliciosa Ten.)	54
3.2. Metot	54
3.2.1. Gama Işını Uygulaması ile Mandarin Çeşitlerinde Popülasyonların Oluşturulması.....	54
3.2.1.1. Mutasyon İslahı Yoluyla Elde Edilen Bireylerde Pomolojik Analizler	56
3.2.1.1.(1). Ölçümle Belirlenen Pomolojik Özellikler.....	57
3.2.1.1.(2). Gözlemle Belirlenen Pomolojik Özellikler	58
3.2.2. Kolhisin Uygulaması Yoluyla Tetraploid Ebeveynlerin Elde Edilmesi	59
3.2.2.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulaması.....	60
3.2.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulaması	61
3.2.2.3. Kolhisin Uygulamaları Sonucu Canlılık Oranının Belirlenmesi (%).....	64
3.2.2.4. Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi	64

3.2.2.5. Kolhisin Uygulamaları Sonucu Tetraploid Bitki Oranının Belirlenmesi (%).....	66
3.2.2.6. Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler	66
3.2.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	67
3.2.3. Klasik Melezlemeler ile Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması	67
3.2.3.1. SSR Yöntemiyle Melez Bitkilerin Tespiti.....	71
3.2.3.1.(1). DNA izolasyonu.....	71
3.2.3.1.(2). DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	74
3.2.3.1.(3). SSR Analizleri PCR koşulları	74
3.2.3.1.(4). Li-Cor için Poliakrilamide Jel Hazırlığı ve Elektroforez Koşulları	76
3.2.3.1.(5). SSR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	77
3.2.4. Somatik Melezleme Yöntemiyle Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması.....	78
3.2.4.1. Ovül Kültürü Çalışmaları.....	78
3.2.4.2. Embriyogenik Kalluslardan Protoplast İzolasyonu	82
3.2.4.3. Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu	85
3.2.4.4. Protoplastların Saflaştırılması ve Sayımı	87
3.2.4.5. Protoplast Füzyonu.....	89
3.2.4.6. Heterokaryonların Kültürü ve Rejenerasyon Çalışmaları	91
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	93
4.1. Gama Işını Uygulaması ile Mandarin Çeşitlerinde Popülasyonların Oluşturulması	93
4.1.1. Hernandina mutant popülasyonunda pomolojik analizler	96
4.1.1.1. Meyve Ağırlığı (g)	98
4.1.1.2. Meyve Yüksekliği (mm)	99
4.1.1.3. Meyve Çapı (mm)	100
4.1.1.4. Meyve Şekil İndeksi (çap/yükseklik).....	100
4.1.1.5. Kabuk Kalınlığı (mm)	101

4.1.1.6. Dilim Sayısı (adet/meyve).....	102
4.1.1.7. Tohum Sayısı (adet/meyve)	103
4.1.1.8. Orta Eksen Çapı (mm).....	106
4.1.1.9. Usare Miktarı (%).....	107
4.1.1.10. Suda Çözünebilir Kuru Madde (SÇKM) Miktarı (%).....	108
4.1.1.11. Titre Edilebilir Asit Miktarı (%)	108
4.1.1.12. SÇKM / Asit Oranı.....	109
4.1.1.13. Meyve Dış Görünüşü	110
4.1.1.14.Meyve Şekli	111
4.1.1.15.Meyve Kabuk Yapısı.....	111
4.1.1.16. Meyve Kabuk Rengi.....	112
4.1.1.17. Meyve Et Rengi.....	113
4.1.1.18. Meyve Suyu Rengi	113
4.1.1.19. Meyve Et Tekstürü	114
4.1.1.20.Kabuğun Ete Bağlılığı.....	115
4.1.2. Ortanique Mutant Popülasyonunda Pomolojik Analizler	116
4.1.2.1. Meyve Ağırlığı (g)	117
4.1.2.2. Meyve Yüksekliği (mm)	118
4.1.2.3. Meyve Çapı (mm)	119
4.1.2.4. Meyve Şekil İndeksi (çap/yükseklik).....	120
4.1.2.5. Kabuk Kalınlığı (mm)	121
4.1.2.6. Dilim Sayısı (adet)	121
4.1.2.7. Tohum Sayısı (adet)	122
4.1.2.8. Usare Miktarı (%).....	125
4.1.2.9. Suda Çözünebilir Kuru Madde (SÇKM) Miktarı (%).....	125
4.1.2.10. Titre Edilebilir Asit Miktarı (%)	126
4.1.2.11. SÇKM/Asit Oranı.....	127
4.1.2.12. Meyve Dış Görünüşü	128
4.1.2.13.Meyve Şekli	129

4.1.2.14. Meyve Kabuk Yapısı.....	129
4.1.2.15. Meyve Kabuk Rengi.....	130
4.1.2.16. Meyve Et Rengi.....	131
4.1.2.17. Meyve Suyu Rengi.....	131
4.1.2.18. Meyve Et Tekstürü.....	132
4.1.2.19. Kabuğun Ete Bağlılığı.....	132
4.2. Kolhisin Uygulaması Yoluyla Tetraploid Ebeveynlerin Elde Edilmesi ...	134
4.2.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulaması.....	134
4.2.1.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında % Canlılık Oranı.....	134
4.2.1.2. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi.....	137
4.2.1.3. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler.....	140
4.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulaması.....	144
4.2.2.1. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında % Canlılık Oranı	144
4.2.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi.....	148
4.2.2.3. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler	152
4.3. Klasik Melezlemeler ile Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması	157
4.3.1. Melezlemelerde Kullanılan Baba Ebeveynlerde <i>in vitro</i> Çiçek Tozu Canlılık Düzeyleri.....	158
4.3.2. Klasik Melezleme Çalışmaları.....	160
4.3.3. Zigotik ve Nuseller Kökenli Bitkilerin Morfolojik Olarak Belirlenmesi	164
4.3.4. Zigotik ve Nuseller Kökenli Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi	168
4.4. Somatik Melezleme Yöntemiyle Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması	173

4.4.1. Ovül Kültürü Çalışmasına Ait Bulgular	174
4.4.2. Protoplast İzolasyonu.....	180
4.4.2.1. Embriyogenik Kalluslardan Protoplast İzolasyonu.....	180
4.4.2.2. Yapraklardan Protoplast İzolasyonu	182
4.4.3. Protoplast Füzyonu	184
4.4.4. Heterokaryonların Rejenerasyonu	185
4.4.5. Füzyon Ürünlerinde Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi.....	188
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	193
KAYNAKLAR	201
ÖZGEÇMİŞ	225
EKLER	226

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. FAO-Uluslararası Atomik enerji kurumu “Mutant Çeşit Veritabanı”na kayıtlı turunçgil çeşitleri.....	14
Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan genotipler	41
Çizelge 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen klasik melezleme kombinasyonları	67
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler	75
Çizelge 3.4. PCR reaksiyonlarının bileşenleri	75
Çizelge 3.5. PCR döngü koşulları	76
Çizelge 3.6. Somatik melezleme kombinasyonları.....	78
Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan, MS ortamı makro ve mikro elementleri ve miktarları ve MT vitamin içeriği.....	80
Çizelge 3.8. Ovül kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamları	80
Çizelge 3.9. Embriyogenik kalluslardan protoplast izolasyonunda kullanılan enzim-BH3 kültür ortamı kombinasyonlarıyla oluşturulan izolasyon koşulları	83
Çizelge 3.10. Turunçgil protoplast kültür ortamı.....	84
Çizelge 3.11. Yaprak protoplastlarının izolasyonunda kullanılan enzim-BH3 kültür ortamı kombinasyonlarıyla oluşturulan izolasyon koşulları	86
Çizelge 4.1. Gama ışını uygulaması sonrası aşılana ve tutan göz sayıları.....	93
Çizelge 4.2. M ₁ V ₃ popülasyonunu oluşturan fidan sayısı.....	95
Çizelge 4.3. Hernandina mutant popülasyonunda incelenen özelliklere ait maksimum, minimum, ortalama değerler ile standart hatalar	97
Çizelge 4.4. Ortanique mutant popülasyonunda incelenen değişkenlere ait maksimum, minimum, ortalama değerler ile standart hatalar	117
Çizelge 4.5. Kolhisin uygulaması sonucu W.Murcott mandarini canlılık oranı	135

Çizelge 4.6. Kolhisin uygulaması sonucu Klemantin 22D mandarini canlılık oranı	136
Çizelge 4.7. Kolhisin uygulaması sonucu Moro kan portakalı canlılık oranı.....	136
Çizelge 4.8. Diploid ve tetraploid kromozom sayısına sahip Klemantin 22D mandarininde yaprak stoma özellikleri.....	142
Çizelge 4.9. Diploid ve mixoploid kromozom sayısına sahip W.Murcott mandarininde yaprak stoma özellikleri.....	142
Çizelge 4.10. Diploid ve mixoploid kromozom sayısına sahip Moro kan portakalında yaprak stoma özellikleri.....	143
Çizelge 4.11. Kolhisin uygulaması sonucu W.Murcott mandarini canlılık oranı	145
Çizelge 4.12. Kolhisin uygulaması sonucu Klemantin 22D mandarini canlılık oranı	146
Çizelge 4.13. Kolhisin uygulaması sonucu Moro kan portakalı canlılık oranı.....	147
Çizelge 4.14. Diploid ve tetraploid kromozom sayısına sahip Klemantin 22D mandarininde yaprak stoma özellikleri	154
Çizelge 4.15. Diploid ve mixoploid kromozom sayısına sahip W.Murcott mandarininde yaprak stoma özellikleri.....	155
Çizelge 4.16. Diploid ve mixoploid kromozom sayısına sahip Moro kan portakalında yaprak stoma özellikleri.....	156
Çizelge 4.17. Melezleme kombinasyonları ile melezleme yapılan çiçek sayısı, elde edilen meyve sayısı ve meyve tutma oranı.....	162
Çizelge 4.18. Melezleme kombinasyonlarından elde edilen meyve ve tohum sayıları ile meyve başına düşen tohum sayısı	162
Çizelge 4.19. Melezleme kombinasyonları ile melezleme yapılan çiçek sayısı, elde edilen meyve sayısı ve meyve tutma oranı.....	173
Çizelge 4.20. Dönem, ortam, genotip ve bu faktörlerin interaksiyonlarının % kallus oluşumu üzerine etkilerine ait üç yönlü varyans analizi sonucu.....	175

Çizelge 4.21. Tam çiçeklenmeden altı hafta sonra genotip ve kültür ortamlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri	176
Çizelge 4.22. Tam çiçeklenmeden sekiz hafta sonra genotip ve kültür ortamlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri	177
Çizelge 4.23. Farklı izolasyon koşullarında kallus protoplast verimi	181
Çizelge 4.24. Farklı enzim ve besin ortamlarında yaprak protoplast verimi	183





ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Dünya turunçgil üretim miktarının türlere göre dağılımı	1
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan ‘Ortanique’ tangor çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri	42
Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan ‘Klemantin 22D’ mandarin çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri.....	43
Şekil 3.3.	Çalışmada kullanılan ‘Moro’ kan portakalı çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri.....	44
Şekil 3.4.	Çalışmada kullanılan ‘Antalya Kleopatra’ mandarininin ağaç ve meyve görüntüleri.....	46
Şekil 3.5.	Çalışmada kullanılan ‘Rubidoux’ üç yapraklısının ağaç ve meyve görüntüleri	47
Şekil 3.6.	Çalışmada kullanılan ‘Carrizo’ sitranjının ağaç ve meyve görüntüleri	48
Şekil 3.7.	Çalışmada kullanılan ‘Pomeroy’ üç yapraklısının ağaç ve meyve görüntüleri	48
Şekil 3.8.	Çalışmada kullanılan ‘Yuzu’ anacının ağaç ve meyve görüntüleri	49
Şekil 3.9.	Çalışmada kullanılan ‘Volkameriana’ anacının ağaç ve meyve görüntüleri	50
Şekil 3.10.	Çalışmada kullanılan ‘Swingle’ sitrumelo anacının ağaç ve meyve görüntüleri.....	51
Şekil 3.11.	Çalışmada kullanılan Çin turuncunun ağaç ve meyve görüntüleri.....	52
Şekil 3.12.	Çalışmada kullanılan ‘Sunki’ mandarinin ağaç ve meyve görüntüleri	52
Şekil 3.13.	Çalışmada kullanılan ‘Gou Tou’ turuncunun ağaç ve meyve görüntüleri	53
Şekil 3.14.	M ₁ V ₁ , M ₁ V ₂ ve M ₁ V ₃ aşamalarından Hernandina ve Ortanique fidanlarına ait genel görüntüler	55

Şekil 3.15.	M1V3 aşamasındaki Hernandina ve Ortanik tangor çeşitlerinin ısıtılmasıyla elde edilmiş bireylerin bulunduğu parsel	56
Şekil 3.16.	Deneme Alanına Ait Uydu Görüntüsü	56
Şekil 3.17.	W.Murcott, Klemantin 22D ve Moro kan portakalının aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulamasından genel görüntüler	60
Şekil 3.18.	Kolhisin uygulaması sonucu gelişmekte olan sürgünlerden genel görüntüler	61
Şekil 3.19.	Kolhisin uygulamasına hazırlık amacıyla sürgün uçlarında bulunan yaprakların budanması ve budama yapılan yaprakların koltuklarında bulunan gözlerde sürgün aktivitesinin başlangıcı	62
Şekil 3.20.	Sürgünlere kolhisin uygulaması için hazırlık aşamasında olan fidanlardan genel görüntüler.....	63
Şekil 3.21.	Sürgünlere kolhisin uygulamasından genel görüntüler	63
Şekil 3.22.	Ploidi seviyesinin belirlenmesi çalışmasında kullanılan flow sitometri cihazının ve çalışma aşamasının genel görüntüleri	65
Şekil 3.23.	Anthesis aşamasında toplanan çiçekler ve çiçeklerden izole edilen anterlere ait genel görüntüler.....	68
Şekil 3.24.	Klasik anaç melezleme çalışmasından genel görüntüler	69
Şekil 3.25.	Klasik melezlemelerden elde edilen meyvelerden çıkartılan tohumların yıkanması ve kurutulmasına ait genel görüntüler	70
Şekil 3.26.	Klasik melezlemelerden elde edilen tohumların serada torf ortamına ekiminden genel görüntüler.....	70
Şekil 3.27.	DNA izolasyon aşamaları.....	73
Şekil 3.28.	DNA miktar ve kalitesinin NanoDrop'da ölçülmesi	74
Şekil 3.29.	Jel hazırlığı ve Örneklerin Li-cor cihazına yüklenmesi.....	77
Şekil 3.30.	Ovül kültürü çalışmalarında meyvelerin yüzey sterilizasyon aşamalarına ait görüntüler	79
Şekil 3.31.	Ovül kültürü çalışmaları için kültür ortamlarının hazırlanışı	81
Şekil 3.32.	İzole edilen ovüllerin besin ortamında kültüre alınışı	81

Şekil 3.33. Kallus hücrelerinden protoplast elde etmek üzere yatay çalkalayıcıda inkübasyon	85
Şekil 3.34. Yaprak mezofil protoplastı üzere yatay çalkalayıcıda inkübasyon	87
Şekil 3.35. CPW solüsyonları aracılığıyla santrifüj sonrası iki faz arasına toplanan embriyogenik kallus ve yaprak mezofil hücresi kaynaklı protoplastlar.....	88
Şekil 3.36. Protoplastların sayımında kullanılan lam ve protoplastların sayım aşamasından genel görüntüler	89
Şekil 3.37. Protoplast füzyonunda kullanılan prob ve füzyon jeneratöründen genel görüntüler.....	90
Şekil 3.38. Elektro füzyon işlemi sonrası katı ortam üzerinde sıvı kültür tekniği kullanılarak protoplastların ve heterokaryonların kültüre alınması	92
Şekil 4.1. Hernandina ve Ortanique çeşitlerinden gama ışını uygulaması yoluyla elde edilmiş bitkilerle kurulmuş bahçeden genel görüntüler	96
Şekil 4.2. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve ağırlığı dağılımı.....	99
Şekil 4.3. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve yüksekliği dağılımı.....	99
Şekil 4.4. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve çapı dağılımı.....	100
Şekil 4.5. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve şekil indeksi dağılımı	101
Şekil 4.6. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda kabuk kalınlığı dağılımı.....	102
Şekil 4.7. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda dilim sayısı dağılımı	103
Şekil 4.8. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda tohum sayısı dağılımı.....	104
Şekil 4.9. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda incelenen H1019, H1031, H1033 ve H1077 kodlu bireylere ait meyve fotoğrafları	106
Şekil 4.10. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda orta eksen çapı dağılımı	107
Şekil 4.11. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda usare miktarı dağılımı	107
Şekil 4.12. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda SÇKM miktarı dağılımı	108

Şekil 4.13. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda titre edilebilir asit miktarı dağılımı.....	109
Şekil 4.14. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda SÇKM/Asit oranı dağılımı.....	110
Şekil 4.15. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve dış görünüşü dağılımı ...	110
Şekil 4.16. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve şekli dağılımı	111
Şekil 4.17. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve kabuk yapısı dağılımı	112
Şekil 4.18. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve kabuk rengi dağılımı	113
Şekil 4.19. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve et rengi dağılımı	113
Şekil 4.20. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve suyu rengi dağılımı.....	114
Şekil 4.21. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve et tekstürü dağılımı.....	114
Şekil 4.22. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda kabuğun ete bağlılığı dağılımı ..	115
Şekil 4.23. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve ağırlığı dağılımı	118
Şekil 4.24. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve yüksekliği dağılımı	119
Şekil 4.25. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve çapı dağılımı	120
Şekil 4.26. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve şekil indeksi dağılımı	120
Şekil 4.27. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda kabuk kalınlığı dağılımı.....	121
Şekil 4.28. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda dilim sayısı dağılımı	122
Şekil 4.29. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda tohum sayısı dağılımı	123
Şekil 4.30. 2-88 ve 5-70 kodlu Ortanique mutantlarının meyvelerinden genel görüntüler	124
Şekil 4.31. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda usare miktarı dağılımı.....	125
Şekil 4.32. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda SÇKM miktarı dağılımı.....	126
Şekil 4.33. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda titre edilebilir asit miktarı dağılımı.....	127
Şekil 4.34. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda SÇKM/Asit oranı dağılımı	128
Şekil 4.35. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve dış görünüşü dağılımı.....	128
Şekil 4.36. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve şekli dağılımı	129
Şekil 4.37. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve kabuk yapısı dağılımı.....	130
Şekil 4.38. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve kabuk rengi dağılımı	130

Şekil 4.39.	Ortanique M ₁ V ₃ popülasyonunda meyve et rengi dağılımı	131
Şekil 4.40.	Ortanique M ₁ V ₃ popülasyonunda meyve suyu rengi dağılımı	132
Şekil 4.41.	Ortanique M ₁ V ₃ popülasyonunda meyve tekstürü dağılımı	132
Şekil 4.42.	Ortanique M ₁ V ₃ popülasyonunda kabuğun ete bağlılığı dağılımı	133
Şekil 4.43.	Triploid standart referans olarak kullanılan Bearss laymına ait yaprak hücresi nüklear DNA içeriği.....	138
Şekil 4.44.	Klemantin 22D mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri	139
Şekil 4.45.	2x+4x mixoploid W.Murcott mandarininin yaprak hücresi nüklear DNA içeriği	140
Şekil 4.46.	Klemantin 22D mandarininin 2x ve 4x ploidi seviyelerine sahip bitkilere ait yaprak stoma yoğunluk ve stoma büyüklüğü farkını gösteren görüntüler.....	141
Şekil 4.47.	Klemantin 22D mandarininin 2x ve 4x ploidi seviyelerine sahip bitkilerine ait stoma uzunluğu ve genişliği ölçümlerinden genel görüntüler	141
Şekil 4.48.	Sürgünlere kolhisin uygulaması işleminden genel bir görünüm	144
Şekil 4.49.	Sürgünlere kolhisin uygulaması sonrasında gelişmekte olan sürgünler.....	148
Şekil 4.50.	Triploid standart referans olarak kullanılan Bearss laymına ait yaprak hücresi nüklear DNA içeriği.....	149
Şekil 4.51.	Klemantin 22D mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri	149
Şekil 4.52.	Mixoploid lemantin 22D mandarini genotiplerinin yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri.....	150
Şekil 4.53.	W.Murcott mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri	150
Şekil 4.54.	Moro kan portakalının flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri.....	151

Şekil 4.55. Gelişmekte olan tetraploid ve mixoploid bitkilere ait genel görüntüler	152
Şekil 4.56. Farklı ploidi seviyesindeki bitkilerde alınan yaprak örneklerinde stomatal gözlemler	153
Şekil 4.57. Klasik melezleme kombinasyonlarında yer alan baba ebeveynlere uygulanan TTC testi sonucu saptanan çiçek tozu canlılık düzeyleri	159
Şekil 4.58. TTC çiçek tozu canlılık testi uygulanmış genotiplerine ait çiçek tozları.....	160
Şekil 4.59. Melezleme çalışmalarından elde edilen tohumların çimlenmesiyle oluşan bitkiciklere ait görüntüler	163
Şekil 4.60. Klasik melezleme kombinasyonların elde edilen tohum sayısı ve çimlenerek gelişim gösteren bitki sayısı.....	164
Şekil 4.61. Klasik melezleme kombinasyonlarından elde edilen bitki ve melez sayıları.....	165
Şekil 4.62. Çin turuncu x Rubidoux ve Gou Tou turuncu x Rubidoux melezleme kombinasyonlarından elde edilmiş melezlerden genel görüntüler	166
Şekil 4.63. Sunki mandarini x Rubidoux melezleme melezleme kombinasyonundan elde edilmiş melezler.....	166
Şekil 4.64. 83 no'lu primere ait jel görüntüsü.....	168
Şekil 4.65. 84 no'lu primere ait jel görüntüsü.....	169
Şekil 4.66. 121 no'lu primere ait jel görüntüsü.....	169
Şekil 4.67. 54 no'lu primere ait jel görüntüsü.....	170
Şekil 4.68. 105 no'lu primere ait jel görüntüsü.....	170
Şekil 4.69. Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan elde edilen bitki ve melez sayıları	171
Şekil 4.70. Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonlarından elde edilmiş melezlerden genel görüntüler	171

Şekil 4.71. Çalışmada kullanılan farklı kültür ortamlarında gelişen kallusların görüntüsü.....	174
Şekil 4.72. Seçilerek alt kültüre alınan embriyojenik kalluslar ve alt kültürde gelişerek çoğalmış kalluslar	180
Şekil 4.73. Farklı enzim ve besin ortamı koşullarında embriyojenik kalluslardan elde edilen protoplast verimi.....	182
Şekil 4.74. Çalışmada embriyojenik kallus hatlarından elde edilen protoplast hücrelerinden genel görüntüler.....	182
Şekil 4.75. Farklı enzim ve besin ortamı koşullarında embriyojenik kalluslardan elde edilen protoplast verimi.....	184
Şekil 4.76. Rubidoux üç yapraklı, Benecke üç yapraklı ve Carrizo sitranjı yapraklarından elde edilen mezofil protoplastlarından genel görüntüler	184
Şekil 4.77. Füzyon işleminin gerçekleşme aşamasına ait genel görüntüler.....	185
Şekil 4.78. Kültürden 20 gün sonra heterokaryonlardan elde edilmiş hücre kolonileri ve mikro kallus oluşumu.....	186
Şekil 4.79. MT besin ortamında mikro kalluslardan embriyojenik kallusların ve embriyoların oluşumu ile heterokaryonlardan elde edilmiş gelişmekte olan olgunlaştırılmış embriyolar	187
Şekil 4.80. Heterokaryonlardan elde edilen somatik embriyoların çimlenmesi ve gelişim gösteren embriyolardan elde edilen bitkiciklerden genel görüntüler.....	188
Şekil 4.81. Somatik melezleme çalışmalarından elde edilen bitkiciklerin nükleer DNA içeriği	189



SİMGELER VE KISALTMALAR

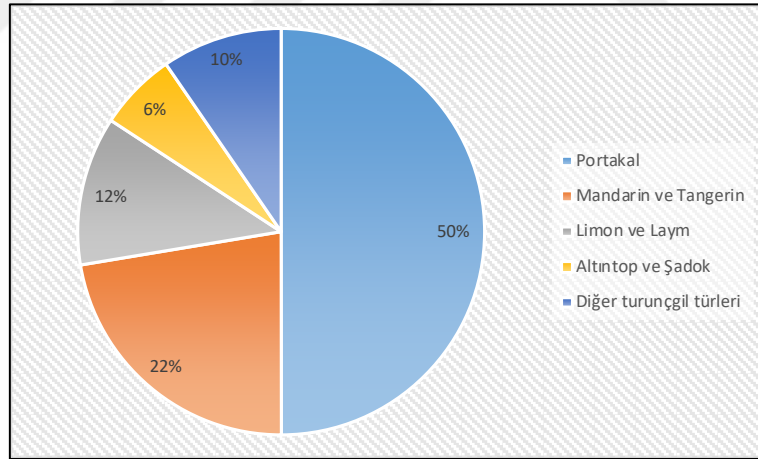
da	: Dekar
°C	: Santigrat derece
dak.	: Dakika
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
cm	: Santimetre
kg	: Kilogram
L	: Litre
g	: Gram
h	: Saat
µL	: Mikro Litre
SÇKM:	: Suda Çözünebilir Kuru Madde
atm	: Atmosfer
mm	: Milimetre
Gy	: Gray



1. GİRİŞ

Turunçgillerin Doğu Arabistan'dan Filipinler'e ve Himalayalar'ın güneyinden Endonezya-Avustralya'ya kadar olan bölgede doğal olarak yayılım gösterdiği bilinmektedir. Bu alan içerisinde Kuzeydoğu Hindistan ve Kuzey Burma'nın turunçgillerin köken merkezi olduğuna inanılmakta, ancak son bulgulara göre Çin'in değişik bölgelerinde, Kuzeydoğu Hindistan'da, Burma'da ve Çin'in Yunnan eyaletinde birçok turunçgil türünün bulunmasından dolayı bu bölgelerin anavatan olarak önemli olduğu görülmektedir (Davies ve Albrigo, 1994; İncesu, 2011).

2016 yılı değerlerine göre dünya turunçgil üretimi 146.429.018 ton'dur. Bu miktarın %49.98'ini portakallar, %22.39'unu mandarin ve tangerinler, %11.85'ini limon ve laymlar, %6.20'sini altıntop ve şadoklar, %9.58'ini ise diğer turunçgil türleri oluşturmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya turunçgil üretim miktarının türlere göre dağılımı (FAO, 2018)

Ülkemizin de içerisinde yer aldığı Akdeniz havzasında dünya turunçgil üretiminin yaklaşık olarak %22'si gerçekleşmektedir. Ülkemiz turunçgil üretimi 2016 yılında 4.293.007 tona ulaşmış olup, dünya toplam turunçgil meyveleri

üretiminin %2.93'ünü oluşturmaktadır (FAO, 2018). Ülkemiz, turunçgil meyveleri ihracatı bakımından dünyada ve Akdeniz Ülkeleri içerisinde 2. sırada yer almaktadır. Dünya'da 2013 yılı verilerine göre 17.008.002 ton turunçgil meyvesi ihraç edilmiş ve bunun yaklaşık olarak yarısı Avrupa'da gerçekleşmiştir (FAO, 2018).

Turunçgil meyveleri geçmişte Avrupa'da zenginliğin sembolü olmuş, birçok sarayda da turunçgillerin yetiştirilmesi için "orangeries" adını verdikleri seralar inşa edilmiştir. Günümüzde de başta İspanya olmak üzere turunçgil yetiştiriciliğinin uygun olduğu iklimlere sahip İtalya, Fransa ve Portekiz gibi birçok Avrupa ülkesinde turunçgil üretimi gerçekleştirilmektedir.

İspanya'da 18. yüzyıla kadar turunçgiller çoğunlukla süs bitkisi, tıbbi amaçlı ya da şekerleme-tatlı olarak kullanılmıştır. Taze tüketime yönelik ilk ticari turunçgil üretim alanları 18. yüzyılın sonunda Valencia ve Castellon bölgelerinde oluşturulmuştur (Navarro, 2015). Yaklaşık 200 yıldır turunçgil üretiminin gerçekleştirildiği İspanya 2016 yılındaki 7.022.271 tonluk üretimi ile Dünyada en çok turunçgil ihraç eden ülke konumundadır (FAO, 2018).

İspanya, özellikle Akdeniz havzasında gerçekleşen portakal, mandarin ve limon ihracatının neredeyse %50'sini karşılamakta olup, turunçgil sektörünü bu pazarları elde tutacak biçimde yönlendirmektedir. İspanya'nın pazardaki hâkimiyeti, turunçgil üretim desenini eylül ayından haziran ayına kadar boşluk olmaksızın pazara kaliteli taze meyve sunacak şekilde planlamasından kaynaklanmaktadır. Eylül ayından haziran ayına kadar olan çeşit zenginliği de turunçgil ıslah programlarının başarılı şekilde uygulanmasından geçmektedir.

Meyvecilikte ıslah çalışmaları, meyvelerin tüketilmeye başlandığı tarihlerden itibaren doğada kendiliğinden ortaya çıkan, üstün özelliklere sahip tiplerin seleksiyonu ile başlamıştır. Turunçgiller bitkisel özellikleri bakımından son derece geniş genetik çeşitliliğe sahiptirler. Doğal mutasyonlar ve türler arası doğal melezlenmeler ile birçok hibrit, çeşit ve tip ortaya çıkmıştır. Diğer çok yıllık

türlerde olduğu gibi turunçgillerde de günümüzde üretimi yapılan çeşitlerin önemli bir kısmı, doğada yapılan seleksiyonlarla elde edilmişlerdir.

Turuncun (*Citrus aurantium*) doğal bir mandarin şadok melezi (Li ve ark., 2010); limonun [(*Citrus limon* (L.) Burm.] ağaç kavunu ve turunç arasında gerçekleşen doğal melez olduğu (Nicolosi ve ark., 2000; Gülşen ve Roose, 2001); portakalın mandarin x şadok melezlemesinden meydana gelen popülasyonun doğal yollarla daha çok mandarinle melezlenerek evrimleştiği ve böylece genetik yapısının az bir miktar şadok ve çoğunlukla mandarinden meydana gelmiş bir tür olduğu (Barkley ve ark., 2006; Luro ve ark., 2008); altıntopların ise doğal yollarla meydana gelen şadok x portakal melezlemesinden oluşan bir tür olduğu bildirilmiştir (Asins ve ark, 1996).

Turunçgillerde bugünkü genetik varyabilitenin kaynağı incelendiğinde tüm tür ve çeşitlerin ağaç kavunu (*Citrus medica* L.), mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), şadok [*Citrus maxima* (Burm.)] ve *C. micrantha* Wester'dan doğduğu bildirilmektedir (Ollitrault ve ark, 2012). Bugün ticari olarak yetiştiriciliği yapılan çeşitler, bu dört türden doğal ve yapay mutasyon ve melezlemelerden meydana gelmiş veya geliştirilmiştir.

Turunçgillerde ilk resmi ıslah çalışmaları Florida'da 1893 yılında USDA tarafından başlatılmıştır. Kaliforniya Üniversitesi Riverside kampüsünde 1907 yılında "Turunçgil Araştırma Merkezi" kurmuştur. Florida Üniversitesi en büyük çaplı turunçgil ıslah programını 1924 yılında Lake Alfred'de Turunçgil Araştırma ve Eğitim Merkezi (CREC)'de başlatmıştır. Günümüzde bütün büyük üretici ülkelerin çok sayıda turunçgil ıslah programları bulunmaktadır (Khan ve Kender, 2007).

Turunçgillerde yeni çeşitlerin elde edilmesi seleksiyon, melezleme ve mutasyon ıslah programları ile gerçekleştirilmektedir. Turunçgil üreticisi olan ülkelerde ıslah programları oldukça uzun zamandır yürütülmesine rağmen birçok turunçgil çeşit ve anacı göz mutasyonları veya şans çöğürleri ile elde edilmiştir. Klasik ıslah yöntemleri ile elde edilen çeşit sayısı oransal olarak bu iki yöneme

göre daha azdır. Amerika’da yapılmış ıslah çalışmalarında klasik melezleme ile Minneola, Orlando, Nova, Page, Robinson, Sunburst, Fallglo ve Ambersweet gibi tanjelo (mandarin x altıntop) ve tangorlar (mandarin x portakal) elde edilmiştir. Swingle sitrumelo (altıntop x üç yapraklı), Carrizo ve Troyer sitranjları (portakal x üç yapraklı) yine klasik melezleme yöntemleriyle bulunmuş anaçlardır. Turunçgillerde klasik ıslah yöntemleri ile çeşit geliştirme yavaş ve oldukça maliyetlidir. Klasik melezleme yoluyla yeni çeşitlerin elde edilmesi yaklaşık 20-35 yıl sürmektedir (Khan ve Kender, 2007). Melezleme ıslahı yönteminde en sınırlayıcı etmenlerden biri de apomiksistir. Turunçgillerde apomiksis tesadüfen beklenmedik şekilde gelişen nüseller hücrelerden meydana gelen embriyolar (nüseller embriyonu) olarak tanımlanmakta ve bunlardan ana ebeveyn ile aynı genetik yapıya sahip bireyler elde edilmektedir (Frost ve Soost, 1968; Koltunow, 1993). Turunçgillerin büyük bir kısmı, ağaç kavunu, şadok, klemantin mandarinleri ve bazı mandarin melezleri haricinde apomiktiktir. Bu nedenle klasik melezlemelerde ana ebeveyn olarak monoembriyonik çeşit kullanılarak melezleme başarısı arttırılmaya çalışılmaktadır.

Klasik melezleme yolunun oldukça uzun sürmesi ve maliyetli olması nedeniyle mutasyon ıslahı ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. Mutasyon ıslahında temel hedef çekirdeksizlik, olgunlaşma zamanı ve renklilik gibi var olan çeşidin iyileştirilmesi ya da istenen özelliğin aktarılabilmesidir. Turunçgillerde mutasyon ıslahı ile geliştirilen ilk çeşit Hodgson altıntopundan elde edilen meyve eti renkli olan Star Ruby çeşidinin olduğu bilinmektedir. Günümüzde ise W.Murcott çeşidinden mutasyon ıslahı yoluyla Tango çeşidi, Daisy, Fairchild ve Kinnow mandarinlerinden ise sırasıyla Daisy SL, Fairchild SL ve Kinnow SL çeşitleri elde edilmiş olup, ticari olarak yetiştiricilikleri yapılmaktadır (Hensz, 1971; Williams ve Roose, 2008a; Williams ve Roose, 2008b).

Turunçgil üretimi 100’den fazla ülkede gerçekleştirilmekte ve ihracat şansının arttırılabilmesi için kalite üzerinde tüm ülkeler yoğun çalışma göstermektedirler. Turunçgil meyvelerinde son dönemlerde aranan en önemli kalite

parametrelerinden biri de çekirdeksizliktir. Sofralık turunçgillerde istenmeyen çekirdek artık sanayilik çeşitlerde de insanların hoşuna gitmeyen bazı aroma bileşikleri ve acılığa sebep olması nedeniyle arzulanamamaktadır (Ollittraut ve ark., 2008).

Çekirdeksizliğin mutasyon ıslahı ile elde edilebilmesinin yanında triploidi ile de bunu sağlamak mümkündür. Triploid melezlerin elde edilmesi, yeni çekirdeksiz çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir ıslah stratejisi haline gelmiştir (Ollittraut ve ark., 2008). Turunçgillerde yetiştiriciliği yapılan apomiktik ve apomiktik olmayan çeşitlerin hemen hepsi diploid ($2n=2x=18$) olmakla birlikte tesadüf çöğürlerinde triploid ve tetraploid bitkiler bulunabilmektedir. Bu nedenle turunçgil ıslahçıları çekirdeksiz yeni çeşit geliştirmek için ploidi ıslahına yönelmişlerdir (Aleza ve ark., 2009).

Turunçgillerde triploid bitkiler iki diploid ebeveynin melezlenmesiyle (Esen ve Soost, 1971; Geraci ve ark., 1975; Luro ve ark., 2004) ya da diploid ve tetraploid ebeveynlerin melezlenmesi yoluyla elde edilebilmektedir (Esen ve Soost 1971; Esen ve Soost 1977; Oiyama ve ark., 1981; Starrantino ve Recupero 1981). Melogold, Oroblanco, Tacle, Clara, Camel, Reale, Alcantara, Mandared, Mandalate, Lemox, Winola, Garbi, ForMco 96-082, çeşitleri turunçgillerde ploidi ıslah programlarıyla elde edilmiş triploid çekirdeksiz çeşitlerdir (Aleza ve ark., 2010). Poliploidi ıslahı sadece turunçgillerde değil, birçok bitki türünün de geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır. Çünkü tüm kromozomun takımının katlanması, hücre hacminde ve buna bağlı olarak bitki organlarında büyümeye sebep olduğundan, bu özellik ıslahta ve iri meyveli tiplerin seçiminde önemli bir araçtır. Ekonomik açıdan önem taşımakta olan elma, muz, dut, şeker pancarı, çay ve karpuz gibi pek çok türün triploid olan kültür varyeteleri bugün ticari olarak yetiştirilmektedir.

Turunçgil meyvelerinin yoğun talep görmesi dikim alanlarının artmasını sağlamıştır. Dünyada 35 kuzey ve güney enlemleri arasında yetiştirilebilen turunçgil yetiştiriciliğini (Khan ve Kender, 2007) sınırlayan en önemli etken düşük

sıcaklıklardır. Bu enlem dereceleri arasında farklı ekolojik koşullarda turunçgil yetiştiriciliğinin yapılabilmesinin nedeni turunçgillerde var olan çeşit zenginliği nedeniyle uygun ekolojik koşullar için uygun çeşit seçimlerinin yapılabilmesidir. Farklı toprak koşullarına uyum sağlayabilen anaç seçimleri ile bu alanların artışı sağlanabilmiştir.

Turunçgillerde anaç ıslahı çalışmaları 1893 yılında Florida'da başlatılmıştır. Florida'da meydana gelen donlardan sonra soğuklara dayanımı sağlayabilmek için *Poncirus trifoliata* bitkileri baba ebeveyn olarak kullanılmış ve günümüzde de yaygın olarak kullanılan Carrizo ve Troyer sitranjları elde edilmiştir. Anaç ıslahı çalışmaları ABD, İspanya, Fransa ve diğer turunçgil üreticisi ülkelerde devam etmektedir. Çünkü dünyada turunçgil üretim alanlarının artması, zaten var olan biyotik ve abiyotik stres koşullarının çeşitlenmesi ve artmasını da beraberinde getirmiştir. Dolayısıyla daha önceden üstün özellikleri nedeniyle anaç olarak kullanılan genotipler günümüz koşullarında yetersiz kalmıştır. Bu durum, Akdeniz ülkeleri ve ülkemiz turunçgil sektöründe, üstün özellikleri nedeniyle anaç olarak kullanılan genotiplerin yanında yeni anaçların geliştirilmesi için çeşitli ıslah programlarının başlamasına sebep olmuştur (Davies ve Albrigo, 1994; Dambier ve ark, 2011).

Akdeniz ülkeleri turunçgil endüstrisi birçok biyotik ve abiyotik stres koşullarıyla karşı karşıya gelmiştir. Uygun anaç seçimiyle bu elverişsiz koşulların bazısının üstesinden gelinebilmektedir (Davies and Albrigo, 1994; Lawrence and Bridges, 1974). Anaçlar sahip oldukları değişik ve farklı özellikler nedeniyle, yetiştiricilikte karşılaşılan sınırlayıcı ve engelleyici faktörlerin (biyotik ve abiyotik) çözümlenmesinde; verimlilik, erken meyveye yatma ve meyve kalitesi gibi yetiştirici ve pazar isteklerinin karşılanmasında ve çeşit devamlılığının sağlanmasında çok çeşitli yararlar sağlamaktadırlar (Yıldırım, 1996).

Alkali ve oldukça değişik karakterdeki topraklara uyum gösteren turunç anacı, kök ve kök boğazı çürüklüğüne (*Phytophthora citrophthora*) tolerans göstermesi, ticari çeşitlerle genellikle iyi uyuşması, kolaylıkla çoğaltılabilmesi ve

%85-90 oranında poliembriyoni oluşturması sayesinde birörnek çöğür vermesi sebebiyle Akdeniz havzasında yaygın olarak kullanılan bir anaç olmuştur. Turunç bu üstün avantajlarına rağmen, tedavisi olmayan Tristeza (CTV) hastalığına duyarlıdır. CTV aşı gözü ve aşılama yoluyla yayıldığı gibi, en önemli bir diğerk yayılma yolu ise yaprak biti (*Toxoptera citricida*) vektörleridir. Ülkemizde turunçgil ağaçlarının %90'dan fazlasının turunç anacı üzerine aşılandığı göz önünde bulundurulduğunda, bu zararlının yayılması halinde ülkemiz turunçgil sektörünün uğrayabileceğı zararın önemi anlaşılmaktadır. Castle ve Gmitter (1999) turuncun Tristezaya duyarlı olmasından dolayı bugünün anaç profili içinde artık güvenli bir yeri olmadığını rapor etmişlerdir. Bu nedenle turunca alternatif olabilecek yeni anaçların seçimine ivedilikle ihtiyaç duyulmaktadır (Ollitrault ve ark., 2006). Dünya'da turunçgil anaç ıslahı çalışmaları da turunca alternatif olabilecek verimli, daha küçük taç oluşturran, tohumları apomiktik, anaç/kalem uyuşması iyi, hastalık ve zararlılara tolerant, meyve kalitesine olumlu etkide bulunan ve meyvelerinde çok sayıda tohum içeren anaç ıslahı üzerine yoğunlaşmıştır (Khan ve Kender, 2007). Özellikle Tristeza ve Huanglongbing (HLB) hastalıklarına ve yüksek pH'ya tolerans gösteren anaç elde etmek, turunçgil ıslahçıların temel hedefi haline gelmiştir.

Amaca uygun anaç ıslahı için turunçgillerde genetik çeşitliliğinin artırılmasında en sık başvuru ve en eski yöntemlerden birisi de kontrollü melezleme çalışmalarıdır. Türler arası ve cinsler arası melezlemeler türler ve cinsler arasındaki farklı genetik karakterlerin aktarılmasıyla elde edilecek yeni türlerin oluşturulmasında önemlidir. Ancak klasik ıslah çalışmaları, genotiplerin üreme biyolojisine bağılı sorunlar nedeniyle melez bitki elde etmek oldukça güçtür. Turunçgil anaçlarında yüksek oranda görülen poliembriyoni durumu, klasik ıslah çalışmaları zigotik bireylerin elde edilmesini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Diğerk yandan özellikle abiyotik ve biyotik stres faktörlerine dayanıklılık/tolerans gösteren bireylerin *Citrus* cinsi dışında olması ve yapılan melezleme kombinasyonlarında bu cinslerin kullanılmasında sıklıkla görülen

cinsler-arası uyumsuzluk durumu, klasik ıslah çalışmalarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle anaç ıslah çalışmaları protoplast kültürü yoluyla somatik melezleme yöntemi üzerine yoğunlaşmıştır (Grosser ve ark., 1995).

Protoplast, bir hücrenin hücre duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısım olarak tanımlanmaktadır. Protoplastlar uygun koşullarda canlılığını koruyarak yeni hücre duvarı oluşturabilme, mitozla bölünebilme ve hücre kolonileri (mikrokallus) oluşturarak yeni bitkiler oluşturabilme yeteneğindedir. Protoplast kültürünün başlangıcında hücrelerden protoplast elde etmek amacıyla mekanik yolla izolasyon yöntemi uygulanmış, ancak protoplast elde etme verimliliğinin ve uygulamanın tekrar edilebilirliğinin düşük olduğu bildirilmiştir. Bahsedilen yöntemin etkin bir şekilde kullanılamaması sonucunda araştırmacılar bir dokunun hücrelerini birbirinden ayıran ve hücre duvarını eriten enzimleri keşfederek ve bu enzimlerle protoplast izolasyonu çalışmalarına yönlenmişlerdir. Ancak 1970’li yıllara kadar protoplastlardan bitki elde etmek mümkün olmamıştır. Carlson ve ark. (1972) protoplast füzyonu yöntemi ile ilk defa somatik melez tütün bitkisini elde etmişlerdir (Babaoğlu ve Özcan, 2001).

Turunçgillerde somatik melezleme çalışmaları yoğun olarak Florida Üniversitesi ve CIRAD-Fransa’da yürütülmektedir. CIRAD’da yapılan çalışmalardan Yerli mandarin ve *Poncirus trifoliata*’nın somatik melezlenmesiyle Flhorag1 elde edilmiş, bu anacın abiyotik stres koşullarına tolerans düzeyleri incelenmektedir (Mouhaya ve ark., 2010). Florida’da gerçekleştirilen somatik melezleme çalışmalarında bugüne kadar çok sayıda bitki elde edildiği, mandarin + şadok somatik melezinin tristezaya dayanıklı; Nova + şadok somatik melezi ile Kleopatra mandarini + Rangpur laymı somatik melezlerinin ise tuza dayanıklı olduğu, elde ettikleri somatik melez anaçlarında kalem/anaç uyuşma durumlarını incelediklerini bildirmişlerdir (Grosser ve ark., 1992).

Turunçgillerde yeni çeşit ve yeni anaç ıslahı için önemli üretici ülkeler 1900’lü yıllardan günümüze kadar çalışmalar yapmaktadır. Türkiye turunçgil üretimi 1950’li yıllardan sonra ivme kazanmış, 1960’lı yılların başında 288.931 ton

olan üretim miktarı günümüzde yaklaşık 4 milyon tona ulaşmıştır (FAO, 2018). 1930'lu yıllarda Antalya'da "Sıcak İklim Bitkileri Islahı İstasyonu" bugünkü adıyla BATEM kurulmuş, yurtdışından turunçgil çeşit introduksiyon çalışmaları başlatılmıştır.

Ülkemizde turunçgil ıslahı "Melezleme yoluyla hibrit elde edilmesi" adlı çalışmayla Bahçecioğlu ve ark. (1960) tarafından başlatılmıştır. Sonrasında ALATA, BATEM, Çukurova Üniversitesi ve Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ekipleri mutasyon, melezleme ve seleksiyon çalışmaları ile turunçgillerde yeni anaç ve çeşit ıslahı konusunda çalışmalara devam etmişlerdir. Özsan ve ark. (1986), "Turunçgillerde Aşı Gözü Seleksiyon Sertifikasyonu ve Çeşit Geliştirme" projesi ile tüm Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yeni portakal, mandarin ve limon çeşitleri bulabilmek için seleksiyon çalışması yapmışlardır (Hızal, 2012).

Islah çalışmaları uzun soluklu olup, yoğun bir iş gücü ve emek isteyen çalışmalardır. Amaca uygun bireylerin belirlenebilmesi için öncelikle hedeflenen amaç doğrultusunda planlanmış olan popülasyonların oluşturulması gerekmektedir. Ülkemizde turunçgil ıslahı ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllar itibariyle başlamış, ancak günümüzde istenilen düzeye ulaşmamış durumdadır. Ayrıca, turunçgil üretim desenimizin büyük çoğunluğunu yabancı kökenli çeşitler oluşturmaktadır. Bu durumun değişebilmesi için ivedilikle yeni çeşit ıslah çalışmalarının başlatılması, farklı ıslah yöntemleriyle planlanan hedefler doğrultusunda seçimlerin yapılabileceği yeterli sayıda bireyi içeren popülasyonların oluşturulması gerekmektedir.

Bu çalışmada hedefler;

- 1) Üretim dönemini daha geniş bir zamana yaymak amacıyla, orta-geç ve geç dönemde olgunlaşan, verimli ve yüksek kaliteli, özellikle çekirdeksiz ve iri meyveli mandarin çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik popülasyonların oluşturulması,
- 2) Ploidi ıslahı yoluyla çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin ve portakal çeşitlerini geliştirmek için tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi,

- 3) Ülkemiz ekolojik koşullarına uygun, özellikle alkali topraklara adapte olabilen, tristeza virüs hastalığı ve *Phytophthora citrophthora* etmeninin neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına tolerant yeni turuncgil anaçlarının geliştirilmesi,
- 4) Türkiye’de turuncgiller anaç ıslahında somatik melezleme konusunda yapılmış bir çalışma bulunmaması nedeniyle, ülkemizdeki çalışmaları başlatmak, somatik melezlemede başarıyı arttıracak farklı protokollerin denenmesi ve bu yöntemlerin oturmasını sağlamaktır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünya üzerinde meyvecilik yapılmaya başlandığından beri meyve ıslahı da yapılagelmiş, diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi meyvecilikte de çok eski zamanlardan beri yabancı formlardan seleksiyonlar yapılmış ve bu çalışmalar ıslah faaliyetlerinin başlangıcını teşkil etmiştir. Daha sonra aşının öğrenilmesiyle iyi bulunan formları çoğaltmak ve bunları muhafaza etme imkânı elde edilmiş böylece çeşit kavramı ortaya çıkmıştır. İXX. ve XX. yüzyıllarda Avrupa ve Amerika’da modern ıslah yöntemleri ile bağ-bahçe tarımında çeşit ve anaç ıslahı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde ise ıslah, ancak Cumhuriyetin ilanı ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi’nin 1933’de kurulmasıyla birlikte, Tarım Bakanlığı ile ortak çalışmalara başlamasından sonra mümkün olmuştur (Özbek, 1971).

2.1. Çeşit İslahı İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Günümüzde meyve ıslahında seleksiyon, melezleme ve mutasyon yöntemleri ile yeni çeşit elde edilmesi gerçekleştirilmektedir. Seleksiyon bitki ıslahının en eski ve ilk metodudur. Günümüzdeki kültür bitkilerinin meydana gelmesinde seleksiyon çalışmalarının büyük hizmetleri olmuş; daha sonra bitkilerde cinsiyetin belirlenmesi melezleme ve ıslah tekniği çalışmalarına yardımcı olmuştur (Şeniz, 1990). Örneğin, Sümerler ve Babillilerin hurma ağaçlarında dişi ve erkek cinsiyete göre suni tozlama yaptıkları bildirilmiştir (Genç, 1988). Diğer bir deyişle, melezleme çalışmaları Mendel’den önce başlamış, ancak bunun kalıtım esaslarına göre açıklanması 20. yy başında “Mendel kanunlarının” ortaya konulması ile mümkün olmuştur (Şeniz, 1990). Mendel kanunları ile bitkilerde melezleme ıslahı çalışmaları büyük bir ivme kazanmış ve bitki ıslahçıları tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmuştur. Mutasyon terimi ise Hugo de Vries tarafından bulunmuştur. De Vries “akşam sefası” ve Hollanda’da bulunan yabancı bitkiler üzerinde yaptığı kalıtım deneyleri sırasında yeni kuşak bitkilerinin bazısının bilinenlere uymadığı ve yabancı atasal bitkilerden belirgin şekilde farklı

olduğunu görmüş, bir organizmanın karakterinde meydana gelen bu değişiklikler için araştırmacı, “mutasyon” terimini kullanmıştır. Araştırmacı, 1901 yılında “Mutasyon Teorisi” adlı eserinde mutasyon yoluyla bitki ve hayvanlarda yeni tiplerin ortaya çıkabileceğini savunmuş ve 1904 yılında röntgen ışınlarının mutasyon yaratmak amacıyla kullanılmasını önermiştir (Fisher, 1997). X-ışınlarının mutasyon yaratma yönünde etkili olduğu ise ilk kez 1927 yılında *Drosophila*’da (sirke sineği), Müller tarafından açıklanmıştır (Micke ve ark, 1987).

Daha sonra yüksek yapılı bitkilerde genetik değişikliklerin oluşturulması için X-ışınlarının kullanımı 1920’lerin sonu ile 1930’ların başında Lewis John Stadler tarafından gerçekleştirilmiştir (Shu ve ark, 2012).

Turunçgil meyvelerinin ıslahında da seleksiyon, melezleme ve mutasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Poliembryoni, uyumsuzluk, yüksek heterozigoti ve kısırılık gibi biyolojik engeller turunçgillerde geleneksel ıslah yöntemlerinin uzun ve yüksek maliyetli olmasına neden olmaktadır. Ticari olarak yetiştirilen portakal çeşitlerinin birçoğunun doğal mutasyonlar sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Brezilya’da W. Navel, Baianinha ve Lima şeker portakalları doğal mutasyon ile oluşmuş çeşitler olup, benzer şekilde Teksas’ta da yine doğal mutasyon sonucu oluşan altıntop çeşitleri selekte edilmiştir. Doğal mutasyonlar turunçgillerde çeşit geliştirmede etkin role sahip olup, oluşma frekansı oldukça düşüktür. Buna karşın radyasyon ve/veya kimyasal mutagenlerin kullanımı ile oluşturulmuş yapay mutasyonlar ile genetik çeşitlilik arttırılabilmektedir (Latado ve ark, 2012).

2.1.1. Turunçgillerde Mutasyon Islahı ile Yapılan Çalışmalar

Mutasyon; geniş anlamda genetik yapıda aniden ortaya çıkan bir değişim olarak tanımlanabilir. Mutasyon, eşeysel üremedeki yeni gen kombinasyonu oluşumuna ve açılıma bağlı olmamakla birlikte gametlerde veya somatik hücrelerde meydana gelen değişimlerdir (Cameron ve Frost, 1968). Mutasyonlar doğrudan ve dolaylı olarak bitki ıslahında kullanılabilmektedir. Islah yöntemi olarak mutasyon, adaptasyon kabiliyeti iyi olan bir çeşidin bir veya iki özelliğinin

iyileştirmesi istendiğinde önem kazanmaktadır. Çünkü mutasyonlar melezleme ile karşılaştırıldığında çeşidin genel genotipinde oldukça az değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca mutasyon ıslahında melezleme ıslahına göre çeşit geliştirmek için gerekli olan süre nispeten daha kısadır. Yapılan mutasyon çalışmalarında mutant çeşitlerde, yüksek verimlilik, erken olgunlaşma, kırmızimsı kabuk rengi, çekirdek sayısında azalma, yüksek kaliteli meyve, pürüzsüz meyve kabuğu, ağaç hacminde küçülme vb. farklı olumlu özellikler tespit edilmiştir (Spiegel-Roy ve Kochba, 1973; Donini, 1992). Mutasyonlar anormal kalınlıkta meyve kabuğu oluşumu veya meyve etinde kuru bölgeler gibi istenmeyen pek çok karakterin ortaya çıkmasına neden olduğu gibi geç olgunlaşma, meyve eti renkliliği artışı gibi amaca uygun özellikleri de oluşturabilir (Davies ve Albrigo, 1994).

Turunçgillerde ise yapay mutasyon oluşturmak için ışınların ilk kullanımı 1935 yılında Haskins ve Moore tarafından x-ışınlarını tohumlara uygulamak suretiyle gerçekleştirilmiştir (Cameron ve Frost, 1968). Ancak gama ışınlarının etkili olma ve kullanım kolaylığı bakımından diğer mutajenlerle yürütülenlerin toplamından daha fazla kullanıldığı bildirilmiştir (Micke ve ark, 1990).

Turunçgillerde yapay mutasyonla başarıya ulaşılabileceğine dair en iyi örneklerden birisi 1959 yılında Teksas'ta R.Hensz tarafından 'Hudson' altıntopu tohumlarının radyasyona tabi tutularak bugün piyasalarda aranan ve oldukça koyu et rengine sahip olan Star Ruby altıntopunu elde etmesidir (Hensz, 1971). Daha sonraki yıllarda mutasyon ıslahı yöntemi, yeni portakal, altıntop ve mandarin çeşitleri geliştirmek amacıyla kullanılmıştır (Hearn, 1984; Vardi ve Spiegel-Roy, 1988). Mutasyon ıslahı yöntemi ile turunçgillerde olgunlaşma dönemi, çekirdeksizlik, meyve etinde renklilik, meyve iriliğinin ve verimin artışı gibi birçok olumlu özelliğin ortaya çıkarılması sağlanmıştır. 2000 yılı itibariyle Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA)'nda kayıtlı bulunan mutasyon ıslahıyla elde edilmiş vejetatif çoğaltılan bitkiler listesinde *Citrus* cinsi içerisinde çekirdeksizlik veya çekirdek sayısında azalma özelliği ile 5 mutant tescil ettirilmiştir (Ahloowalia, 2000). Günümüzde ise FAO-Uluslararası Atomik enerji kurumu "Mutant Çeşit

Veritabanı”na kayıtlı 13 turunçgil çeşidi (Çizelge 2.1) bulunmaktadır (FAO/IAEA, 2018).

Çizelge 2.1. FAO-Uluslararası Atomik enerji kurumu “Mutant Çeşit Veritabanı”na kayıtlı turunçgil çeşitleri.

Çeşit adı	Latince adı	Genel adı	Ülke	Kayıt yılı
Star Ruby	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	Altıntop	Amerika	1970
Hongju 418	<i>Citrus</i> sp.	Portakal	Çin	1983
Xuegan 9-12-1	<i>Citrus</i> sp.	Portakal	Çin	1983
Rio Red	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	Altıntop	Amerika	1984
Zhongyu 7	<i>Citrus</i> sp.	Tangelo	Çin	1985
Zhongyu 8	<i>Citrus</i> sp.	Tangelo	Çin	1985
Hongju 420	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarin	Çin	1986
Eureka 22 INTA	<i>Citrus limon</i> L. Burm.	Limon	Arjantin	1987
Valencia 2 INTA	<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Portakal	Arjantin	1987
Nero	<i>Citrus clementina</i>	Klemantin	İspanya	2006
Neufina	<i>Citrus clementina</i>	Klemantin	İspanya	2009
Clemenverd	<i>Citrus clementina</i>	Klemantin	İspanya	2010
NIAB Kinnow	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarin	Pakistan	2017

Russo ve ark (1981), yapay mutasyonların turunçgil ıslahında kullanılması olanaklarını inceledikleri araştırmalarında, Monreal klemantin çeşidinde her biri 4 göz içeren aşı kalemlerine 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 krad dozlarında gama ışını uygulamışlardır. Daha sonra bunlar turunç üzerine aşılanmıştır. 8 ve 10 krad dozları öldürücü olmuş ve bu dozların uygulandığı gözlerin tamamı ölmüştür. Çalışma sonucunda farklı kabuk rengine sahip meyveler, küçük meyveler ve bunların yanında ticari anlamda çekirdeksiz meyveleri olan ağaçlar (4-5 tohumlu) elde etmişlerdir. Kontrolde ise ortalama 20 adet çekirdek bulunmuştur. Çalışma toplam 223 ağaçta sürdürülmüş ve bu özellikler denemenin yapıldığı 4 yıl boyunca sabit kalmıştır. En uygun uygulama dozunun ise 4 ile 6 krad arasında olduğu belirlenmiştir.

Hearn (1984), Pineapple portakalı ile Duncan ve Foster altıntopu tohumlarına 10, 15, 20, 25 ve 30 Krad dozlarında gama ışını uygulamıştır. LD50 değerleri Pineapple için 10-15, Duncan için 15, Foster için 10 krad'dan düşük olmuştur. En yüksek duyarlılığa sahip olan Foster altıntopunun bu özelliğinin, uygulama sırasındaki yüksek nem içeriğinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmada az sayıda tohum içeren mutantların yanında tohumuz mutantlar da elde edilmiştir. En çok tohumuz mutant bireyler Pineapple ve Duncan'da kaydedilmiştir.

Tuzcu ve ark, (1988), Türkiye'de Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde gerçekleştirilen bir araştırmada; Fremont mandarini, Valencia portakalı, Redblush altıntopu, Kütdiken limonu ve Tuzcu 33-9 turuncunun aşı gözlerine Kobalt 60 kaynağı kullanılarak gama ışını uygulanması sonucunda en uygun LD dozlarını Fremont mandarini, Valencia portakalında 58 gray; Tuzcu 33-9 turuncunda 72 gray ve Kütdiken limonunda 78 gray olarak saptanmıştır. Araştırmada Fremont mandarininde çekirdeksizlik, Valencia portakalında daha geç olgunlaşma, Redblush altıntopunda daha koyu renklenme, Kütdiken limonunda ise uçkurutana dayanıklı bireylerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Nito ve ark (1989), Valencia ve Yoshida portakalları, Kalamondin, Yuzu ve Satsuma kalluslarına 1-50 Krad gama ışını uygulamışlardır. Bu uygulama kallus oluşumunu yavaşlatırken embriyo oluşumunu hızlandırmıştır. Çalışılan tür ve çeşitlerde en yüksek embriyo üretimi için optimum dozlar 5, 10, 20 ve 50 Krad olarak saptanmıştır.

Tang ve ark (1993), Hongjiangcheng mandarininde tohum sayısını azaltmak amacıyla, sürgünlere 8 Krad gama ışını uygulamışlardır. 2-6-2 ve 1-9-22 mutantlarında meyve başına 3'ten az çekirdek bulunmuş, bunlardan bazılarında hiç çekirdek bulunmamıştır. Ortalama meyve ağırlığı 122 gramın üzerinde, SÇKM oranı ise %13-13.5 olarak saptanmıştır.

Zhou ve ark (1995), Ruby Blood ve Xihuicheng portakalları ve Ponkan mandarinine değişik dozlarda ışın uygulamışlar ve mutantlar arasından polenleri kısır olan ve çekirdeksiz 22 adet portakal selekte etmişlerdir. Optimum ışın dozunu portakallarda 0.5, mandarinde 3 Krad olarak saptamışlardır.

Froneman ve ark (1996), gama ışınlarını kullanarak çekirdeksiz turuncgil çeşitleri elde etmek amacıyla çalışmışlardır. Şadok, mandarin ve göbekli portakallar yüksek ışın dozlarına hassastır. Bu nedenle aşı kalemleri 30'dan başlayarak 75 Gray'e kadar olan dozlarla gama ışınına tabi tutulmuştur. Valencia portakalı ve altıntop daha yüksek oranda çekirdeksizlik göstermiştir. 1988-1989'da ışınlanmış aşı kalemi aşılanmıştır. Bitkilerden 1991-1995 sezonu süresince 13 adet tohumuz tip bulunmuştur.

Russo (2004), İtalya-Taranto'da en çok yetiştirilen turuncgil çeşidi olma özelliğini taşıyan "Comune" klemantin mandarininden mutasyon sonucu "Fedele" ve "Grosso Puglia" tiplerini elde etmiş ve olgunlaşma dönemi boyunca, mutasyon sonucu oluşmuş bu iki genotipin Comune klemantin mandarininden olan morfolojik farklılıklarını belirlemiştir.

Qi ve ark (2008), Jincheng portakalında çekirdeksizlik oluşturmak için ⁶⁰Co kaynağını kullanarak 3000 R, 4000 R ve 5000 R dozlarını aşı gözlerine uygulamışlardır. Araştırmacılar M₁V₃ aşamasında çekirdeksizliğin stabil hale geldiğini ve çekirdeksizlik için en uygun dozun 4000 R olduğunu saptamışlardır.

Williams ve Roose (2008a), 10-20 çekirdek içeren W. Murcott mandarininde aşı gözüne 30-80 gray arasında değişen gama ışını uygulayarak yaptıkları mutasyon ıslahı çalışmasında, meyve başına 1 ya da daha az çekirdek içeren "Tango" çeşidini ıslah ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar Tango mandarininin Kaliforniya koşullarında ocak ayı ortasında olgunlaştığını ve nisan ayına kadar ağaç üzerinde kalitesini kaybetmeden kaldığını bildirmişlerdir.

Williams ve Roose (2008b), meyve başına ortalama 20-30 çekirdek içeren Daisy, Fairchild ve Kinnow mandarinlerinde, aşı gözüne gama ışını uygulamasıyla

meyve başına 2-3 çekirdek oluşturan Daisy SL, Fairchild SL ve Kinnow SL çeşitlerini ıslah ettiklerini bildirmişlerdir.

Uzun ve ark (2008), 1980’li yıllarda başlatılan limon ıslah programı kapsamında, seleksiyon, melezleme ve mutasyon ıslahı çalışmalarından elde edilen 12 adet uçkurutan (mal secco) hastalığına tolerant limon genotiplerinde meyve verim ve kalitesiyle birlikte ISSR markır sistemi kullanarak moleküler olarak akrabalık düzeylerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda ‘Finike yerli yuvarlak x Kütdiken’ melezlemesinden elde edilen Tuzcu 894 genotipinin çalışmada kontrol olarak kullanılan Kütdiken limonuna göre meyve verimi, iriliği, meyve suyu miktarı ve düşük tohum sayısı bakımından öne çıktığını bildirmişlerdir.

Khalil ve ark (2011), Kinnow mandarininde ortalama çekirdek sayısının 25 olduğunu ve bu çekirdek sayısını 20 Gy doz uygulaması ile ortalama olarak 5 adet/meyve olacak şekilde azalttıklarını bildirmişlerdir.

Martiz ve Montanola (2012), 2007 yılında çekirdeksiz yeni mandarin ve limon çeşitlerinin geliştirilmesi doğrultusunda Fransa ile işbirliğinde yeni bir ıslah programı başlattıklarını bildirmişlerdir. Araştırmada mutasyon uygulaması yoluyla ümitvar olarak belirlenen çekirdeksiz 164 limon ve 14 mandarin tipi selekte edilmiştir.

Handaji ve ark (2012), mutasyon ıslahı çalışmaları için mandarinlerde en uygun gama ışın dozunu saptadıkları çalışmalarında ‘Anana’, ‘Vietnam’ ve ‘Kara’ mandarin çeşitlerinin tohumlarına, aşı gözlerine ve fidanlarına 25 Gy, 30 Gy, 50 Gy, 70 Gy, 90 Gy dozlarında ⁶⁰Co kaynaklı akut gama ışını uygulamışlardır. Letal doz olarak bu mandarin çeşitlerinde 70 Gy dozunu önermişlerdir.

Kafa ve ark (2012), Nova ve Robinson mandarin çeşitlerinden mutasyon ıslahı yoluyla elde ettikleri popülasyon içerisinde Nova ve Robinson çeşitlerinden daha düşük sayıda tohum içeren bireylerin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Caruso ve ark (2016), Tarocco Meli, Moro M45, Sanguinello 49-5-5 portakal çeşitlerine ve Avana apireno mandarin çeşidine 40 Gy dozunda gama ışını uygulaması sonucunda yaklaşık 2000 bitkilik bir popülasyon elde etmişlerdir.

Bireylerin değerlendirmeleri yeni kan portakalı ve çekirdeksiz yeni mandarin çeşitlerinin geliştirilmesi amaçları doğrultusunda sürdürülmektedir.

Handaji ve ark (2016), gama ışın uygulamasının Marisol Klemantin çeşidinde meyve kalite kriterlerindeki değişimlere etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar ışın uygulaması yoluyla elde ettikleri popülasyon içerisindeki 30M57, 30M67, 50M51, 50M87, 50M91 ve 50M89 kodlu bireylerin çekirdeksiz olduğunu ve meyve çapının Marisol çeşidine kıyasla arttığını bildirmişlerdir.

Huang ve ark (2017), Çin’de meyve şekli, pembe meyve eti, düşük asitlik gibi özelliklerinden dolayı tüketiciler tarafından tercih edilen ancak meyve başına ortalama 20 adet tohum oluşturma sebebiyle üretimi sınırlı olan “Meiguicheng” portakalında mutasyon uygulaması yaptıklarını bildirmişlerdir. “Meiguicheng” portakal çeşidinin aşırı gözü kalemlerine ⁶⁰Co kaynaklı 50 gray akut gama ışını uygulaması sonucu çeşidin ticari çekirdeksiz mutant bireyini elde etmişlerdir.

2.1.2. Turunçgillerde Ploidi Islahı ile Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde ve dünyada turunçgil sektörünün hedeflediği temel noktalardan biri ihracata uygun çeşitlerin geliştirilmesidir. Turunçgil pazarlamasında meyve kalitesinde meyve iriliği, renk ve ŞÇKM/asit oranı yanında çekirdeksizlik önemli bir kalite unsurudur. Ülkemizde orta geç dönemde olgunlaşan kolay soyulabilen ve çekirdeksiz özelliğe sahip çeşitlere gereksinim vardır. Çekirdeksizlik turunçgil ihracatında özellikle mandarinlerde oldukça önemli olup seleksiyon ve klasik melezleme yöntemleriyle elde edilmesi zor olan bir özelliktir (Mohan Jain ve ark, 2000).

Triploid melez elde edilmesi, yeni çekirdeksiz çeşit geliştirmede önemli bir ıslah stratejisi haline gelmiştir (Ollitrault ve ark, 2008). Turunçgillerde triploid bitkiler iki diploid ebeveynin melezlenmesiyle (Esen ve Soost, 1971; Geraci ve ark, 1975; Luro ve ark, 2004) ya da diploid ve tetraploid ebeveynlerin melezlenmesi yoluyla elde edilebilmektedir (Esen ve Soost, 1971; Esen ve Soost 1977; Oiyama ve ark, 1981; Sarrantino ve Recupero, 1981). Önceki çalışmalar $4x \times 2x$

melezlemesinden triploid bitki elde etme etkinliğinin $2x \times 2x$ ve $2x \times 4x$ melezlemelerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Cameron ve Burnett, 1978; Esen ve ark, 1978; Navarro ve ark, 2002). Bunun en büyük sebebi melezlemelerde görülen endosperm oluşumundaki aksamalara bağlı embriyo aborsiyonudur (Esen ve Soost, 1977; Esen ve ark, 1978). Bu durum da $2x \times 4x$ melezlemelerinde embriyo kurtarma tekniklerinin kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Öte yandan apomiktik olmayan tetraploid ana ebeveynle diploid baba ebeveyn arasında yapılacak olan melezlemeden oluşacak tek bir zigotik embriyo *in vivo*'da çimlenmektedir (Cameron ve Burnett 1978; Navarro ve ark, 2002). Dolayısıyla apomiktik olmayan tetraploid bir ana ebeveynle yapılacak olan melezleme sonucu triploid ve zigotik olan embriyolar yani çekirdeksiz melez bitkiler elde edilmektedir. Böylece oluşacak olan popülasyonun tümü çekirdeksiz olacağından genotipler arasında seçim yapılacağı zaman çekirdeksizlik bir kriter olmaktan çıkacaktır.

Triplodi ile çekirdeksizlik elde etmek mümkündür. Farklı yöntemler kullanılarak triploid bitkilerin eldesi gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerden biri, iki diploid bitkinin melezlemesinden sonra elde edilen küçük tohumlarda embriyo kurtarma tekniği ile bitki elde edilmesine dayanmaktadır. Elde edilen bu bitkilerin flow sitometri yöntemi ile triploid olup olmadıkları incelenir. Diğer bir yöntem ise diploid kromozomlu bir birey ile tetraploid bir birey arasında yapılan melezlemelerle elde edilen triploidi yöntemidir. Turunçgillerde nuseller hücrelerde doğal olarak meydana gelen katlanmalar sonucunda $4n$ kromozomlu bitkiler elde edilir veya somatik hibridizasyon ile tetraploidi sağlanabilir. Tetraploidi, apomiktik olmayan hatlarda *in vitro* koşullarda sürgün uçlarına kolhisin uygulamasıyla da elde edilebilir (Navarro ve ark, 2012). Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal maddelerden biri kolhisindir. Bu madde güz çiğdeminin (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; renksiz, alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen; sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}NO_6$

olarak gösterilir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Koksal ve ark, 2002).

Wakana ve ark (2005), Yuzu, Kizu ve Hanayu turuncgil çeşitlerinde tetraploid bitki elde etmek için kolhisin uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar düşük oranda poliembryonik olan Yuzu ve Hanayu ile yüksek oranda poliembryoni özelliği gösteren Kizu çeşidinin bir yıllık ilkbahar sürgünlerinden süren 5 cm'lik sürgünlerine farklı kolhisin dozları ve süreleri uygulamışlardır. Kizu ve Hanayu çeşitlerine %0.05, %0.10, %0.20, %0.40 ve %0.80 kolhisin dozlarını 6 saat; Yuzu çeşidine %0.05, %0.10, %0.20 ve %0.40 dozlarını ise 4, 8, 12 ve 16 saat uygulamışlardır. Uygulama esnasında kolhisin çözeltisi dakikada 60 defa olacak şekilde çalkalanmıştır. Uygulama süreleri dolduktan sonra kolhisinli sürgünler iki defa sudan geçirilmiş ve 30 yaşlı Okitsu satsuma mandarini üzerine aşılanmıştır. Araştırmacılar Kizu 1-No:5 adını verdikleri tetraploid çeşitlerini de kontrol amaçlı olarak aşılamıştır. Bu çalışmanın sonucunda tetraploid bitkiler elde etmişlerdir. Elde edilen tetraploid bitkilerin çiçeklerinin büyük, meyvelerinin kalın kabuklu, iri eterik yağ kesecikli ve iri çekirdekli oldukları belirlenmiştir. Açık tozlanan tetraploid bitkilerden elde edilen iri tohumlar, orijinal diploid çeşitlerden gelen tohumlarla aynı oranda poliembryoni göstermiş ve bu tohumlardan elde edilen bitkilerin tetraploid oldukları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kolhisin uygulaması sonucunda çeşitlerin tetraploid formlarının başarılı bir şekilde elde edilebileceğini ve tetraploid bitkilerin kontrollü melezlemelerde kullanımının triploid bitki elde edilmesine olanak sağlayacağını bildirmişlerdir.

Yahata ve ark (2005), Banpeiyu şadok ve Ruby red melezlemesinden elde ettikleri haploid bitkilerin koltuk sürgünlerine %0.05, %0.10 ve %0.20 dozlarında 10 gün süreyle kolhisin uygulamışlardır. Pamuk kolhisin çözeltisine batırılmış ve koltuk sürgünlerinin üzerine konulan pamuk parafilmle sarılmıştır. Uygulamadan 2 ay sonra koltuk sürgünlerinden çıkan sürgünlerde kromozom sayımları flow

sitometri yöntemiyle belirlenmiştir. Analizler sonucunda X+2X yapıda çok sayıda sitokimera elde etmişlerdir. X+2X yapıdaki sürgünlerden aşı gözleri alarak üç yapraklı anacına aşılamışlardır. Elde edilen sürgünlerde tekrar flow sitometri analizi yaptıklarında dihaploid yapıda bitkiler elde etmişlerdir.

Saravat (2006), limonlarda tohum ve fidanlarda kolhisin uygulamasının katlama üzerine etkisini incelemiştir. Bu araştırmada iki deneme yürütülmüştür. Birinci denemede tohumlar, tohum kabuğu ile tohum kabuğu soyularak olmak üzere kontrol, %0.5, %1.0, %1.5 ve %2.0 kolhisin uygulamalarında 36 saat bekletilmiştir. Tohumların uygulamadan sonra çimlenme düzeyleri incelenmiş, tohum kabuğuyla uygulamanın başarısız olduğu ve çimlenmenin gerçekleşmediği, tohum kabuğunun soyulmasıyla en yüksek kontrolde olmak üzere tüm kolhisin uygulamalarında çimlenmenin gerçekleştiği gözlenmiştir. İkinci denemede ise 8 aylık fidanların sürgün uçlarına kontrol, %0.5, %1.0, %1.5 ve %2.0 kolhisin uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada %1 ve %2 kolhisin uygulamalarında 1'er bitkide katlamanın gerçekleştiği, ancak her iki bitkinin de mixoploid olduğu sonucuna ulaşılmıştır. %1.0 sürgün kolhisin uygulamasının diploid, triploid ve tetraploid bitkiler verirken, %2.0 uygulamasının diploid ve tetraploid bitkiler oluşturduğu saptanmıştır.

Lee ve ark (2008), Hassakku ve Shinamanatsu çeşitlerinde tetraploid bitki elde etmek için koltuk sürgünlerine 0.1 ml %0.05, %0.10, %0.50 ve %0.90 kolhisin uygulaması yapmışlardır. Yapılan ploidi analizinde tetraploid bitki eldesi için en başarılı uygulamaların %0.10 ve %0.50 olduğu saptanmıştır. Daha sonra tetraploid sürgünlerden alınan aşı gözleri üç yapraklı anacına aşılanmıştır. Uygulamadan 3 yıl sonra aşılarından elde edilen bitkiler çiçeklenmiştir. Hassakku ve Shinamanatsu çeşitlerinin tetraploid ve diploid bitkileri karşılaştırılmış, tetraploidlerin daha büyük stoma, anter ve çiçek tozlarına sahip oldukları tespit edilmiştir.

Taehyun ve ark (2016), Sangdojosaeng Satsuma mandarini ve Sagakashi mandarin çeşitlerinin tetraploid formlarını geliştirmek için çeşitlerin aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulamışlardır. Çalışmada çeşitlerin aşı gözü kalemlerini

%0.1'lik kolhisin çözeltisi içerisinde 30 dakika süresince bekleterek Yerli üç yapraklı anacı üzerine aşılamışlardır. Çalışma sonunda adı geçen çeşitlerden çok sayıda mixoploid ve az miktarda tetraploid bitkiler geliştirmişlerdir. Araştırmacılar çeşitlerden elde ettikleri diploid bitkilerin yapraklarında yapmış oldukları stomal gözlemlerde tetraploid bitkilerin stoma yoğunluğunun diploid bitkilere daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Ploidi ıslahı triploid bitki oluşturarak turunçgillerde çekirdeksiz meyve eldesi için kullanılabilecek bir yöntemdir. Triploid bitki eldesi için $4x \times 2x$ melezlemeleri; $2x \times 2x$ ve $4x \times 4x$ melezlemesine göre çok daha etkindir. Bunun nedeni, ağaç kavunu, şadok, klemantin ve bazı melez mandarin çeşitleri dışında kalan tüm turunçgil çeşitlerinin apomiktik özellik göstermesidir. Apomiktik özellik gösteren çeşitlerde nuseller embriyoların kromozom sayılarının katlanması sıklıkla görülen bir durumdur. Bu nedenle apomiktik olmayan çeşitlerin yapay yollarla kromozom katsayılarının katlanması böylece triploid bitki eldesinde kullanılması gerekmektedir (Aleza ve ark, 2009). Turunçgillerde triploidi ile çekirdeksiz meyve ıslahı gerçekleştirilmiştir (Aleza ve ark, 2010). $2n$ kromozomlu asitsiz şadok ile $4n$ kromozomlu çekirdekli Marsh altıntopunun melezlenmesiyle triploid Oroblanco ve triploid Melogold altıntop çeşitleri geliştirilmiştir. (Soost ve Cameron, 1980; Soost ve Cameron, 1985). Japonya'da triploid turunçgil çeşitleri elde etmek amacı ile Satsuma mandarini ile tetraploid Ponkan mandarinleri arasında melezlemeler yapılarak, embriyo kurtarma yöntemiyle triploid bitkiler elde edilmiştir (Kaneyoshi ve ark, 1997). Ayrıca Kaliforniya Üniversitesi tarafından $2n$ kromozomlu asitsiz şadok ve $4n$ kromozomlu Ruby kan portakalının melezlenmesiyle triploid Dawn (şadok-kan portakalı melezi) çeşidi elde edilmiştir (Williams, 2013).

Williams ve Roose (2004), diploid Temple tangor $\times$ tetraploid Dancy mandarininin melezinden elde edilen bireyi ana, diploid olan Encore mandarinini baba olarak kullanarak, tohumuz triploid mandarin melezi olan Shasta Gold, Tahoe Gold ve Yosemite Gold çeşitlerini geliştirmiş ve patentlerini almışlardır. Riverside koşullarında Tahoe Gold'un Ocak sonunda, Shasta Gold ve Yosemite

Gold'un ise Şubat ortası-sonuna doğru olgunlaştığını meyvelerinin iri, diğer çeşitlerle karışık dikilmelerine rağmen tohumuz, kabuk renklerinin koyu portakal renkli, yüksek şeker içerikli, meyvelerin ağaç üzerinde kalma süresinin uzun ve iyi depolanabilir özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Shasta Gold ve Yosemite Gold'un meyve şeklinin yassı, meyve kabuğunun koyu portakal renkli, kısmen sıkı, kabuğunun parlak-hafif pürüzlü, meyve eninin 75 mm, meyve boyunun 58-59 mm, indeksinin 0,78 ve tek meyve ağırlıklarının sırasıyla 185 g ve 175 g, usare miktarlarının ise % 49 ve % 42, meyve etinin çok koyu portakal renkli ve iyi bir tekstürüne sahip olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, Tahoe Gold'un meyvelerinin ise çok yassı ve küçük boyumlu, kabuk renginin çok kırmızı-turuncu, kabuğunun orta sıkı, parlak- hafif pürüzlü, meyve eninin 66 mm, meyve boyunun 56 mm, indeksinin 0.85 ve tek meyve ağırlığının 135 g, meyve suyu oranının % 48, çok koyu portakal renkli ve meyve et tekstürünü iyi kalitede bulduklarını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, üç çeşidin de orta boylu ağaçlar meydana getirdiğini ve dağınık büyüme eğiliminde olduklarını vurgulayan araştırmacılar Yosemite Gold'un az; Shasta Gold ve Tahoe Gold'un ise orta derecede dikenli bitkiler meydana getirdiğini; ayrıca, iyi verim verdiklerini ancak hepsinin periyodisite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Jaskani ve ark (2005), diploid Kinnow mandarin, Succari portakal ve Tatlı laym ile tetraploid Kinnow mandarin kullanarak triploid bitkiler üretmeye çalışmışlardır. Melez meyveler tozlamadan 12-14 hafta sonra toplanarak, elde edilen tohumlar *in vitro* koşullarda adenin sülfat içeren (20 mg/l) ve malt ekstrakt (500 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınmış ve maksimum çimlenme %75 oranında olmuştur. Çimlenen bitkicikler saksılara aktararak %59-89 oranında yaşama oranı sağlanmıştır.

Tacle ve Clara tangor çeşitleri triploid çeşitler olup diploid Monreal mandarini ile tetraploid Tarocco portakalı arasında gerçekleştirilen melezleme çalışmaları sonucu geliştirilmiş çeşitlerdir. Triploid olan Camel çeşidi ise diploid Klemantin mandarini ile tetraploid Avana mandarini melezlemesi sonucunda elde

edilmiştir. “Reale” çeşidi ise diploid Monreal mandarini ile tetraploid kamkat melezlemesi sonucunda geliştirilmiş triploid bir çeşittir (Reforgiato-Recupero ve ark, 2005).

Aleza ve ark (2010), İspanya’da 1996 yılından günümüze kadar melezleme, embriyo kurtarma ve flow sitometri ile ploidi analizine dayanan triploid ıslah programına başladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu projede amaçlarının yüksek kaliteli, geç dönemde olgunlaşan ve çekirdeksiz yeni mandarin çeşit ıslahı yapmak olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada diploid Fortune mandarini ile diploid Murcott tangor çeşitlerinin melezlemesinden 129 küçük tohum elde edilmiştir. Bu tohumlardan embriyo kurtarma tekniği ile 116 bitki elde etmişlerdir. Elde edilen bu 116 bitkinin flow sitometri ile kromozom durumları belirlenmiş, triploid olarak tespit edilen tüm bireyler Valencia-İspanya koşullarında Carrizo sitranjı üzerine aşılanmış, yapılan değerlendirmeler sonucunda “Garbi” adını verdikleri bir çeşit tescil edilmiştir. “Garbi” çeşidinin çekirdeksiz, mart ayı sonunda olgunlaşan, ancak şubat sonundan nisan ayı sonuna kadar hasat edilebilen özellikte olduğu belirlenmiştir.

Navarro ve ark (2012), İspanya’da 1996 yılından günümüze kadar yürüttükleri ıslah programlarının temel hedefinin çekirdeksiz, kolay soyulabilen ve yüksek kaliteli mandarin çeşit ıslahı olduğunu belirtmişlerdir. Çekirdeksizliği oluşturmak amacıyla triploidi yöntemini kullanmışlardır. Bu amaçla $2x \times 2x$; $2x \times 4x$; ve $4x \times 2x$ melezlemeleri yaptıklarını, bu melezlemelerden elde ettikleri tohumlarda embriyo kurtarmayla bitki elde ettiklerini ve sonrasında flow sitometri yöntemi ile triploid bireyleri belirlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar $2x \times 2x$ melezlemesinde 130 ebeveyn kullandıklarını ve bunun sonucunda 5500 triploid bitki; $2x \times 4x$ melezlemesinde 100 ebeveyn kullandıklarını ve bunun sonucunda 4300 triploid bitki ve $4x \times 2x$ melezlemesinde 103 ebeveyn kullandıklarını ve bundan da 5600 triploid bitki elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Froelicher ve ark (2012), Fransa-CIRAD araştırma istasyonunda yürüttükleri çalışmalarında turuncgillerde çekirdeksizlik için triploidi yöntemini

kullanmışlardır. Bu amaçla $2x \times 2x$; $2x \times 4x$; ve $4x \times 2x$ melezlemeleri yaptıklarını, bu melezlemelerden elde ettikleri tohumlarda embriyo kurtarma ve sonrasında flow sitometri yöntemi ile triploid bireyleri belirlediklerini bildirmişlerdir.

Froelicher ve ark (2016), çekirdeksiz çeşitlerin geliştirilmesine yönelik farklı ploidi seviyesindeki bitkilerin melezlenmesinden elde edilen popülasyonda triploid bireylerin seleksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar melezlemelerde kullanmak üzere tetraploidlerin geliştirilmesinde poliembriyoni gösteren çeşitlerden elde edilen tohumların çimlenmesiyle elde edilen bitkilerde ploidi seviyesini tarayarak doğal olarak gelişen tetraploid bitkilerin seçimi ve kolhisin uygulaması yöntemlerini kullanmışlardır. Elde ettikleri tetraploid bitkileri melezleme çalışmalarında kullanarak erken dönemde embriyo kurtarma ve flow sitometri yoluyla ploidi analizi yöntemleriyle çok sayıda triploid bitki geliştirmişlerdir.

2.2. Anaç Islahı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Turunçgillerde anaç ıslahı çalışmaları 1900'lü yılların başlarında, Florida'da meydana gelen donlar sonucu turunçgil bitkilerinin kaybedilmesiyle başlamıştır (Cooper ve ark, 1962). Turunçgillerin dünyada kaydettikleri hızlı gelişmede anaçların önemli katkıları olmuştur. Anaçların sahip oldukları değişik ve farklı özellikler nedeniyle yetiştiricilikte karşılaşılan sınırlayıcı ve engelleyici etmenlerin çözümlenmesinde çok çeşitli yararlar sağladıkları bir gerçektir (Yıldırım, 2003). Turunçgillerin cins, tür ve çeşit yönünden büyük zenginlikler göstermeleri ve bunların birçoğunun anaç olarak kullanılabilmelerine karşın, istenen özelliklerin hepsini kapsayan bir anaç yoktur.

Akdeniz Bölgesi turunçgiller yetiştiriciliği abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin tehdidi altındadır. Trizteza virüsünün ve bunun vektörü olan *Toxoptera citricida* zararlısının yayılması halinde tuzluluk ve kireçli topraklara yeterli toleransı gösteren turunç anacının kullanımı sınırlı hale gelecektir. (Ollitrault ve ark, 2006). Hâlihazırda dünya turunçgil üretiminin % 22' sinin

gerçekleştirildiği Akdeniz havzası hem turunç anacının kullanılması nedeniyle bu virüs hastalığının tehdidi altında ve hem de toprakların yüksek pH'lı olması sebebiyle meyve ağaçlarının %20-50 'si demir klorozu ile ilgili sıkıntı yaşamaktadır (Pestana ve ark, 2005). Turunç, üç yapraklı ve melezleri turunçgil yetiştiriciliğinde kullanılan başlıca anaçlardır. Bununla birlikte, Türkiye'de ağırlıklı olarak (%85) kullanılmakta olan anaç turunçtur (Yeşiloğlu, 2017). Turunç pH'sı yüksek olan topraklarımızda kullanılabilecek en iyi anaç olmakla birlikte, özellikle Tristeza hastalığına duyarlı olması nedeniyle, Türkiye turunçgil yetiştiriciliği büyük tehdit altındadır ve mutlaka alternatif anaç veya anaçların bulunması gerekmektedir.

Kontrollü melezleme çalışmaları turunçgil çeşit ve anaç ıslahı çalışmaları bakımından en sık başvurulmuş ve en eski yöntemlerden birisidir. 1800'lü yılların ortalarına kadar turunçgiller tohum yoluyla çoğaltılmışlardır. Turunçgil tarımında anaç kullanımının ilk kez 1842 yılında Azora Adaları'nda *Phytophthora* (kök boğazı çürüklüğü) hastalık etmenine karşı mücadele amacıyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Bu hastalığın özellikle portakallarda kayıplara yol açtığı fark edilmiştir. Daha sonra *Phytophthora* hastalığı Akdeniz ülkelerinde de yaygınlık kazanmıştır. *Phytophthora* hastalığının sporları çoğaltılarak dayanıklı anaç bulunmaya çalışılmış; turunç anacının diğerlerinden daha tolerant olduğu saptanmış ve turunç anacının kullanımı yaygınlık kazanmıştır (Castle, 1987). Daha sonra, çeşitlerin kapasiteleri kapsamında yüksek meyve kalitesi ve verime ulaşabilmeleri için ticari birçok turunçgil bahçesinde çeşitli anaç kalem kombinasyonları oluşturularak denenmiştir. Turunçgillerde anaç kullanımı uzun süren gençlik kısırlığı dönemini kısaltmakta ve yetiştiriciliğinin pek çok abiyotik ve biyotik stres koşullarında yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Turunçgillerde anaçların kullanımı ağacın bütün fizyolojisine etki ederek meyve verim ve kalitesi, meyve suyu kalitesi, bitki gelişimi ve abiyotik ve biyotik stres koşullarına dayanıklılık gibi pek çok faktörü etkilemektedir. Ayrıca meyve olgunlaşma

dönemi, meyvenin ağaç üzerinde beklemesi ve hasat sonrası muhafaza süresi de anaç kullanımından etkilenmektedir (Navarro ve ark, 1988).

Turunçgillerde tüm abiyotik ve biyotik stres koşullarının meydana getirdiği sorunları kontrol altına alabilecek ideal bir anaç bulunmamaktadır. Örneğin farklı toprak koşullarına adaptasyon kabiliyeti yüksek, kök çürüklüğüne, turunçgil mat solgunluğuna (Citrus Blight), kireçli topraklara, kısıtlı sulama koşullarına ve kısmi soğuklara tolerant olan turunç anacı (*Citrus aurantium* L.) turunçgil yetiştiriciliği yapılan birçok bahçede kullanılmıştır. Ancak turunç anacının CTV hastalığına duyarlı olması sebebiyle son yıllarda özellikle CTV'nin yayılış gösterdiği Amerika ve İspanya gibi önemli turunçgil üreticisi ülkelerde bu anacın kullanımını önemli ölçüde kısıtlamıştır (Yeşiloğlu, 2017). Diğer yandan Rangpur laymı (*Citrus limonia* Osbeck), Volkameriana (*Citrus volkameriana* V. Ten. Pasq.) ve kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.) kuraklığa belirli ölçüde dayanıklı ve üzerine aşılanan çeşidin meyve verimini arttıran anaçlar olmalarının yanında, turunç, Carrizo ve Troyer sitranjlarıyla karşılaştırıldığında, meyve kalitesine olumsuz etkisi olan, soğuklara duyarlı anaçlardır.

Çok eski yıllardan itibaren melezleme ıslahı çalışmaları ile yeni anaçlar elde edilmiştir. Bu konuda en önemli program Birleşmiş Milletler Tarım Teşkilatı (USDA) tarafından 1893 yılında Florida'da başlatılmıştır. Soğuklara dayanıklı yeni anaçlar elde etmek amacıyla yapılan çalışmalarda soğuklara dayanıklılık kaynağı olarak üç yapraklı anacı (*Poncirus*) melezlemelerde kullanılmış ve bazı *Poncirus* x *Citrus* melezlemelerinden günümüzde halen kullanılmakta olan anaçlar elde etmişlerdir. 1974 yılında USDA tarafından, 1907 yılında Swingle tarafından yapılan 'Duncan altıntopu x Üç yapraklı' melezleme kombinasyonundan elde edilmiş olan 'Swingle sitrumelo' anacı tescil edilmiş ve günümüzde hâlihazırda anaç olarak dünyanın belirli bölgelerinde kullanılmaktadır (Castle, 1987).

Florida'da devam edilen ıslah çalışmaları sırasında 1894-1895 yılında meydana gelen donlarda tüm melez bitkiler kaybedilmiştir. 1897 yılında soğuklara tolerant anaç bulmak ümidiyle *Poncirus trifoliata* ile Ruby portakalı arasında

yapılan melezlemeler sonucunda 54 sitranj elde edilmiştir. Troyer ve Carrizo sitranjları, Washington Navel ile *Poncirus trifoliata*'nın melezlenmesi ile elde edilmiştir (Cooper ve ark, 1962). Ayrıca 1940'lı yıllarda New South Wales, Avustralya'da başlatılan ıslah çalışmasında Ruby kan portakalı x *Poncirus trifoliata* melezlemesinden elde edilen popülasyondan Benton sitranjı elde edilmiş ve 1984 yılında sektöre kazandırılmıştır.

Ülkemizde ise anaç ıslahı çalışmaları Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nde başlatılmış, Alanya Dilimli portakalı ile Yerli üç yapraklı melezlemesi sonucunda Tuzcu M-2 sitranjı elde edilmiştir (Uzun, 2009).

Kaliforniya Üniversitesi tarafından 1987 yılında Ruby kan portakalı x Webber-Fawcett üç yapraklısı melezleme kombinasyonundan C-35 sitranjı geliştirilmiş ve bu sitranjin *Phytophthora* ve CTV'ye tolerant olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı ıslah programından C-32 sitranjı geliştirilmiş ancak düşük tohum verimi sebebiyle fidancılar tarafından kullanılmamıştır.

Forner ve ark (2003) Valensiya-İspanya'da yürüttükleri turuncgil anaç ıslah programı sonucunda iki yeni turuncgil anacı geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Forner-Alcaide 5 (F-A 5) ve Forner-Alcaide 13 (F-A 13) Kleopatra mandarini x Rubidoux üç yapraklısı melezleme kombinasyonundan elde edilmiş cinsler arası melezlerdir. Araştırmacılar her iki anacın da CTV'ye dayanıklı; tuzluluk, yüksek pH ve su baskını streslerine tolerant olduğunu bildirmişlerdir.

Bowman ve Rouse (2006) Amerika'da yürüttükleri anaç ıslah programı kapsamında Sunki mandarini x Benecke üç yapraklı melezleme kombinasyonundan elde edilen popülasyondan US-812 anacını geliştirdiklerini ve 2001 yılında tescil ettiklerini bildirmişlerdir. US-812 anacı CTV'ye toleranslı olmasının yanında meyve kalitesine olumlu etkisinden dolayı öne çıkmıştır. Ayrıca araştırmacılar US-812 anacı üzerine aşılı Valencia portakalının yüksek pH'lı koşullarda performansının yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Federici ve ark (2009), 2009 yılında Kaliforniya Üniversitesi-Riverside tarafından 'Bitters', 'Carpenter' ve 'Furr' isimli sırasıyla C22, C54 ve C57 kodlu üç yeni turuncğil anacının Sunki mandarini x Swingle üç yapraklı melezleme kombinasyonu ile elde edilmiş popülasyondan seçilerek geliştirildiğini bildirmişlerdir. Bitters anacı, soğuklara ve CTV'ye tolerant, *Phytophthora parasitica*'ya orta tolerant ve kireçli topraklara yüksek toleransı olan bir anaçtır. Carpenter anacı, soğuklara orta tolerant, CTV'ye tolerant, turuncğil nematoduna tolerant ve kireçli topraklara orta tolerant olarak bildirilmiştir. Furr anacı ise don zararına, CTV'ye ve *Phytophthora parasitica*'ya tolerant ve kireçli topraklara orta tolerant olan bir anaçtır.

Çeşitler, türler ve hatta cinsler arası melezlemeler turuncğillerin genetik çeşitliliğini son derecede genişletmiştir. Melezleme alanındaki en olumlu gelişmeler mandarin ve anaç ıslahı yönüyle olmuştur. Troyer, Carrizo ve C-35 sitranjları; Swingle sitrumelo gibi anaçlar bu yöntemle elde edilen başarılı örneklerdir.

Klasik melezlemelerde özellikle poliembriyoniye eğilimi olan ana bitkilerde zigotik olan embriyoyu yakalayabilmek; ayrıca melezlemelerden sonra yaşama gücü zayıf olan tohumlar oluşturan ebeveynlerden melez bitkiler elde etmek için embriyo kurtarma çalışmaları yapılmaktadır. Scarano ve ark (2005) Uçkurutan hastalığına dayanıklı veya tolerant limon genotipleri elde etmek amacıyla yapılan ıslah çalışmalarında tozlanmadan 105 gün sonra embriyo kurtarma tekniği ile embriyolardan bitkicik elde etmiş ve elde edilen bitkilerin zigotik veya nüsellere olup olmadığı DNA analizleri ile test etmişlerdir. SSR ve AFLP tekniklerinin kullanıldığı çalışmada, SSR tekniğinin bu tür çalışmalar için daha uygun olduğu vurgulanmıştır.

Tan ve ark (2007) Satsuma mandarini (*Citrus unshiu* Marc) ve Red tangerininin (*C. reticulata* Blanco) ana olarak *Poncirus trifoliata* (L.) Raf'nın ise baba olarak kullanıldığı anaç ıslah programı gerçekleştirmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyolar; Satsuma mandarini x üç yapraklı melezlerinde tozlanmadan 80, 85, 90

gün sonra, Red Tangerin x üç yapraklı melezlerinden ise 80 ve 85 gün sonra MG1 ortamında kültüre alınmıştır. Sonuçlar, embriyo kurtarma için tam çiçeklenmeden sonra 80. günün en uygun zaman olduğunu ortaya koymuştur. Bu dönemde embriyolar yüksek çimlenme oranına sahip olmuştur. Satsuma x üç yapraklı melezlerinden 85 birey ve Red tangerin x üç yapraklı melezlerinden 340 birey elde etmişlerdir. Satsuma x üç yapraklı melezlerinden 44 melez birey ve Red tangerin x üç yapraklı melezlerinden 111 melez bireyin morfolojik karakterizasyon ve SSR analizleri ile nüseller olmadığı, melez birey olduğu tespit edilmiştir.

Türler arası ve cinsler arası melezlemeler türler ve cinsler arasındaki genetik karakterlerin aktarılmasıyla elde edilecek yeni türlerin oluşturulmasında önemlidir. Ancak klasik ıslah yöntemleriyle eşeysel uyumsuzlukları olan bireylerden yaşayabilen melezler elde etmek oldukça güçtür. Somatik melezleme yoluyla somatik hücrelerin füzyonu ile bu uyumsuzluk sorunu giderilebilmektedir. Klasik melezlemeden farklı olarak somatik melezlemede her iki bireyin çekirdek ve stoplazmik DNA'sı aynı birey üzerinde toplanmaktadır. Somatik melezleme turunçgil ıslah programlarında önemi giderek artan bir teknik durumuna gelmiştir. Bu teknik biyotik ve abiyotik strese tolerant ya da dayanıklı anaç ıslahı programlarında kullanılabilmektedir (Ollitrault ve ark, 1994). Stress koşullarına turunçgil anaçlarının dayanıklılık tepkileri farklıdır. Farklı stress koşullarına dayanıklı bazı uzak genotipler arasındaki uyumsuzluklar klasik melezleme yönteminin kullanımını kısıtlamaktadır (Nito ve Akihama, 1990).

Somatik melezleme tekniği tüm bu farklı problemlere cevap olabilecek durumda görülmektedir. Ohgawara ve ark (1985), yaptıkları çalışmada üç yapraklı yaprak protoplastları ile portakalın embriyogenik protoplastlarının füzyonu sonucunda ilk cinsler arası somatik melezleri elde etmişlerdir. Daha sonra çok sayıda türler arası ve cinsler arası melezler elde edilmiştir. Bu çalışmalar ile gametik kısırlıkların üstesinden gelinmesi ve uyumsuz genotiplerin melezlenebilmesinin olanaklı hale getirildiği bildirilmiştir (Gmitter ve ark, 1992).

Bu konuda aşağıda da görüleceği üzere birçok çalışma yapılmış ve bazı sonuçlar elde edilmiştir:

Grosser ve ark (1988a), Hamlin portakalının embriyogenik süspansiyon kültürü ile Flying Dragon'un yaprak protoplastlarını kullanarak protoplast füzyonu yapmış ve 300'den fazla bitkinin rejenerasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Rejenerasyonu yapılan bitkilerin tetraploid oldukları saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, Hamlin portakalının embriyogenik süspansiyon kültürü ile *Severinia disticha*'nın epikotil kaynaklı kalluslarını kullanarak uyuşmayan genotipler arasında protoplast füzyonu yöntemi ile ilk somatik melez bitkilerin elde edildiğini bildirmişlerdir (Grosser ve ark, 1988b).

Kobayashi ve Ohgawara (1988), Trovita portakalının embriyogenik süspansiyon kültürü ile Troyer sitanjının yaprak protoplastlarını kullanarak protoplast füzyonu yapmış ve rejenerasyonu yapılan bitkilerin tetraploid olduklarını saptamışlardır.

Grosser ve Gmitter (1990), Hamlin portakalının embriyogenik kallusları ile *Citropsis gilletiana*'nın yaprak protoplastlarını kullanarak protoplast füzyonu yapmış ve 150'den fazla bitkinin rejenerasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Rejenerasyonu yapılan bitkilerin tetraploid oldukları saptanmıştır.

Louzada ve ark (1993), Hamlin portakalının (*Citrus sinensis* Osb.) embriyonik kallus hatları ile *Atalantia ceylanica*'nın yaprak protoplastlarını polyethylene glycol (PEG) yöntemi ile füzyona tabi tutmuşlar. İzoenzim analizleri ve kromozom sayımları sonucunda 5 adet cinsler arası allotetraploid somatik melez belirlemişlerdir.

Grosser ve ark (1994), PEG yöntemi ile yaptıkları protoplast füzyonu ile tetraploid somatik melezler elde etmişlerdir. Yapılan kombinasyonlar Kleopatra mandarin (*Citrus reshni*) + Arjantin üç yapraklısı (*Poncirus trifoliata* (L) Raf.), Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L) Osb.) + Arjantin üç yapraklısı (*Poncirus trifoliata* (L) Raf.), Turunç (*Citrus aurantium* L) + Flying Dragon (*Poncirus trifoliata*), Turunç (*Citrus aurantium* L) + Rangpur laymı (*Citrus limonia* Osb) ve

Milam limonu + Sun Chu Sha mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) dır. Rejenerasyonu yapılan somatik bitkilerin hepsinin tetraploid olduğu belirlenmiştir. Çoğaltımı yapılarak ticari anaç denemelerine alınmıştır.

Ollitrault ve ark (1994), Fransa’da yaptıkları çalışmalarda *Citrus reticulata* + *Fortunella japonica*’ dan ilk cinsler arası somatik melezlerini elde etmişlerdir. *Citrus reticulata*’nın embriyonik kallusları ile *Fortunella japonica*’nın yaprak protoplastlarının elektrofüzyonundan sonra yaklaşık 100 bitki regenere etmişlerdir. Değişik türler arası (*Citrus reticulata* + *Citrus sinensis*; *Citrus reticulata* + *Citrus paradisi*; *Citrus reticulata* + *Citrus limon*; *Citrus reticulata* + *Citrus aurantifolia*) ve cinsler arası (*Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata* ve *Citrus aurantium* + *Eremocitrus glauca*) kombinasyonları yapılmış ve embriyolar elde edilmiştir. Flow sitometri analizleri ile ploidi düzeyleri belirlenmiştir. Bu melezlerin anaç ve çeşit ıslahı programlarında kullanılabileceği ve bu konuda önemli fikirler verebileceği belirtilmiştir.

Tuzcu ve ark (1997), somatik melezleme uygulamalarının turunçgillerde yeni çeşit ve anaçların elde edilmesine yönelik çalışmalarda yeni ve modern bir teknik olduğunu bildirmektedirler. Yeni anaçların elde edilmesine yönelik olarak başlatılan çalışmalarında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Turunçgiller koleksiyonunda yer alan değerli genotiplerin yeni anaçların elde edilmesine yönelik çalışmalarda kullanılacağını bildirmektedirler.

Grosser ve ark (1998), Florida’da yaptıkları çalışmada hastalıklar, nematodlar ve zararlılara dayanıklılığı ve ticari anaç potansiyelini değerlendirmek için somatik hibritler elde etmişlerdir. Portakal + limon melezi *Phytophthora*’ya dayanıklı bulunmuştur. Turunç + Rangpur laymı, Turunç + Volkameriana ve Turunç + Carrizo sitranjı Tristeza virüs hastalığına dayanıklı bulunmuştur. *Fortunella*, *Citropsis*, *Atalantia*, *Microcitrus* ve *Citrus ichangensis* melezleri *Radopholus citrophilus*’a önemli derecede dayanıklı bulunmuştur. Flying Dragon ile yapılan somatik melezlemelerde aşırı bodur ve erken meyveye yatan bireyler

elde edilmiştir. Fakat Kleopatra mandarini + Swingle sitrumelo ve Turunç + Rangpur laymı melezleri de bodurlaştırıcı potansiyel göstermiştir.

Ollitrault ve ark (1998), Fransa’da yapmış oldukları çalışmalarında ovül ve tohum kültüründen anaç ıslahında kullanmak için 17 kallus hattı elde etmişlerdir. Elektrofüzyon yöntemi ile yapılan füzyon işleminden sonra rejenerasyonu yapılan bitkiciklerden somatik melez olanlar seçilmiştir. Somatik melezleme *Poncirus trifoliata* + *Citrus deliciosa* arasında yapılmış ve melezlerden kuvvetli ve Tristezaya dayanıklılıkta ümitvar olanlar belirlenmiştir. Flow sitometri analizleri ile ploidi düzeylerini belirlemişlerdir. *Citrus deliciosa*’nın kireç gibi abiyotik strese tolerans olma özelliği ile *Poncirus trifoliata*’nın biyotik strese tolerans olma özellikleri füzyon edilerek *Poncirus trifoliata* + *Citrus deliciosa* arasında ümitvar cinsler arası somatik melezler elde etmişlerdir.

Grosser ve ark (2000)’nın yaptıkları çalışmada, *Citrus* + *Severinia*, *Citrus* + *Citropsis*, *Citrus* + *Fortunella crassifolia* somatik melezleri üzerine aşılı çeşitlerin performansı zayıf bulunurken, Şeker portakalı + *Atalantia ceylanica* ve Nova + *Citropsis gilletiana* melezleri üzerine aşılı çeşitlerin iyi performansları ümit verici bulunmuştur. Turunç + Carrizo sitranjı ve Kleopatra mandarini + Arjantin üç yapraklısı melezleri ticari dikimler için ümitvar; Turunç + Flying dragon ve Kleopatra mandarini + Flying dragon melezleride bodurlaştırıcı özelliği bakımından önemli melezler olarak belirtilmiştir.

Ollitrault ve ark (2000), turunç anacına alternatif CTV’ye, kuraklığa, yüksek pH’ya, tuzluluk, *Phytophthora* ve nematod gibi abiyotik ve biyotik stres koşullarına tolerant anaç elde etmek için somatik melezlemeler yapmışlardır. Bu amaçla Yerli mandarin + *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* + Carrizo sitranjı, Meksika laymı + *Triphasia* üç yapraklı ve Meksika laymı + Carrizo sitranjı kombinasyonlarında somatik melezlemeler yapmışlardır. Yerli mandarin + *Poncirus trifoliata* protoplast füzyonundan allotetraploid olan FlhorAG1 elde edilmiştir. Daha sonra bu anaçla ilgili yapılan çalışmalarda FlhorAG1 meyvelerinin

15'den fazla tohum içerdiği ve yüksek miktarda polyembriyoni gösterdiği bildirilmiştir (Mouhaya ve ark, 2010).

Calixto ve ark (2004) *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ve *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Hamlin+Indian Red ve Hamlin+Singapura) arasında somatik hibridizasyon ile Tristeza virüsü ve *Phytophthora* hastalığına tolerant anaçlar elde etmişlerdir. Morfolojik gözlemler, kromozom sayımları ve moleküler analizleri gerçekleştirmişlerdir.

Chen ve ark (2004), Hamlin portakalı + Kaba limon ve Key laymı + Valencia portakalı melezlemesi sonucu elde edilen allotetraploid somatik melezlerin kromozom davranışları bakımından incelemişler ve diploid ebeveynleri ile karşılaştırmışlardır. Bu bireylerin özellikle çekirdeksizlik ıslahında kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Viloria ve ark, (2005) yapmış oldukları çalışmada yedi limon çeşidi (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), 'Key' lime (*C. aurantifolia* (Cristm.) Swing), Palestine sweet lime (*C. imettoides* Tan.), 'Lakeland' limequat (*C. aurantifolia* x *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing.) ve 'Etrog' ağaç kavunu (*C. medica* L.) ile dört allotetraploid somatik hibrid ('Key' lime + 'Valencia' portakalı 'Hamlin' portakalı + 'Femminello' limon, 'Valencia' portakalı + Kaba limon ve 'Valencia' portakalı + 'Femminello' limon) kullanarak çekirdeksiz triploid meyve elde etmek için klasik melezleme ve somatik hibridizasyon tekniklerini uygulamışlardır. Triploid bireylerden *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma tekniğini kullanarak embriyo aborsiyonunu önlemişlerdir. Embriyoların çimlenmesi için iki farklı kültür ortamı (EME ve Gamborg's B5), ve iki sukroz konsantrasyonu denemişlerdir. Tüm ortamlar Malt Ekstrakt ve GA₃ içermiştir. Embriyo çimlenmesinde genotip ve besi ortamı etkili olmuş, Gamborg B5 ortamında % 89.82 oranında embriyo çimlenmesi gözlenmiştir. Çimlenen embriyoların %11-65'i bitkiye dönüşmüştür.

Guo ve ark (2006) çalışmalarında Page tanjelo'nun (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus paradisi* Macf.) embriyonik kallusları ile kaba limonun (*Citrus jambhiri* Lush) yaprak protoplastlarının elektrofüzyon yöntemiyle

melezlenmesinden 150'den fazla bitki elde etmişlerdir. Bu bitkilerin % 78'nin tetraploid, % 22'nin diploid oldukları saptanmıştır. Araştırmacılar 6 tetraploid ve 2 diploid olmak üzere 8 bitki seçmişlerdir. Seçilen 6 tetraploid bitkinin somatik melez oldukları yapılan Flow sitometri, SSR (Simple Sequence Repeat), RFLP teknikleri ile belirlenmiştir.

Ollitrault ve ark (2006), Fransa'da yapmış oldukları çalışmada elektrofüzyon yöntemi ile 11 adet türler arası ve cinsler arası kombinasyon elde etmişlerdir. Embriyo ve bitki rejenerasyonu yapıldıktan sonra flow sitometri ve moleküler markör analizleri ile allotetraploid melezler seçmişler ve daha sonra bu melezleri biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanımlarının değerlendirilmesi ve anaç özelliklerinin incelenmesi bakımından çoğaltım aşamasına almışlardır.

Pio ve ark (2006), çalışmalarında farklı somatik melez bitkilerin köklenme kapasitelerini incelemişlerdir. Caipira portakalı + Kleopatra mandarin, Caipira portakalı + Volkameriana, Rangpur laymı + Sunki mandarin, Rohde Red Valencia + Volkameriana somatik hibritlerin çok fazla kök oluşumu gösterdiğini bildirilmişlerdir. Caipira portakalı + Volkameriana ve Rohde Red Valencia + Volkameriana melezleri en iyi gelişmeyi gösterdikleri saptanmıştır.

Grosser ve ark (2007), Florida'da yapmış oldukları çalışmalarında sting nematoduna (*Belonolaimus longicaudatus* Rau) dayanıklı turunca alternatif anaç elde etmek amacıyla seçilmiş mandarin + şadok melezleme kombinasyonları üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada seçilmiş mandarinlerin embriyogenik süspansiyon kültürü ve tolerant/dayanıklı şadokların yaprak protoplastları kullanılarak Amblycarpa mandarin + Liang Ping Yau şadok SN7, Amblycarpa mandarin + Hirado Buntan Pink şadok SN3, Murcoot tangor + Şadok SN3 ve Shekwasha mandarin + Şadok SN3 somatik melezlemeleri yapılmıştır. Elde edilen bireyler flow sitometri analizleri ile test edilmiş ve 4 yeni somatik hibrit belirlenmiştir. Bu bireyler bahçe performansları ve nematoda dayanımları test edilmek üzere incelemeye alınmıştır. Bu potansiyel melezlerin poliploidi

durumundan dolayı ağaç büyüklüğünü kontrol altına alabileceği de ileri sürülmüştür.

Guo ve ark (2007), Red tangerin (*Citrus reticulata* Blanco)'nın embriyogenik kallus protoplastları ile Çin'nin yerli sitranjının (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)'nın yaprak protoplastları elektrofüzyon yöntemi ile birleştirilerek tetraploid anaç elde etmeyi amaçlamışlardır. Melezleme sonucunda 12 bitki elde edilerek köklendirildiği ve sera koşullarına transfer edildiği bildirilmiştir. Flow sitometri analizleri ile bu melez bireylerin tetraploid oldukları saptanmıştır. Sitolojik ve moleküler markör analizleri ile de bu melezlerin doğruluğu test edilmiş ve anaç olarak performanslarının değerlendirilmesi aşamasına geçildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Mourão Filho ve ark (2008), araştırmacılar Brezilya'da yürüttükleri çalışmada, Caipira portakalı + Rangpur laymı, Caipira portakalı + Kleopatra mandarini, Caipira portakalı + Volkameriana, Caipira portakalı + Kaba limon, Kleopatra mandarini + Volkameriana, Kleopatra mandarini + turunç, Rangpur laymı + Sunki mandarini, Ruby kan portakalı + Volkameriana, Rohde Red Valencia portakalı + Volkameriana ve Valencia portakalı + *Fortunella obovata* kombinasyonlarından elde edilmiş, ümitvar anaç olabilecek somatik melezlerin gövde ve kök infeksiyonlarıyla *Phytophthora nicotianae* ve Tristeza'ya (CTV) reaksiyonlarını incelemişlerdir. *Phytophthora nicotianae*'nin kök ve gövde infeksiyonu denemeleri için 9 aylık yarı odunsu çeliklerden elde edilen somatik bitkilerde değerlendirilme yapılmış ve diploid bitkiler ile karşılaştırılmıştır. Kleopatra mandarini + turunç, Rangpur laymı + Sunki mandarini, Kleopatra mandarini + Volkameriana, Ruby kan portakalı + Volkameriana, Rohde Red Valencia portakalı + Volkameriana ve Caipira portakalı + Volkameriana daha az düzeyde gövde infeksiyonuna sahip olurken, Kleopatra mandarini + Volkameriana, Kleopatra mandarini + turunç, Caipira portakalı + Volkameriana ve Caipira portakalı + Rangpur laymı kök infeksiyonuna tolerant bulunmuştur. Tristeza testlemelerinde ise, Kleopatra mandarini + turunç ve Valencia portakalı +

Fortunella obovata kombinasyonları duyarlı, diğerleri dayanıklı olarak belirlenmiştir.

Saleh ve ark (2008), turunçgil ağaçlarının tuz gibi birkaç abiyotik stres koşullarına maruz kaldığını ve daha tolerant yeni anaçların geliştirilmesine gereksinim olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarında üç tetraploid anaç genotipinin tuz stresine toleranslarını diploid anaçlarla (Üç yapraklı, Carrizo sitranjı, Kleopatra mandarini) karşılaştırmalı değerlendirmişler ve bitki büyümesi, yaprak dökülmesi ve iyon içeriğini incelenmişlerdir. Denemenin sonunda kloroz simptomları diploid Üç yapraklı ve Carrizo sitranjı bitkilerinde, yaprak dökümleri sadece diploid Üç yapraklı bitkilerinde gözlemlenmiştir. Diploid Kleopatra mandarini bitkilerinin büyüme hızı tuzdan etkilenmemiş, hatta tetraploid Kleopatra mandarininde artmıştır. Diploid bitkiler ile karşılaştırıldığında, tetraploid bitkilerde yapraklarda klor iyonu birikimi düşük düzeyde bulunmuştur. Sonuç olarak tetraploid anaçların tuza diploid anaçlardan daha tolerant oldukları belirlenmiştir.

Cai ve ark (2009), Çin’de yaptıkları çalışmada elektrofüzyon yöntemi ile G1 (*Citrus unshiu* Marc.) + Page tanjelo ve G1 + Nova mandarini arasında somatik melezleme yapmışlardır. Her iki füzyondan elde edilen bitkilerde SSR, CAPS ve kloroplast-SSR analizleri ile genetik yapıları belirlenmiştir. G1 + Nova mandarini melezlemesinden elde edilen tetraploid bitkileri somatik melez olarak tanımlanmıştır. Bu bireylerin turunçgil çekirdeksizlik ıslahında büyük bir potansiyele sahip olduklarını bildirmiştir.

Dambier ve ark (2011), yeni turunçgil anaçlarının geliştirilmesi bakımından somatik melezlemenin önemli bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Somatik melezleme tekniğinde kullanılan ebeveynlerin tüm baskın karakterleri elde edilen somatik bireylere aktarılmakta ve böylece elde edilen bireylerde istenilen karakterlerin bir arada bulunmasına olanak sağlamaktadır. Araştırmacılar Yafa portakalı + Pomeroy, Kleopatra mandarini + Pomeroy, Yafa portakalı + C35 sitranjı, Kleopatra mandarini + C35 sitranjı, Yerli mandarin + C35 sitranjı, Yafa portakalı + 4475 sitrumelo, Yerli mandarin + 4475 sitrumelo, Yerli mandarin +

citrandarın somatik melezlemelerinden çok sayıda allotetraploid melezler elde etmişlerdir.

Grosser ve Gmitter (2011), hem ototetraploidlerin hem de allotetraploid somatik melez anaçlarının üzerine aşılardan diploid çeşidin bitki boyunu kontrol altına aldığını bildirmişlerdir.

Grosser ve ark (2015), özellikle Florida turuncgil yetiştiriciliğine yönelik sorunları çözmek amacıyla diploid anaçlarla somatik melezleme yoluyla elde edilmiş tetraploid anaçları sık dikim, hastalıklara tolerans ve çeşide erkencilik sağlama kriterleri bakımından karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar ayrıca allotetraploid somatik melezler arasında klasik melezleme çalışmalarına başlamışlardır. Araştırmacılar somatik melezleri, diploid melezleri ve ticari anaçları Valquarius ve Vernia portakal çeşitlerine anaç olarak kullanarak arazi çalışmalarına başladıklarını ve gözlemlerin sürdüğünü bildirmişlerdir.

Pensabene-Bellavia ve ark (2015), İspanya'da yürütmüş oldukları çalışmada Carrizo sitranjı + Alemow somatik melezleme kombinasyonu ile elde edilen somatik melezlerde kromozom kararsızlık mekanizmasını belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmacılar Alemow'dan elde edilen embriyojenik kallus hatlarından izole edilen protoplastlarla Carrizo sitranjı yapraklarından elde edilen protoplastlarda kimyasal ve elektrofüzyon yoluyla somatik melezlemeler gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada elde edilen somatik melezlerde yapılan flow sitometri yoluyla ploidi analizi sonuçlarına göre tetraploid (4x), pentaploid (5x), heptaploid (7x) ve mixoploid (3x+6x) bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Oustric ve ark (2018), allotetraploid somatik melez FlhorAG1 ile diploid Yerli mandarin, tetraploid Yerli mandarin, diploid Pomeroy üç yapraklı ve tetraploid Pomeroy üç yapraklı genotiplerini soğuk ve ışık stresi koşulları altında karşılaştırmışlardır. Araştırma sonucunda FlhorAG1 soğuk ve ışık stresi koşullarında incelenen diğer genotiplere kıyasla daha tolerant olduğu bildirerek bu durumun allotetraploid FlhorAG1 genotipinin daha etkili bir antioksidant sisteme sahip olmasından ve SOD ve APX stres enzimlerini stres koşullarında diğer

genotiplere göre daha etkin bir şekilde kullanmasından ileri geldiğini açıklamışlardır.

Ruiz ve ark (2018), *C. macrophylla* + Carrizo sitranjı somatik melezleme kombinasyonundan elde ettikleri iki adet somatik melez bireyi demir klorozu, tuz stresi ve CTV hastalığına karşı tolerans bakımından incelemişlerdir. Araştırmacılar bireylerde CTV toleransının varlığını bildirmişler ve somatik melezlemeyle elde ettikleri bu bireylerin Akdeniz bölgesi gibi CTV'nin bulunduğu kireçli ve tuzlu topraklarda kullanımının yetiştiricilik açısından ümitvar olduğunu bildirmişlerdir.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tez çalışmasında bitkisel materyal olarak mutasyon ve ploidi ıslahıyla çeşit popülasyonlarının oluşturulmasında portakal ve mandarin türleri, klasik ve somatik melezleme ıslahıyla anaç popülasyonlarının oluşturulmasında ise anaç değeri olan önemli bazı turunçgil gen kaynakları yer almıştır. Çalışma kapsamında yer alan gama ışını uygulaması, ploidi ıslahına yönelik kolhisin uygulamaları, klasik ve somatik anaç melezlemelerinde kullanılan genotiplerin isimleri ile ‘Türkiye Ulusal Turunçgil Gen Kaynakları’ Kodları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

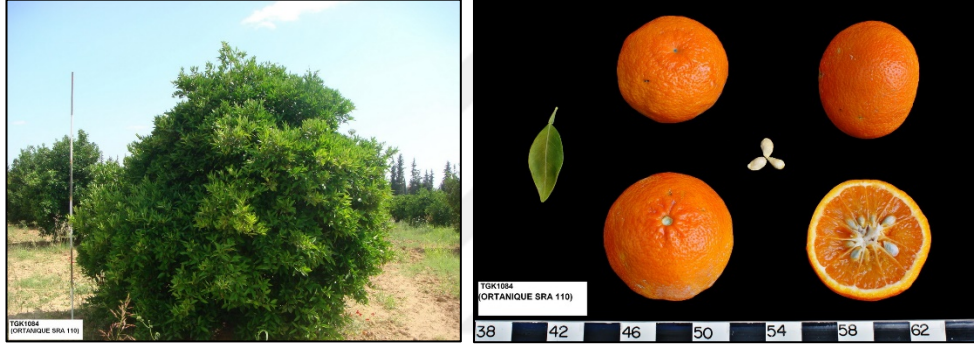
Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan genotipler

Ulusal Gen Kaynakları Kodu	Genotip Adı (Latincesi)
Gama ışını uygulaması	
TGK1084	Ortanique tangor (<i>Citrus reticulata</i> Blanco x <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)
TGK1371	Hernandina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)
Ploidi ıslahı	
TGK0859	Klemantin 22D mandarini (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)
TGK1272	Murcott mandarin (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)
TGK0678	Moro kan portakalı (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)
Klasik ve somatik anaç melezleme	
TGK0947	Antalya Kleopatra mandarini (<i>Citrus reshni</i> Tan.)
TGK0626	Rubidoux üç yapraklı (<i>Poncirus trifoliata</i> Raf. var. Rubidoux)
TGK0627	Carrizo sitranji (<i>Citrus sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>)
TGK0754	Pomeroy üç yapraklı (<i>Poncirus trifoliata</i> Raf. var. Pomeroy)
TGK0622	Yuzu [<i>Citrus junos</i> (Sieb. ex. Tan.)]
TGK0620	Macrophylla (Alemow) (<i>Citrus macrophylla</i> Wester)
TGK0623	Volkameriana (<i>Citrus volkameriana</i> V. Ten. Pasq)
TGK0702	Swingle sitrumelo (Sitrumelo 4475) (<i>Citrus paradisi</i> Macf. var. Duncan x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.)
TGK0694	Çin turuncu (<i>Citrus myrtifolia</i> Rafinesque)
TGK0950	Sunki mandarini (<i>Citrus sunki</i> (Hayata) hort. ex Tak.)
TGK1051	Gou Tou turuncu (<i>Citrus aurantium</i> L.)
TGK0633	Yerli üç yapraklı (<i>Poncirus trifoliata</i> L. var. Yerli)
TGK0700	Benecke üç yapraklı (<i>Poncirus trifoliata</i> L. var. Benecke)
TGK1048	Yerli mandarin (<i>Citrus deliciosa</i> Ten.)

3.1.1. Gama Işını Uygulamasında Kullanılan Mandarin Çeşitlerinin Özellikleri

3.1.1.1. Ortanique Tangor

Jamaika’da 1920 yılında bir şans çöğürü olarak bulunmuştur. Meyve kabuğu sarı portakal renkli ve hafif pürüzlüdür. Genel olarak mandarinlere göre oldukça iri ve yassı meyvelere sahiptir (Şekil 3.1). Orta geççi olması nedeniyle ticari anlamda değerli bir çeşittir. Kabuk kalın, derimsi, sıkı fakat soyulabilir özelliktedir. Meyve başına 10 adet tohumu sahiptir (Reuther ve ark., 1967).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan ‘Ortanique’ tangor çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri

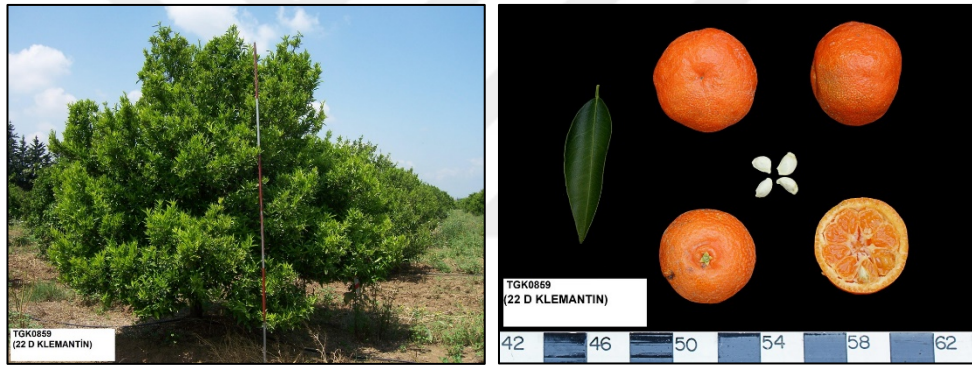
3.1.1.2. Hernandina Mandarin

Fina mandarininden 1966 yılında göz mutasyonu ile elde edilmiş bir Klemantin mandarinidir. Ağaç özellikleri Fina çeşidine oldukça benzerdir. Büyük ve verimli ağaçlar oluşturan bu çeşidin meyve kabuğu erken renklenmesine rağmen, meyve içi olgunlaşması kasım ayının sonuna doğru başlamaktadır. Normal koşullarda şubat ayı sonuna kadar ağaçta bekletilebilen bir çeşittir. İspanya’da en popüler çeşit olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır (Saunt, 2000).

3.1.2. Ploidi Islahında Kullanılan Mandarin Çeşitlerinin Özellikleri

3.1.2.1. Klemantin 22D Mandarinini

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülen bir seleksiyon çalışmasında Dalaman-Muğla yöresinden seleksiyonla elde edilmiş, Adana ekolojisinde oldukça verimli ve kaliteli olan bir klemantin tipidir. Meyve iriliği orta; meyve şekli ise hafif basık ile yuvarlak arasında değişim göstermektedir. Meyve kabuğu koyu portakal ile kırmızımsı portakal renginde, orta kalınlıkta, yüzeyi düzgün ve parlaktır (Şekil 3.2). Dilim sayısı 8-12 adettir. Meyve eti koyu portakal renginde ve suludur. Yabancı tozlanmaya bağlı olarak az veya orta sayıda tohuma sahiptir (İncesu, 2004).



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan 'Klemantin 22D' mandarin çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.2.2. W. Murcott Mandarinini

Yeni mandarin çeşitleri içerisinde olumlu özellikleriyle en çok göze çarpan bu çeşidin orijini Fas'tır. Murcot ve Klemantin mandarini hibriti olduğu tahmin edilmektedir. Ağaçları verimli ve erken meyveye yatmaktadır. Meyveleri Murcott'tan küçük Nova'dan büyük, orta büyüklüktedir (55-70 mm çapında). Meyve şekli basık, meyve kabuğu koyu portakal renkli ve hafif pürüzlü, oldukça incedir. Kolay soyulur. Şubat ortası veya sonunda olgunlaşır. Meyve şeker oranı %14 ve uygun asit seviyesiyle Klemantin ve Fortune kadar kalitelidir.

Tozlanmanın olmadığı koşullarda tohumusuzdur. Fas'ta yaklaşık 1.000 hektarlık bir alanda etkili olan bu çeşidin, ileride geçi mandarin pazarında önemli bir yere sahip olması kaçınılmazdır. Bu çeşit Fas'ta Nadorcott, Kaliforniya'da ise W. Murcott olarak da bilinmektedir. Kaliforniya'da "Delite" adıyla pazarlanmaktadır (UCR, 2018).

3.1.3. Ploidi Islahında Kullanılan Portakal Çeşidinin Özellikleri

3.1.3.1. Moro Kan Portakalı

Çok verimli bir çeşit olup, meyveleri ağaç üzerinde salkım şeklinde bulunmaktadır. Ağaç tacı büyük ve dağınıktır. Kan portakalları arasında değişik ekolojik koşullara en iyi uyum gösteren Moro, aynı zamanda en erkenci kan portakalı çeşididir. Meyveler aşırı derecede olgunlaşmamak kaydıyla taşımaya ve muhafazaya elverişlidir. Meyve şekli genelde yuvarlak hafif ovaldir (Şekil 3.3). Meyve kalitesi çok yüksek olan bu çeşidin meyve et rengi yetiştirme koşullarına bağlı olarak dalgalı pembeden koyu kırmızıya kadar değişim gösterir. En iyi renklenme sıcak iç bölgelerde gerçekleşmektedir. Meyveler ağacın dış kısmında salkımlar halinde olduğu için güzel ve dikkat çekici bir görüntü oluşturur (Saunt, 2000).



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan 'Moro' kan portakalı çeşidinin ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4. Klasik ve Somatik Anaç Melezlemelerinde Kullanılan Genotiplerin Özellikleri

3.1.4.1. Antalya Kleopatra Mandarin (Citrus reshni Tan.)

Kleopatra mandarin (Şekil 3.4) dünyada yaygın olarak kullanılan bir anaç değildir. Ancak son yıllarda anaç olarak kullanımını artıracak önemli özellikleri gözlemlenmiştir.

Genel olarak, Kleopatra mandarin üzerine aşıl原因an ağaçların taç yapısı büyük ve orta kuvvettedir. Üzerine aşıları çeşitler orta düzeyde verimli ve ağaçlar geç yaşta verime geçmektedir (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000). Florida'da portakal çeşitlerinden Hamlin için yaygın olarak kullanılan anaçlardan biridir. Ancak, diğer portakal çeşitlerinde özellikle de Valencia portakalında verim düşüklüğüne neden olmaktadır. Kleopatra üzerine aşıları altıntop çeşitlerinin meyve kalitesi çok yüksek olmakta ancak, ağaçlarda düşük verimlilik ve küçük meyve oluşumu meydana gelmektedir. İspanya'da Carrizo sitranjının anaç olarak kullanımı hızla artarken, Kleopatra mandarininin kullanımı azalmaya başlamıştır. Son yıllardaki yeni dikimlerin sadece %10'unda Kleopatra mandarin anaç olarak kullanılmıştır. Buna rağmen Kleopatra mandarin İspanya'da hala önemli anaçlardan biri durumundadır ve genellikle mandarin çeşitleri için anaç olarak kullanılmaktadır. İsrail'de de özellikle Valencia ve göbekli portakallarda yeni dikimlerin önemli bir yüzdesini Kleopatra mandarin oluşturmaktadır (Saunt, 2000). Meyve suyu kalitesi iyi ve SÇKM'si de orta düzeyde olmaktadır. Üzerine aşıları çeşitlerin meyve kabuğu pürüzsüz ve ince olmaktadır. Gelişme yavaş ve aynı yaştaki yerli turunç ve kaba limona oranla meyve verimi düşük düzeyde kalmaktadır. Bu anaç üzerindeki ağaçlar oldukça yavaş büyür ve özellikle nüseller kültür çeşitleri ile aşılandıklarında, geç meyveye yatarlar (Bitters, 1961; Hosein, 1969; Özcan ve Ulubelde, 1984; Saunt, 2000).

Kleopatra mandarininin en önemli avantajı ise temel bazı turunçgil virüs ve viroid hastalıklarına karşı diğer anaçlardan daha tolerant olmasıdır. Tristeza (Göçüren - CTV), Exocortis (Cüceleşme - CEV) ile Xyloporosis (Gözenekleşme)

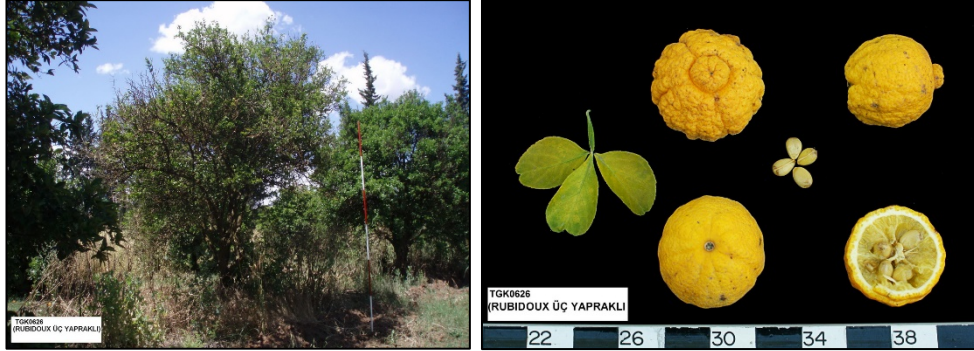
virüs ve viroid hastalıklarına karşı toleranslıdır. Nematodlara duyarlı, *Phytophthora citrophthora*'ya orta derecede duyarlıdır. Soğuklara dayanıklıdır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000). Kleopatra mandarini değişik toprak koşullarına kolayca uyum sağlayabilmektedir. Hafif tuzlu topraklardan ağır killi topraklara kadar oldukça geniş uyum yeteneğine sahiptir. Kumlu-ağır killi topraklarda iyi gelişmektedir. Yüksek tuzluluk ve pH'ya dayanıklıdır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan 'Antalya Kleopatra' mandarininin ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.2. Rubidoux üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* Raf.)

Üç yapraklı anacının küçük çiçekliler grubunda yer alan Rubidoux anacı genel olarak üç yapraklının özelliklerini göstermektedir (Şekil 3.5). Soğuklara dayanıklı, nüseller embriyoniye eğilimli olup, üzerindeki çeşidin erkenciliğine olumlu etkisi vardır. Ayrıca büyük çiçekli gruba göre meyve kalitesi, meyve iriliği ve bitkinin bodurluğu üzerine daha olumlu etkisi olduğu görülmüştür (Özcan ve Ulubelde, 1984; Ferguson ve Charappo, 2005). Tristezaya tolerans gösterir (Fang ve ark.,1998).



Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan ‘Rubidoux’ üç yapraklısının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.3. Carrizo sitranjı (*Poncirus trifoliata* Raf. x *Citrus sinensis* Osb. var “Carrizo”)

Önemli kayıplara yol açan 1894-1895 donlarından sonra üç yapraklının soğuklara dayanıklılık özelliğinden yararlanılarak yeni anaç elde edilmesi amaçlanmış ve Swingle tarafından 1897 yılında Washington Navel portakalı x Üç yapraklı melezlemesi ile Carrizo sitranjı elde edilmiştir (Davies ve Albrigo, 1994). Birçok nedenlerden dolayı portakal ve altıntoplar için anaç olarak çok yaygın şekilde kullanılmaktadır. Carrizo sitranjı meyveleri çekirdekli ve yüksek oranda nüseller embriyonu göstermektedir ve anaç olarak kullanmak için kolaylıkla çoğaltılabilmektedir. Tohumla çoğaltımı ve aşılama kolaydır. Üzerine aşılan ağaçlar kumlu, kumlu - tınlı topraklarda iyi gelişmektedir. Kireçli topraklarda zayıf gelişmektedir. Ancak, kireçli topraklara adaptasyon bakımından üç yapraklı anacından daha avantajlı görünmektedir (Davies ve Albrigo, 1994). Kaliforniya' da ve Akdeniz Ülkelerinde anaç olarak başarı ile kullanılmaktadır (Şekil 3.6). Troyer sitranjına göre daha hızlı gelişmekte ve meyve kalitesine daha olumlu etki yapmaktadır. Verimliliği yüksek, meyveye yatması erkendir. Kök nematoduna (*Radopholus similis* Cob.) toleranttır. Uçkurutana dayanıklıdır. Troyer sitranjına göre kuraklığa daha dayanıklıdır. (Tuzcu, 1978; Özcan ve Ulubelde, 1984; Castle, 1987). Exocortis (Cüceleşme - CEV) virüs hastalığına çok duyarlıdır. Ancak,

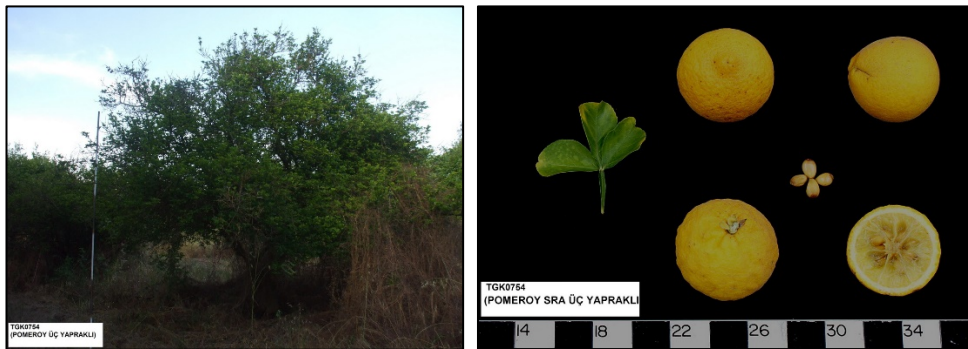
Tirsteza (Göçüren - CTV) virüs ve Xyloporosis (Gözenekleşme) virüs hastalığına dayanıklıdır. *Pytophthora citrophthora*'ya orta derecede duyarlıdır. Tristeza ve *Pytophthora citrophthora*'ya toleransları nedeniyle anaç olarak kullanımları yaygındır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan ‘Carrizo’ sitranjının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.4. Pomeroy üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* Raf.)

Poncirus trifoliata’dan selekte edilmiştir (Şekil 3.7). Turunçgil nematoduna oldukça tolerant bir anaçtır (Baines ve ark., 1969). Büyük çiçekliler grubuna girer ve soğuklara toleranttır (Ferguson ve ark., 1990). *Poncirus trifoliata* ve yakın akrabaları tristezaya toleranttır (Fang ve ark.,1998).



Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan ‘Pomeroy’ üç yapraklısının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.5. Yuzu [*Citrus junos* (Sieb. ex. Tan.)]

Soğuklara toleransının üç yapraklıya yakın olduğu bildirilmektedir. Uçkurutana ve kök boğazı çürüklüğüne, göçüren, cüceleşme ve kavlamaya hastalıklarına da toleranslıdır. Üzerindeki çeşidin meyve kalitesi portakal ve turunç anaçlarına oranla daha yüksektir. Genellikle aşı uyumsuzluğu problemi görülmemektedir (Şekil 3.8). Fidan döneminde büyümesi yavaştır ve üzerine aşıllı ağaçların meyveye yatması geç olur. Uzun ömürlüdür. Tuzluluğa özellikle Na'a duyarlıdır. Kurak koşullara, fakir ve kireçli topraklara çok iyi adapte olmaktadır (Alev, 1990).



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan 'Yuzu' anacının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.6. Volkameriana CRC1 (*Citrus volkameriana* V. Ten. Pasq)

Volkameriana anacının İtalya kökenli ve limon x turunç melezi olduğu öngörülmektedir. Çok yaygın olarak kullanılan bir anaç değildir ve gelecek yıllarda da yaygın kullanılan anaçlar içerisinde yer alamayacağı varsayılmaktadır. Kaba limona benzer şekilde farklı toprak koşullarına adaptasyon yeteneği yüksektir (Şekil 3.9). Ancak sıcak bölgelerde çok kuvvetli ve verimli ağaçlar oluşturmaktadır. Kireçli topraklarda iyi gelişme göstermektedir. Tuzluluğa toleransı zayıftır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000). İspanya'da yapılan çalışmalarda Volkameriana'nın demir alımında, yaygın olarak kullanılan turunçtan dahi daha etkin olduğu bulunmuştur (Wright, 1998). Tohumla çoğaltımı ve

aşılması kolay, büyümesi kuvvetli ve verime erken yatmaktadır. Meyve kalitesine etkileri özellikle ilk yıllarda iyi değildir. S.Ç.K.M./Asit oranını bir miktar azalttığı, granülasyona neden olabildiği buna karşın meyve iriliğini önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir. Volkameriana anacı nematodlara duyarlı olmasına rağmen, Cüceleşme (Exocortis - CEV), tristeza (göçüren) ve xyloporosis virüs ve viroid hastalıklarına toleranslıdır. Uçkurutan hastalığına (*Phoma tracheiphila*) ve *Phytophthora parasitica*'ya toleranttır (Castle, 1987). Düşük sıcaklıklara ve Kış dinlenme döneminde *Phytophthora citrophthora*'ya çok duyarlı bir anaçtır. Tüm turunçgil tür ve çeşitleri ile çok iyi uyumaktadır (Tuzcu, 1978; Tuzcu ve Göksedef, 1983; Özcan ve Ulubelde, 1984; Sakovich, 1986 ve Saunt, 2000).

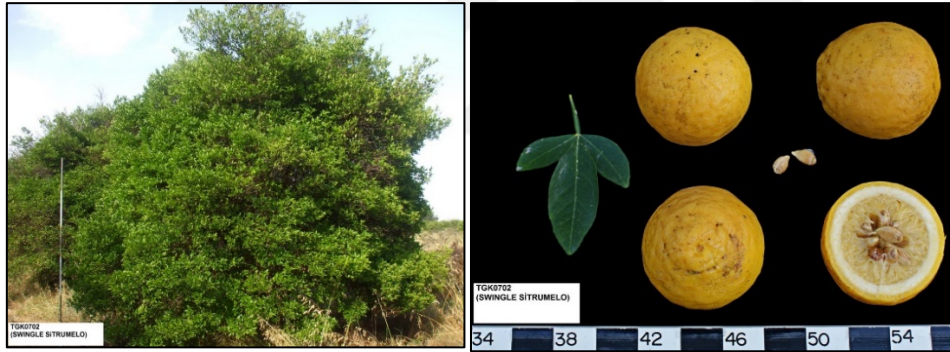


Şekil 3.9. Çalışmada kullanılan ‘Volkameriana’ anacının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.7. Swingle sitrumelo (Sitrumelo 4475) (*Citrus paradisi* Macf. var. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)

Swingle tarafından 1907 yılında “Duncan altıntopu” ile “Üç yapraklı”nın melezlenmesi ile elde edilmiştir. Florida’da yeni dikilen bahçelerin %50’sinden fazlasında ve Güney Afrika’da %40 oranında Swingle sitrumelo kullanılmaktadır (Şekil 3.10). Birçok çeşidin meyve verim ve kalitesine olumlu etkide bulunmaktadır. Meyve kalitesi turunç, Carrizo ve Troyer sitranjı üstüne aşıllı olanlarla benzerlik gösterir (Saunt, 2000). Brezilya koşullarında tristezaya tolerant anaçlar içerisinde Valencia portakalında en yüksek verimi sağlamıştır. Florida’da

Roble portakalı ve Murcott mandarini ile uyumsuzluk göstermesinden dolayı, bu çeşitlerde anaç olarak kullanılmaz. Ancak, altıntop ve melezleri için Kaliforniya ve Florida'da en iyi verim ve kalitenin elde edilmesini sağlamıştır (Saunt, 2000). Kıbrıs'ta Sitrumelo CPB-4475 (*C. paradisi* Macf. × *P. trifoliata*) üzerine aşılı 'Lapithkiotiki' (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) limonunun aşılamadan 3-4 yıl sonra öldüğü bildirmiştir (Georgiou, 2009). Pakistan'da Swingle sitrumelo anacı üzerine Kinnow mandarininin taç hacmi ve yaprak sayısının azaldığı bildirilmiştir (Din ve ark., 2001). Tristeza, exocortis, xyloporosis ve *P. parasitica* hastalıklarına toleranslıdır (Saunt, 2000). Ağaçları birçok toprakta iyi gelişir ve su baskınlarına tolerans gösterir. Ancak ağır, kireçli ve yüksek pH'lı topraklar için uygun değildir (Saunt, 2000). Demir klorozuna hassas; tuz, bor stresine ve soğuklara orta düzeyde toleranslıdır.



Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan 'Swingle' sitrumelo anacının ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.8. Çin turuncu (*Citrus myrtifolia* Rafinesque)

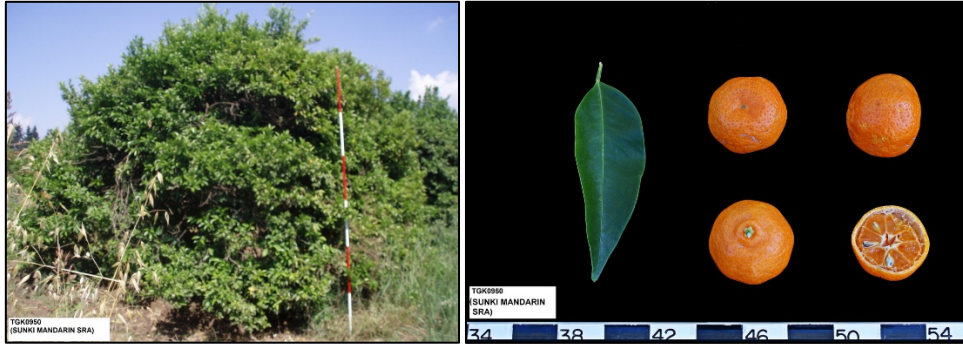
Çin turuncu, turunçtan mutasyon yoluyla elde edilmiştir. Birçok formu bulunan Çin turuncu genel olarak düşük büyüme gücüne sahiptir ve bitki gelişimi yavaştır (Şekil 3.11). Sürgünler üzerindeki boğum araları kısa ve dikensizdir. Bu sayede küçük ve kompakt bir taç oluşturur. Meyvedeki tohum içeriği yüksek oranda değişkenlik gösterir (Reuther ve ark., 1967). Kirece toleranslıdır.



Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan Çin turuncunun ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.9. Sunki mandarini (*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka)

Sunki mandarini (Şekil 3.12), Çin’de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tristeza ve xyloporosis (gözenekleşme) virüs hastalıklarına toleranslı, ancak exocortise (Cüceleşme-CEV) duyarlıdır. Sunki mandarini ağaçları tuzluluğa yüksek, soğuklara orta derecede toleranslıdır. Kireçli topraklara adaptasyonunun iyi ve demir klorozuna toleranslı olduğu bildirilmiştir. Meyve verimi, meyve suyu miktarı ve meyve suyundaki şeker içeriği turunç üzerine aşılı ağaçlardan elde edilen meyvelerle eşit miktarda veya daha üstündür (Castle, 1987; Saunt, 2000 (Louzada ve ark., 2008).



Şekil 3.12. Çalışmada kullanılan ‘Sunki’ mandarinin ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.10. Gou Tou Turuncu (*Citrus aurantium* L.)

Çin kökenli bir anaç olup Tristeza toleranslı olması dışında toprak isteği veya diğer hastalıklara dayanımı konusunda bir bilgi yoktur (Şekil 3.13). Florida’da Gou Tou anacı üzerine aşılı bitkiler diğer turunçlar üzerine aşılı olanlara göre daha büyük bir habitüse sahip olmuşlardır (Saunt, 2000).



Şekil 3.13. Çalışmada kullanılan ‘Gou Tou’ turuncunun ağaç ve meyve görüntüleri

3.1.4.11. Yerli üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* Raf)

Poncirus cinsi soğuklara dayanıklılık bakımından en önemli cinstir. Kış aylarında -26°C ye dayanım gösterdiği belirlenmiştir. Yaprakları üç parçalıdır ve subtropik koşullarda kışın yapraklarını dökmektedir. *Citrus* cinsi için anaç olarak kullanılan en eski türdür. Çin’de 4.000 yıldır yetiştiriciliği yapılmakla birlikte Japonya’da en önemli anaç durumundadır. Bununla birlikte anaç özelliklerinin üstün olması nedeniyle yoğun olarak *Citrus* türleri ile melezlemeleri yapılmış ve üstün anaçlar elde edilmiştir. Anaç özellikleri arasında Tristeza virüsüne, *Phytophthora* etmenlerine, nematodlara ve soğuklara dayanıklılık özellikleri en önemlileridir. Ağaçları yavaş büyür ve küçük ağaçlar oluştururlar (Castle, 1987; Saunt, 2000).

3.1.4.12. Benecke üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* var. *Benecke*)

Üç yapraklıların büyük çiçekli çeşitler grubuna dahildir, kuvvetli ve az dallanarak dikine büyür. Kireçli topraklara hassastır. Eureka grubu limonlar hariç tüm çeşitlerle iyi bir uyuşma gösterir. Exocortise (cüceleşme) çok duyarlıdır. Nematodlara, kök boğazı çürüklüğüne ve tristeszaya (göçüren) toleranttır (Alev, 1990).

3.1.4.13. Yerli mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.)

Orta büyüklükte ağaçlar oluşturan, yavaş büyüyen ve soğuklara oldukça dayanıklı ve çok çekirdekli bir mandarin çeşididir (Saunt, 2000).

3.2. Metot**3.2.1. Gama Işını Uygulaması ile Mandarin Çeşitlerinde Popülasyonların Oluşturulması**

Çalışma kapsamında orta-erken ve orta-geç dönemde olgunlaşan yeni mandarin çeşitleri ile orta-geç, çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin çeşitlerinin geliştirilmesi amaçları doğrultusunda seçilmiş olan Ortanique tangor ve Hernandina mandarin çeşitlerinden alınan kalemlere gama ışını uygulaması yapılmıştır. Bu kapsamda ‘ÇÜZF Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgil Gen Kaynakları’ parsellerinde bulunan Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerinden üzerinde en az 20 adet göz bulunan aşı kalemlerine Nisan 2014 tarihinde “Akdeniz Üniversitesi Nükleer Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi”nde ⁶⁰Co kaynağından 50 gray dozunda gama ışını uygulaması yapılmıştır. Işın uygulanmış gözler bekletilmeden takip eden günlerde yerli turunç (*Citrus aurantium* L.) anacı üzerine aşılanmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. M_1V_1 , M_1V_2 ve M_1V_3 aşamalarından Hernandina ve Ortanique fidanlarına ait genel görüntüler

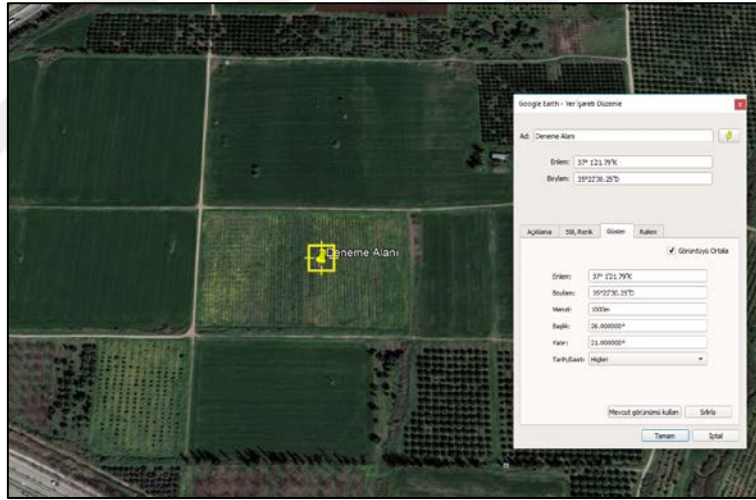
Gelişen ve aşı gözü alınabilecek duruma gelen M_1V_1 bitkilerinden her birinde en dipteki uyur 2 göz ve en üstteki pişkinleşmemiş gözler alınmayacak şekilde bir kesim yapılmış, ortadaki kısımda bulunan gözler (4-5 göz) yerli turunc üzerine aşılanmış ve gözlerin sürmesi sağlanarak 2015 yılında yapılan aşılamalar ile M_1V_2 popülasyonu oluşturulmuştur. 2016 yılında benzer şekilde aşı gözleri alınarak Carrizo sitranjı anacı üzerine aşılanmış ve süren bitkiler M_1V_3 popülasyonunu oluşturmuştur (Şekil 3.14).

Ortanique tangor ve Hernandina mandarin çeşitlerinden mutasyon ıslahı yoluyla elde edilmiş M_1V_3 aşamasındaki bireyler 2017 yılında 4 x 1.5 m mesafeyle

araziye dikilmiştir (Şekil 3.15). Şekil 3.16’de deneme alanına ait uydu fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 3.15. M_1V_3 aşamasındaki Hernandina ve Ortanik tangor çeşitlerinin ışınlanmasıyla elde edilmiş bireylerin bulunduğu parselin görüntüsü



Şekil 3.16. Deneme alanına ait uydu görüntüsü

3.2.1.1. Mutasyon Islahı Yoluyla Elde Edilen Bireylerde Pomolojik Analizler

Araştırmada, ^{60}Co kaynağı kullanılarak 50 gray akut gama ışın uygulaması sonucu elde edilmiş olan M_1V_3 aşamasındaki fidanların 2017 yılında 4x1.5 m mesafeyle araziye dikilmesiyle oluşturulan parselde pomolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Hernandina ve Ortanique çeşidinin ışınlanmasıyla

oluşturulmuş popülasyonda birey başına en az 10 adet meyve tutumu sağlamış olan bitkilerde pomolojik analizler için meyve örneği alınmıştır.

Derilen meyvelerden tesadüfe bağlı olarak, hastaliksız ve yarasız olanlarından en az 10 adet meyve örneği Hernandina popülasyonundan aralık, Ortanique popülasyonundan mart ayı içerisinde alınarak, Özsan ve Bahçelioğlu (1970)'na göre aşağıda belirtilen ölçüme ve gözleme dayalı pomolojik analizler yapılmıştır:

3.2.1.1.(1). Ölçümle Belirlenen Pomolojik Özellikler

Meyve ağırlığı (g): Hasat edilen meyvelerin ortalama ağırlığıdır.

Meyve yüksekliği (mm): Meyve çanak yapraklarının üst yüzeyi ile stil tabanı arasındaki mesafedir.

Meyve çapı (mm): Meyve eksenine dik olan en geniş çaptır.

Meyve Şekil İndeksi (en/boy): Meyve genişliğinin meyve uzunluğuna oranıdır.

Kabuk kalınlığı (mm): En geniş çaptan enlemesine kesilen meyvede albedo ve flavedo ile beraber dijital kompasla ölçülen ortalama kabuk kalınlığıdır.

Meyve orta eksen çapı (mm): Derilen meyvede orta ekseninin kumpas yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Dilim sayısı (adet/meyve): Kesilen meyvede sayılan ortalama dilim sayısıdır.

Meyve başına tohum sayısı (adet/meyve): Örnekleme yapılan meyvelerde sayılan ortalama tohum sayısıdır.

Usare miktarı (%): Meyve suyu çıkarılan (alınan) örnek meyvelerde posa ağırlığına göre bulunan meyve suyu miktarıdır.

Titre edilebilir asit miktarı (%): Meyve örneklerinin usare karışımından 5 ml' lik örneğin 0,1 N' lik NaOH ile titrasyonu ile elde edilen miktardır.

Suda çözülebilir kuru madde (SÇKM) miktarı (%): Meyve örneklerinin usaresinden el refraktometresiyle ölçülen SÇKM miktarıdır.

SÇKM/Asit oranı: % SÇKM miktarının, titre edilebilir % asit miktarına oranıdır.

3.2.1.1.(2). Gözlemle Belirlenen Pomolojik Özellikler**Meyve dış görünüşü**

Karakter	Puan
Çok kötü	1
Kötü	2
Orta	3
Güzel	4
Çok güzel	5

Meyve şekli

Karakter	Puan
Basık	1
Basık yuvarlak	2
Oval	3
Diğer	4

Meyve kabuk yapısı

Karakter	Puan
Çok pürüzlü	1
Pürüzlü	2
Hafif pürüzlü	3
Pürüzsüz	4

Meyve kabuk rengi

Karakter	Puan
Yeşil	1
Yeşil-sarı	2
Açık sarı	3
Sarı	4
Koyu sarı	5
Açık turuncu	6
Turuncu	7
Koyu turuncu	8

Meyve et rengi

Karakter	Puan
Beyaz	1
Yeşil	2
Sarı	3
Turuncu	4

Meyve suyu rengi

Karakter	Puan
Beyaz	1
Yeşil	2
Sarı	3
Turuncu	4

Meyve et tekstürü

Karakter	Puan
Kaba	1
İnce	2
Orta	3

Kabuğun ete bağlılığı

Karakter	Puan
Gevşek	1
Orta	2
Sıkı	3

Hernandina ve Ortanique mutant popülasyonlarında yeteri kadar (en az 10) meyve tutumu sağlanan bireylerden alınan meyve örneklerinde yukarıda listelenmiş olan pomolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler popülasyondaki varyansı incelemek ve sınıflandırmak amacıyla “Tanımlayıcı istatistik” ve “Dağılım analizi”ne tabi tutulmuştur.

3.2.2. Kolhisin Uygulaması Yoluyla Tetraploid Ebeveynlerin Elde Edilmesi

Çalışmada diploid yapıda olan ($2n=18$) monoembriyonik Klemantin 22D mandarini ile polyembriyonik olan W.Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotiplerinin kolhisin uygulamalarıyla kromozom sayıları katlanarak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere tetraploid bireylerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Belirtilen genotiplerin kromozom sayılarını katlamak üzere aşı gözü kalemlerine ve sürgünlerine kolhisin uygulama çalışmaları yürütülmüştür.

3.2.2.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulaması

Klemantin 22D, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalının bir yıllık ilkbahar sürgünlerinden 2-3 göz içeren 5 cm'lik aşı gözü kalemlerine %0.0 (kontrol), %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8'lik kolhisin dozları 4, 6 ve 8 saat süreyle Nisan-2014 tarihinde uygulanmıştır. Uygulama sırasında kolhisin çözeltisi dakikada 60 defa olacak şekilde yatay çalkayıcıda karıştırılmıştır. Uygulama süreleri dolduktan sonra kolhisinli sürgünler iki defa sudan geçirilerek Carrizo sitranjı üzerine aşılanmıştır (Şekil 3.17). Çalışmada her doz için 30 adet aşı gözü kullanılmıştır (Wakana ve ark, 2005).



Şekil 3.17. W.Murcott, Klemantin 22D ve Moro kan portakalının aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulamasından genel görüntüler

Şekil 3.18'de görüldüğü gibi aşılamadan sonra bitkiler mikroskopik gözlemler ve flow sitometri analizleri için 2 ay süreyle sera koşullarında yetiştirilmiştir (Yahata ve ark., 2005). Çalışma, 3 çeşit x 5 kolhisin dozu x 3

uygulama süresi x 30 tekrar olmak üzere faktöriyel düzende ‘Tesadüf Parselleri Deneme Deseni’ne göre kurulmuştur.



Şekil 3.18. Kolhisin uygulaması sonucu gelişmekte olan sürgünlerden genel görüntüler

3.2.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulaması

Sürgünlere kolhisin uygulaması çalışması kapsamında ‘Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Turunçgil Araştırma Serası’nda bulunan C-35 sitranjı üzerine aşılı bir yaşlı Klemantin 22D, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı fidanları kullanılmıştır. Fidanlar ilkbahar sürgün dönemi başlangıcında kolhisin çözeltisine daldırma uygulaması yapılabilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Sera koşullarında yetiştirilen fidanlar tek gövde olarak büyüyecek şekilde budanmıştır. Tek gövde haline getirilen fidanlarda sürgün aktivitesi başlangıcı gözlemlenmiştir. İlkbahar sürgün aktivitesi başlangıcında fidanların sürgün uçlarında bulunan yapraklar kolhisin uygulamalarına hazırlık amacıyla Şekil 3.19’da görüldüğü gibi budanmıştır. Kolhisin uygulamasının

etkinliğini artırmak amacıyla budanan yaprakların koltuklarında bulunan gözlerin sürmesi beklenmiş böylece meristematik hücrelerde mitoz bölünmenin aktif olduğu dönemde kolhisin uygulamaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.19. Kolhisin uygulamasına hazırlık amacıyla sürgün uçlarında bulunan yaprakların budanması (solda) ve budama yapılan yaprakların koltuklarında bulunan gözlerde sürgün aktivitesinin başlangıcı (sağda)

Kolhisin uygulaması, budanan ve üzerinde sürmesi beklenen gözlerin bulunduğu sürgünlerin kolhisin çözeltisi içerisinde bekletilmesi şeklinde yapılmıştır (Koksal ve ark., 2002). Bu amaçla sürgün uçları budanmış Klemantin 22D, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı fidanları kolhisin çözeltisi içerisine batacak şekilde bükülerek Şekil 3.20’de görüldüğü gibi gövdelere bağlanmıştır. Uygulama yapılacak olan yaprakları budanmış halde olan sürgünlerin uç kısmına 15 ml’lik falcon tüpleri geçirilmiş ve her bir fidanda falcon tüpü içerisinde kalan göz sayıları % canlılık oranı hesaplamasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Sürgünlere kolhisin uygulaması için hazırlık aşamasında olan fidanlardan genel görüntüler

Uygulamaya hazır hale getirilen fidanların sürgün uçlarında bulunan falcon tüplerine 20 ml’lik enjektör yardımıyla kolhisin çözeltisi eklenmiştir. Kolhisin çözeltisi eklenen falcon tüpleri çözelti buharlaşmasını ve ışık geçişini engellemek amacıyla alüminyum folyoyla sarılmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Sürgünlere kolhisin uygulamasından genel görüntüler

Klemantin 22D, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalının bir yıllık sürgün uçları üzerinde bulunan gözler %0.0 (kontrol), %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8'lik kolhisin dozları içeren çözelti içerisinde 4, 6 ve 8 saat süreyle bekletilerek sürgünlere kolhisin uygulaması Nisan-2014 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Çözelti içerisinde bekleme süresi tamamlanan uygulama grubunun sürgünleri çözelti içerisinde çıkartılmış ve bükülerek gövdeye bağlanmış olan sürgünler gövdeden ayrılmıştır. Bitkiler mikroskopik gözlemler ve flow sitometri analizleri için 2 ay süreyle sera koşullarında yetiştirilmiştir. Kolhisin uygulaması, her çeşit ve tipten her doz ve uygulama süresi için 30 göz kullanılarak gerçekleştirilmiş ve deneme kapsamında tüm çeşitlere ait olarak toplamda 1350 adet göz kullanılmıştır.

3.2.2.3. Kolhisin Uygulamaları Sonucu Canlılık Oranının Belirlenmesi (%)

Kolhisin uygulamaları kapsamında % canlılık oranı, uygulama sonrası sürerek gelişim gösteren göz sayısının uygulama yapılan toplam göz sayısına bölümünün 100 katı ile çarpılması yoluyla hesaplanmıştır.

$$\text{Canlılık oranı (\%)} = \frac{\text{Gelişim gösteren bitki sayısı}}{\text{Uygulama yapılan göz sayısı}} \times 100$$

3.2.2.4. Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi

Kolhisin uygulaması sonucunda % canlılık oranları hesaplandıktan sonra sürmüş aş gözlerinden elde edilen tüm sürgünlerin yapraklarından flow sitometri analizleri için Tuna (2014)'nın bildirdiği şekilde yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri alınırken, örneğin ploidi seviyesi bakımından farklılık göstermesi durumunda ilgili yaprak ve aş gözünü kolay tespit etmek amacıyla, her örnek bitki üzerinde kalıcı cam yazar yardımıyla işaretlenmiştir.

Alınan yaprak örneklerinde Niğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında

bulunan Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Germany) flow sitometresi ile ploidi düzeyleri incelenmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Ploidi seviyesinin belirlenmesi çalışmasında kullanılan flow sitometri cihazının (Partec CyFlow Space) ve çalışma aşamasının genel görüntüleri

Flow sitometri analizleri ilgili cihazın kit prosedürüne bağlı kalarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin okuma için hazırlanması aşamasında 0.5 cm²'lik yaprak örnekleri kullanılmıştır. Yaprak örnekleri petri kutuları içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 0.5 ml Partec HR-A eklendikten sonra jilet yardımıyla iyice kıyılmıştır. Kıyılmış örnekler 30 µm geçirgenliğindeki filtre yardımıyla süzülerek üzerine DAPI (4',6-diamine-2-phenylindol) içeren Partec HR-B solüsyonu eklenerek, 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda W. Murcott mandarini, Klemantin 22D mandarini ve Moro kan portakalının yapraklarının DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin nüklear DNA içeriği Partec CyFlow Space flow sitometrisinin 365 nm dalga boyunda UV led kaynaklı nükleus floresanından geçirilerek ölçülmüştür. Her bir yaprak örneği için 1000-3000 nükleus analiz edilmiştir. Oluşan histogramlar, pik pozisyonu ve varyasyon katsayısı (CV) ilgili cihazın yazılımı (dpac v2.0) yardımıyla hesaplanmıştır (Tuna, 2014). Ayrıca kontrol ve karşılaştırma sağlamak amacıyla bir adet doğal triploid (Bearss laymı, 3x) ve bir adet yapay triploid çeşide (Oroblanco, 3x) ait yaprak örneklerinden elde edilen pik noktalarına ait florasana

ışık yoğunlukları belirlenmiştir. Böylece, triploid yapıdaki Bearss laymı ve Oroblanco çeşidinin 365 nm UV Led kaynağının altında yaprak hücresi nükleus miktarlarının pik yaptığı ortalama değer standart referans olarak alınmıştır. Örneklerin ploidi seviyeleri referans nükleus miktarının verdiği ortalama ışıma yoğunluğu değeri ile kıyaslama yapılarak belirlenmiştir.

3.2.2.5. Kolhisin Uygulamaları Sonucu Tetraploid Bitki Oranının Belirlenmesi (%)

Tetraploid bitki oranı tüm uygulamalarda tetraploid olduğu anlaşılan bitki sayısının uygulamalarda kullanılan toplam aşı gözü sayısına bölümünün 100 ile çarpılması yoluyla hesaplanmıştır.

$$\text{Tetraploid bitki oranı (\%)} = \frac{\text{Tetraploid bitki sayısı}}{\text{Uygulama yapılan göz sayısı}} \times 100$$

3.2.2.6. Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler

Ploidi seviyesi bakımından farklılık gösterdiği flow sitometri ile belirlenen bitkilerde bazı mikroskobik gözlemler yapılmıştır. Yaprak stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, stoma büyüklüğü ve stoma indeksi değişkenleri diploid ve tetraploid bitkilerden alınan yaprak örneklerinde incelenmiştir.

Stoma uzunluğu ve genişliğini (µm) belirlemek için kontrol bitkileri ve ploidi seviyesinin farklılığı tespit edilen her bitkinin 5 adet yaprağında epidermis hücrelerinden bir parça lam üzerine konulup 1 damla saf su damlatılmış ve lamel kapatılarak preparat hazırlığı yapılmıştır. 40 büyütme objektif ve 10 büyütme mikrometre yardımıyla stomaların uzunluğu ve genişliği Nikon NIS-Elements v4.0 yazılımı ile belirlenmiştir. Ölçümler her yaprağın iki farklı bölgesinde 2'şer okuma şeklinde yapılmıştır (Usman ve ark, 2008). Ayrıca stoma yoğunluğunu belirlemek amacıyla stoma boyutları için hazırlanan preparatlarda yaprak alt epidermisinde her yaprağın 2 farklı bölgesinde 1 mm² alanda kaç adet stoma bulunduğu Nikon NIS-Elements v4.0 yazılımı yardımıyla 2'şer sayım yapılarak kaydedilmiştir. Stoma

büyüklüğü (stoma uzunluğu x genişliği) ve stoma indeksi (uzunluk/genişlik) ise kaydedilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm kolhisin uygulamalarında flow sitometri dışında elde edilen bulgular, ‘Tesadüf Parselleri Deneme Deseni’ne SAS v9.0 programının GLM prosedürü ile tek veya çift yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen veriler TABULATE prosedürü ile ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulurken ortalama karşılaştırmaları LSD testi ile $\alpha=0.05$ güven seviyesinde değerlendirilmiştir. Flow sitometri analizleri sonucunda oluşan histogramlar, pik pozisyonu ve varyasyon katsayısı dpac v2.0 yazılımı yardımıyla analiz edilmiştir.

3.2.3. Klasik Melezlemeler ile Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında, alkali topraklara adapte olabilen, tristeza virüs hastalığı ve *Phytophthora citrophthora* etmeninin neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına toleranslılık amaçlarına yönelik olarak seçilmiş olan ebeveynler arasında oluşturulan kombinasyonlarda kontrollü melezlemeler yapılmıştır. Klasik melezlemeler ebeveynlerin çiçeklenme tarihlerine bağlı olarak 10 - 18 Nisan 2014 tarihleri arasında Çizelge 3.2’de belirtilen kombinasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen klasik melezleme kombinasyonları

Ana ebeveyn (♀)		Baba ebeveyn (♂)	
1	Gou Tou turuncu	x	Yerli üç yapraklı
2	Çin turuncu	x	Rubidoux üç yapraklı
3	Kleopatra mandarini	x	Yerli üç yapraklı
4	Sunki mandarini	x	Rubidoux üç yapraklı
5	Volkameriana CRC1	x	Swingle sitrumelo
6	Yuzu	x	Pomeroy üç yapraklı

Yerli üç yapraklı ve melezlerinin baba ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonlarda başka çeşitlerin çiçek tozlarının karışmaması için baba ebeveynlerden taç yapraklar açılmadan önce çiçekler alınarak, sıcak ve kuru koşullarda tutulmuş ve açan çiçeklerden çiçek tozları alınarak kapalı kaplara aktarılmıştır (Şekil 3.23.)



Şekil 3.23. Anthesis aşamasında toplanan çiçekler ve çiçeklerden izole edilen anterlere ait genel görüntüler

Yerli üç yapraklı ve melezleri, ana olarak kullanılan genotiplere göre daha erken çiçeklendiği için elde edilen çiçek tozlarının nemi silikagel veya CaCl_2 yardımıyla 2 saat kadar süreyle alınmış, sonra silikagel bulunan ortamda kapalı kutuda -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Ana olarak kullanılacak genotipler çiçeklendiği zaman çiçek tozları derin dondurucudan çıkartılarak melezlemede kullanılmıştır.

Çalışmada baba (♂) ebeveyn olarak kullanılan genotiplerden bir gece önceden çıkarılan çiçek tozları canlılığını kaybetmeden canlılık testi için kullanılmıştır. Çiçek tozu canlılığı TTC testi ile Eti (1990)'ye göre belirlenmiştir. Mikroskop altında koyu kırmızı görünen çiçek tozları “canlı”, açık kırmızı görünenler “yarı canlı” ve boyanmayan ya da sarı-krem renginde olanlar ise cansız” olarak değerlendirilmiştir. Her çeşit için 3 lam ve her lamda tesadüfen seçilen 5 ayrı bölgede sayım yapılmıştır.

Melezleme döneminde Çizelge 3.2’de belirtilen ana ebeveynlerde anthesis aşamasında bulunan çiçekler belirlenerek taç yaprakları ve erkek organları uzaklaştırılmış ve melezleme için emaskulasyon yapılmıştır. Dişi organı reseptif halde bulunan emaskule edilmiş ana ebeveyne ait çiçeklere baba ebeveynin çiçek tozları bir fırça yardımıyla sürülerek tozlanma gerçekleştirilmiş ve her çiçeğe ilgili etiketi bağlanarak sık dokulu bir bez kese içerisine alınmıştır. Meyveler belirli bir büyüklüğe geldiğinde, keseler çıkarılmış ve bunun yerine daha iyi hava alınmasını sağlayan ve olgunluk döneminde meydana gelebilecek dökümlerde meyve kaybını önlemek amacıyla daha seyrek dokunmuş olan fileler takılmıştır (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Klasik anaç melezleme çalışmasından genel görüntüler

Klasik melezlemeler sonucu elde edilen meyveler ana ebeveynin meyve olgunlaşma tarihi göz önünde bulundurularak, aralık ayı içerisinde hasat edilmiştir. Hasat edilen meyveler etiketlenerek laboratuvara getirilmiş ve meyvelerden tohumlar çıkarılmıştır. Tohumlar %1'lik "8-Hydroxyquinoline hemisulfate" ile ilaçlanarak ekim zamanına kadar 4-5°C de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. Klasik melezlemelerden elde edilen meyvelerden çıkartılan tohumların yıkanması ve kurutulmasına ait genel görüntüler

İlaçlanarak 4-5°C de muhafaza edilen tohumlar, Mart 2015 tarihinde iklim kontrollü serada torf içeren saksılara ekilmiştir (Şekil 3.26). Sera koşullarında iklimlendirme değerleri sıcaklık gündüz 25°C gece 20°C, nem ise gündüz ve gece %75 olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.26. Klasik melezlemelerden elde edilen tohumların serada torf ortamına ekiminden genel görüntüler

Çizelge 4.2.'de yer alan kombinasyonlarda yürütülen melezleme çalışmalarından elde edilen bitkilerin melez olup olmadığı, üç yapraklılık özelliğinin tek yapraklılığa baskın bir karakter olmasından faydalanarak morfolojik gözlemlerle belirlenmiştir. Bu nedenle üç yapraklılık özelliği gösteren bitkiler melez olarak kabul edilmiştir. Ancak Volkameriana x Swingle citrurnelo kombinasyonunda (5 no'lu melezleme kombinasyonu) kullanılan baba ebeveyn üç yapraklı hibritidir. Bu nedenle sözü geçen kombinasyondan elde edilen bitkilerin melez olup olmadığı, ko-dominant ve tekrarlanabilir bir marker sistemi olan SSR yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.3.1. SSR Yöntemiyle Melez Bitkilerin Tespiti

Çalışma kapsamında Volkameriana x Swingle citrurnelo melezleme kombinasyonundan elde edilen bireylerin morfolojik olarak ayrılması konusundaki güçlüklerden dolayı bu kombinasyondan elde edilen bitkilerin erken dönemde SSR markır sistemiyle melez olup olmadıkları Aka Kaçar ve ark. (2009)'a göre doğrulanmıştır.

3.2.3.1.(1). DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, kalite ve miktar tayini çalışmaları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonları Doyle ve Doyle (1990)'un yönteminden modifiye edilmiş CTAB protokolüne göre yapılmıştır. Buna göre;

- Çimlenen bitkilerden alınan taze yaprakların temizliği su altında yapıp bitkisel materyaller kurulandıktan sonra Tissue Lyser cihazında sıvı azot (-196°C) ile muamele edilerek öğütülmüştür.
- 1,5 ml'lik eppendorf tüpler içerisinde bulunan öğütülmüş örnekler üzerine 700 µl ekstraksiyon çözeltisi (CTAB + %2 β-merkaptoetanol) eklenmiştir. Tüpler homojenlik sağlanıncaya kadar karıştırılmış ve sonra 65°C'de 20

dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre zarfında tüpler her beş dakikada bir defa olmak üzere dört kez karıştırılmıştır.

- Her bir tüpe 700 µl kloroform izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve 13.000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant, yeni 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak üzerine 2 µl RNase eklenmiştir. 37°C'de 10 dk bekletildikten sonra tüpler içerisine 5 M NaCl solüsyonu ve 420 µl izopropanol eklenmiştir.
- Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 13000 rpm de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldükten sonra pellet üzerine 1 ml % 70'lik alkol ile eklenmiş 13000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Santrifüj işleminden sonra pellet etrafındaki alkol mikropipet yardımıyla çekilerek pelletin kuruması amacıyla tüpler ters çevrilerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Kuruyan pellet 55 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözdürülerek DNA izolasyon işlemi tamamlanmıştır.

DNA izolasyon aşamaları Şekil 3.27.'de görsel olarak sunulmuştur.



Şekil 3.27. DNA izolasyon aşamaları. A: Yaprak örneklerinin tüpler içerisine aktarılması; B: Yaprak örneklerinin Tissue Lyser cihazında öğütülmesi; C: Ekstraksiyon çözeltisinin eklenmesi; D: Örneklerin 65°C’de bekletilmesi; E: Kloroform izoamilalkol (24:1) eklenmesi; F: Santrifuj işlemi; G: Santrifuj sonrası oluşan süpernatant; H: İzopropenol eklendikten sonra beyaz ipliksi yapıda DNA; I: Etanol ile muamele edilmiş DNA; J: Pelletin TE içerisinde çözülmesi

3.2.3.1.(2). DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan elde edilen bitkilerde gerçekleştirilen DNA izolasyon işlemlerinden sonra elde edilen DNA'ların kalitesi ve miktarı spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) 260 ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılarak belirlenmiştir (Şekil 3.28). Daha sonra tüm örneklerde 5 ng/ µl olacak şekilde DNA konsantrasyonları eşitlenerek yeni tüplerde DNA solüsyonları hazırlanmıştır. PCR (Polimeraz Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmalarında konsantrasyonları eşitlenmiş olan DNA solüsyonları kullanılmıştır. Stok DNA'lar ise -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.28. DNA miktar ve kalitesinin NanoDrop'da ölçülmesi

3.2.3.1.(3). SSR Analizleri PCR koşulları

Çalışma kapsamında 5 adet SSR primer çifti kullanılarak PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan SSR primer çiftlerine ait bilgiler Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler

No	Primer	Primer Dizini (5'-3')	Uzunluk bp
1	54	F: AACACCTTAAGGCTGCAGGA R: CGTTGTTGATGATTCTTGATGA	20 22
2	83	F: CCAAAAGTTCTTGATTTTCGTTG R: TCGTCAACCTCCATGCTGTA	22 20
3	84	F: CTGCCCTACAGAGAGCGTAGA R: GTGCCGCATCTGATTTCAA	21 19
4	105	F: TTGGACCCGAGAGTACAAGC R: CCAGTGTGCTTGGCATTTC	20 20
5	MEST121	F: TCCCTATCATCGGCAACTTC R: CAATAATGTTAGGCTGGATGGA	20 22

SSR analizleri için LiCor (4300) Sekans analiz sistemi (Lincoln, NE) kullanılarak bantlar görüntülenmiştir. Bu kapsamda Forward veya Reverse primerlerin 3' uçlarına CACGACGTTGTAAAACGAC dizini eklenerek floresan etiketi okuma özelliği olan DNA analiz sisteminde görüntülenmesi ve analizlerinin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Belirtilen kombinasyona ait bitkilerin melezlik durumlarının tespiti için elde edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarının bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.4.'de PCR döngü koşulları ise Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR reaksiyonlarının bileşenleri

PCR Bileşenleri	Konsantrasyon	Her örnek için kullanılan miktar
DNA	5 ng	5.0 µl
PCR Master Mix	2X	8.0 µl
Taq Polimeraz	500 ünite	0.05 µl
MgCl ₂	25 mM	0.5 µl
Primer Forward	2 µM	0.5 µl
Primer Reverse	2 µM	0.5 µl
M13 Primer	1 nM	0.5 µl
ddH ₂ O		5.0 µl

Çizelge 3.5. PCR döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Aşama
95°C	5 dk	ön denatürasyon
95°C	1 dk	DNA'nın çift iplikçığının ayrılması "denatürasyon"
55°C	30 sn	primer bağlanması "annealing"
72°C	1 dk	yeni iplikçığın yazılımı "uzama"
72°C	6 dk	son yazılım
4°C	∞	

Toplam: 35 döngü

3.2.3.1.(4). Li-Cor için Poliakrilamide Jel Hazırlığı ve Elektroforez Koşulları

Çalışması sonucunda elde edilen PCR ürünlerini koşturmak amacıyla % 6.5 poliakrilamide jel hazırlanacaktır. Bu jelin hazırlanması da kullanılan kimyasalların listesi ve kullanılan miktarları aşağıda listelenmiştir.

Üre	8.4 g
%50 Long Ranger Akrilamide	2.6 ml
10X TBE Buffer	2.0 ml
TEMED	15 µl
Amonyum Persulfat (APS-%10)	150 µl

Jel hazırlandıktan sonra dikkatli ve hızlı bir şekilde enjektör yardımıyla aparatına dökülmüş ve yaklaşık 2.5 saat polimerizasyonu beklenmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra aparat Li-Cor DNA Analyzer 4200 (Licor Biosciences, Bad Homburg, Germany) aletine yerleştirilmiş, eşit miktarda formamid yükleme tamponu eklenmiş ve 1000 V, 35 mA, 25 W 45°C'de yaklaşık 30 dk. ön ısıtma yapılmıştır. Amplifikasyon ürünü içeren her bir tüpün içerisine eşit miktarlarda % 95 formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), % 0.025 xylene cyanol ve % 0.025 bromophenol blue içeren formamid yükleme tamponu eklenmiş ve örnekler PCR'da 95°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra örnekler buz üzerinde soğutulmuş ve her bir örnekten 1.0 µl 25 cm'lik poliakrilamid jele (Long Ranger, FMC Biozym, Hesisch Oldendorf, Germany) pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35

mA, 50 W 48°C’de jel koşullarında 1.5 saat koşturulmuştur. Elektroforez işlemleri için jel hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi aşamaları Şekil 3.29’da gösterilmiştir.



Şekil 3.29. Jel hazırlığı ve Örneklerin Li-cor cihazına yüklenmesi

3.2.3.1.(5). SSR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda ana ebeveyn ve baba ebeveyninden gelen bantlar incelenmiştir. Sadece ana ebeveyne ait bant veren bitkiler nuseller bitki, ana ve baba ebeveyne ait her iki bantı veren bitkiler melez, ana ebeveyn ile aynı fakat baba ebeveynle farklı bantı veren bitkiler ise melezleme kombinasyonu dışı (outcross) olarak ayrılmıştır.

3.2.4. Somatik Melezleme Yöntemiyle Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması

Bu tez çalışması kapsamında somatik melezleme yöntemiyle anaç popülasyonlarının oluşturulması amacıyla; 1) ovül kültürü yöntemiyle embriyogenik kallus hatlarının oluşturulması, 2) oluşturulan embriyogenik kallus hatlarından verimli ve canlı protoplast hücrelerinin izolasyonu, 3) izole edilen protoplast hücrelerinin elektrofüzyon yöntemiyle birleştirilerek hücre rejenerasyonu yöntemiyle somatik melez bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Somatik melezleme yapılacak olan genotipler protoplast kaynağına göre (embriyonik kallus ve yaprak mezofil hücresi) Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Somatik melezleme kombinasyonları

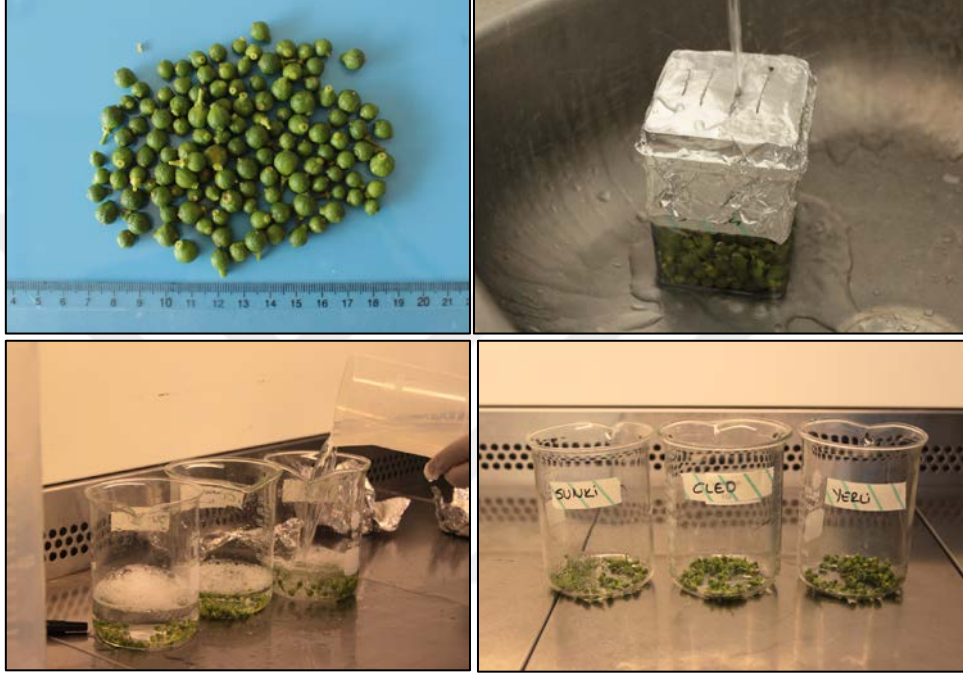
Protoplast Kaynağı		
	Embriyogenik Kallus	Yaprak
1	Kleopatra mandarini	+ Rubidoux üç yapraklı
2	Sunki mandarini	+ Benecke üç yapraklı
3	Yerli Mandarin	+ Carrizo sitranji

Elektrofüzyon sonrası birleşen protoplastların hücre duvarı oluşturup kendini yenileyerek bölünüp proembriyoya dönüşebilmesi için protoplast kaynaklarından en az bir tanesinin embriyogenik olması gereklidir. Bu doğrultuda somatik melezlemelerde protoplast izolasyon kaynağı olarak kullanılmak üzere embriyogenik kallus hatlarının oluşturulması amacıyla Kleopatra mandarini, Sunki mandarini ve Yerli mandarin genotiplerinde embriyogenik kallus hatları elde etmek amacıyla ovül kültürü çalışmaları yürütülmüştür.

3.2.4.1. Ovül Kültürü Çalışmaları

Ovül kültürü çalışmalarında, Kleopatra mandarini, Sunki mandarini ve Yerli mandarin ağaçlarının tam çiçeklenme döneminden 6 hafta ve 8 hafta sonra olmak üzere iki farklı dönemde toplanan olgunlaşmamış meyvelerinden izole edilen ovüller eksplant olarak kullanılmıştır. Belirtilen genotiplerin küçük meyvelerinden izole edilen ovüllerin kültüre alınma işleminden önce yüzey

sterilizasyonu yapılmıştır. Meyveler aseptik koşullarda 2 dk %70 EtOH ve 10 dk NaClO (%0,2 klorit aktif) çözeltisinde bekletildikten sonra 3 kere yıkanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. Ovül kültürü çalışmalarında meyvelerin yüzey sterilizasyon aşamalarına ait görüntüler

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen küçük meyvelerden izole edilen ovüllerden embriyogenik kallus eldesi için eksplantlar MS bazal + MT vitaminleri + 0.5 g/l malt ekstratı + 50 g/l sukroz + 3.5 g/l Gelrite, [(MS Murashige ve Skoog (1962), MT Murashige ve Tucker (1969), (Çizelge 3.7)] kültür ortamına Çizelge 3.8’de belirtilen hormonlar eklenilerek oluşturulan ortamlarda kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan, MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementleri ve miktarları ve MT vitamin içeriği

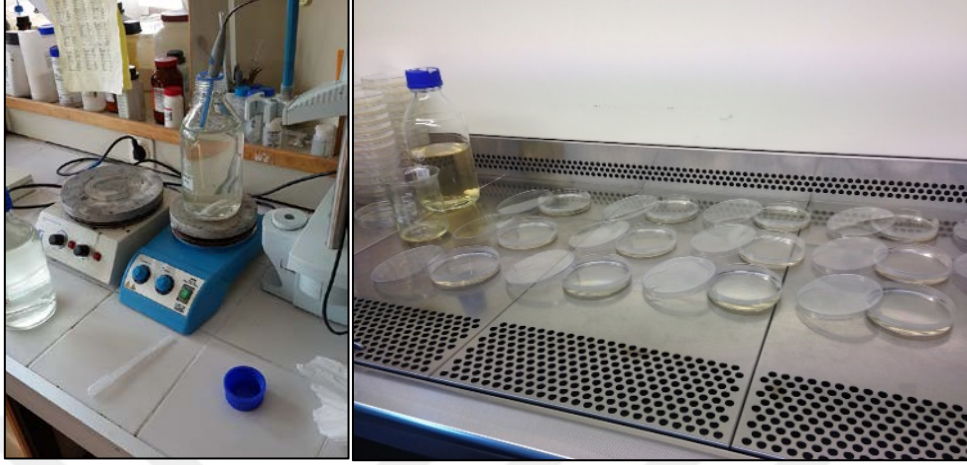
Bileşik	Konsantrasyon (mg/l)
Makro Elementler	(MS, 1962)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	(MS, 1962)
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .H ₂ O	15.60
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.03
KI	0.83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA	37.30
Vitamin	(MT, 1969)
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotinamide	6
Pyridoxine HCl	10
Thiamine HCl	10

Çizelge 3.8. Ovül kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamları

Ortam içeriği	Uygulama		
	M1	M2	M3
MS bazal tuzları	+	+	+
Vitaminler	+	+	+
Sukroz (g/l)	50	50	50
Malt ekstratı (g/l)	0.5	0.5	0.5
2,4-D (mg/l)	-	-	1.0
BAP (mg/l)	-	3.0	0.5
Kinetin (mg/L)	1.0	-	-
Gelrite (g/l)	3.5	3.5	3.5

MS Murashige ve Skoog(1962), MT Murashige ve Tucker (1969)

Hazırlanan ortamların pH'sı 5.7'ye ayarlanarak sterilizasyonu işlemi 121°C'de 1.05 atm. basınç altında 15 dk otoklav koşullarında gerçekleştirilmiştir. Otoklav sonrası ortamlar yaklaşık 25 ml olacak şekilde 90 x 15 mm'lik tek kullanımlık steril petri kaplarına dökülmüştür (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Ovül kültürü çalışmaları için kültür ortamlarının hazırlanışı

Steril edilen meyvelerden aseptik koşullarda steril kabin içerisinde, stereo mikroskop altında steril pens ve bisturi yardımıyla izole edilen ovüller, içeriği Çizelge 3.8’de belirtilen ortamlarda kültüre alınmıştır (Şekil 3.32). 25 ml kültür ortamı içeren her petride 10 ovül 26°C’de karanlıkta kültüre alınmıştır (Besin ortamının durumu ve kallus gelişimine bağlı olarak). Her 4 ya da 5 haftada bir oluşan kalluslar aynı ortamlarda alt kültüre alınmıştır.



Şekil 3.32. İzole edilen ovüllerin besin ortamında kültüre alınışı

Ovül kültürü çalışması, her ortam ve her anaç için 10 petri ve her petride 10 eksplant olacak şekilde tam çiçeklenmeden 6 ve 8 hafta olmak üzere iki farklı

dönemde kurulmuştur. Çalışma 3 anaç x 3 kültür ortamı x 2 dönem x 10 tekrerrür olmak üzere ‘Tasadüf Parselleri Faktöriyel Deneme Deseni’ne göre planlanmıştır. Çalışmada kallus oluşum oranı; bir uygulamada bulunan her tekerrürden meydana gelen kallus oluşumları alınarak, o uygulamaya düşen ortalama kallus oluşumu olarak hesaplanmıştır. Eksplantın kültüre alındığı dönem, genotip, besin ortamları ve bunlarının interaksiyonlarının % kallus oluşumuna etkisini incelemek amacıyla elde edilen ortalama değerlere açış transformasyonu uygulanarak üç yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Çalışmada her genotip için elde edilebilen embriyogenik kalluslar parlak, kırılğan, kolay dağılan, dolgun ve yuvarlak yapısıyla diğer kalluslardan morfolojik olarak ayırt edilmiştir. Kalluslar beyaz-kremsi ve kolay dağılır (friable kallus) yapı kazandığında (yaklaşık 6-9 ay sonra) protoplast izolasyonunda kullanılmak üzere hormon içermeyen EME besin ortamında [(MS basal tuzları + MT vitaminleri + 0.5 g/L malt ekstratı + 50 g/L sukroz + 3.5 g/L Gelrite, (MS Murashige ve Skoog (1962), MT Murashige ve Tucker (1969))] 26°C’de karanlıkta alt kültüre alınmıştır.

3.2.4.2. Embriyogenik Kalluslardan Protoplast İzolasyonu

Ovül kültürü çalışmalarından elde edilen kalluslar, ilk alt kültürü izleyen 30-60 gün içerisinde stereo mikroskop altında incelenerek embriyogenik yapıda olanlar morfolojik olarak belirlenmiştir. Seçilen embriyogenik kalluslar protoplast izolasyon çalışmalarında kullanılmak için yeterli miktarda çoğaltılmasının sağlanması amacıyla belirtilen ortamda kültüre alınmış ve somatik melezleme çalışmaları için yeterli miktara ulaşılmıştır.

Kleopatra mandarini, Sunki mandarini ve Yerli mandarin genotiplerinden ovül kültürü yoluyla elde edilmiş ve alt kültürlerde çoğaltılmış embriyogenik kalluslardan yaklaşık 400 mg kolay dağılır (friable) yapıda olan hücreler seçilerek 60 x 15 mm’lik petri kaplarına aktarılmıştır. Çalışma kapsamında Kleopatra mandarini, Sunki mandarini ve Yerli mandarin genotiplerinden elde edilen embriyogenik kalluslarda enzimatik sindirme koşulunun optimizasyonu ve somatik

melezleme için yeterli hücre sayısına ulaşmak amacıyla farklı seviyelerde enzim ve besin ortamı kombinasyonları denenmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Embriyogenik kalluslardan protoplast izolasyonunda kullanılan enzim-BH3 kültür ortamı kombinasyonlarıyla oluşturulan izolasyon koşulları

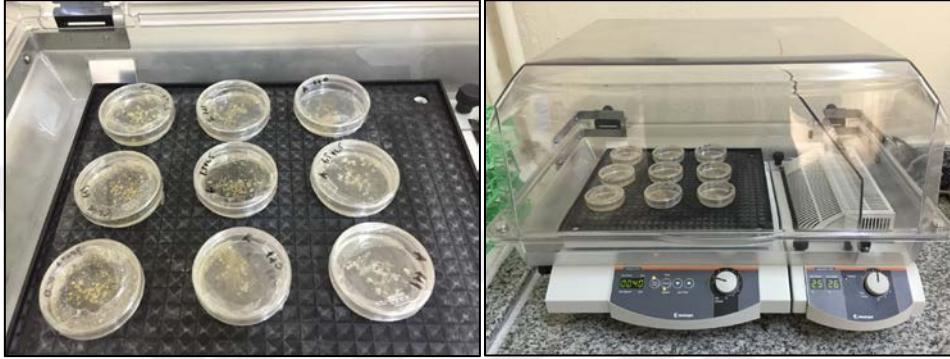
Uygulama	ES (ml)		0.7 M BH3 (ml)
1	1	+	3
2	1.5	+	2.5
3	2.0	+	4.0

Embriyogenik kallus hücreleri üzerine 0.7 M BH3 protoplast kültür ortamı (Çizelge 3.9) eklenerek kalluslar ortam içerisinde pastör pipet ile hücrelere zarar vermeyecek şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra besin ortamı içerisinde bulunan hücrelerin üzerine hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış ve enzim solüsyonu (0.7 M mannitol, 18.0 mM CaCl₂, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH₂PO₄, %1 Onozuka RS cellulase, %1 Macerace, %0.2 Pectolase Y-23, pH 5.6) eklenmiştir (Çizelge 3.10). Embriyogenik kalluslardan protoplast izolasyonu çalışması 3 genotip x 3 izolasyon koşulu x 3 tekerrür olmak üzere Tesadüf Parselleri Faktöriyel Deneme Deseni'ne göre yürütülmüştür.

Çizelge 3.10. Turunçgil protoplast kültür ortamı (Grosser ve Gmitter, 2011)

Bileşen	Konsantrasyon (mg/litre)	
	0.6 M BH ₃	0.7 M BH ₃
KH ₂ PO ₄	170	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440
Na ₂ EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KCl	1500	1500
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
Glutamine	3100	3100
Thiamine·HCl	10	10
Pyridoxine·HCl	10	10
Myo-inositol	100	100
Malt extract	500	500
Casein hydrolysate	250	250
Nicotinic acid	1	1
Mannitol	81.900	81.900
Sucrose	51.350	85.560
Coconut H ₂ O	20 ml	20 ml
Fructose	250	250
Ribose	250	250
Xylose	250	250
Mannose	250	250
Rhamnose	250	250
Cellobiose	250	250
Galactose	250	250
Glucose	250	250
Sodium pyruvate	20	20
Citric acid	40	40
Malic acid	40	40
Fumaric acid	40	40
Vitamin B ₁₂	0.02	0.02
Calcium pantothenate	1	1
Ascorbic acid	2	2
Choline chloride	1	1
p-aminobenzoic acid	0.02	0.02
Folic acid	0.4	0.4
Riboflavin	0.2	0.2
Biotin	0.01	0.01
Vitamin A (retinol)	0.01	0.01
Vitamin D ₃ (cholecalciferol)	0.01	0.01

Enzim ve protoplast kültürü solüsyonu içerisinde kallus içeren petri kapları hücre duvarının parçalanması için inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıya aktarılmıştır. Enzimatik sindirme işlemi için petri kapları 15-16 saat boyunca 26°C’de 40 rpm’de çalkalanmıştır (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Kallus hücrelerinden protoplast elde etmek üzere yatay çalkalayıcıda inkübasyon

3.2.4.3. Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu

Somatik melezleme çalışmalarında ikinci ebeveyn olarak Carrizo sitranjı, Benecke üç yapraklı ve Rubidoux üç yapraklı genotipleri kullanılmıştır. Genotiplere ait yapraklar Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, Turunçgil serasında bulunan fidanlardan temin edilmiştir. Carrizo sitranjı, Benecke üç yapraklı ve Rubidoux üç yapraklı sürgünlerinin üzerindeki 3-4 haftalık henüz gelişmesini tamamlamış genç yapraklar, protoplast izolasyonu çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

Seradaki bitkilerden alınan yaprak materyali laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyonu öncesinde 1 N HCl’de birkaç saniye tutulmuştur. Daha sonra yapraklar %70 oranındaki etil alkol içerisinde 2 dk, sonrasında 1-2 damla tween 20 içeren %10 ‘luk sodyumhipoklorid çözeltisinde 15 dk bekletilmiş ve 4-5 kez steril saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan yapraklar steril pens yardımıyla steril petri kutularına

aktarılarak yaprakların kanatçık ve orta damarı bistüri yardımıyla çıkarılmıştır ve selüloz, pektinaz ve maceraz enzimlerinin etki edeceği yüzey alanını artırmak amacıyla ince ve düzgün aralıklarla ince şeritler halinde kesilmiştir.

Çalışmada, Carrizo sitranjı, Benecke üç yapraklı ve Rubidoux üç yapraklı genotiplerinden yüksek miktarda protoplast hücresi elde etmek ve optimum enzimatik sindirme koşulunu belirlemek amaçlarıyla Çizelge 3.11’de belirtilen farklı seviyelerde besin ortamı uygulanmıştır.

Çizelge 3.11. Yaprak protoplastlarının izolasyonunda kullanılan enzim-BH3 kültür ortamı kombinasyonlarıyla oluşturulan izolasyon koşulları

Uygulama	ES (ml)		0.6 M BH3 (ml)
1	3	+	6
2	3	+	8
3	3	+	10

Her genotipe ait yaprak örnekleri üzerine 0.6 M BH3 turuncgil protoplast kültür ortamı (Çizelge 3.10) eklenmiştir. BH3 ortamı eklendikten sonra enzimatik sindirmenin gerçekleşmesi için besin ortamı içerisinde bulunan kıyılmış yaprak parçaları üzerilerine hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış ve enzim solüsyonundan (0.7 M mannitol, 18.0 mM CaCl₂, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH₂PO₄, %1 Onozuka RS cellulaz, %1 Maceraz, %0.2 Pectolaz Y-23, pH 5.6) eklenmiştir. Yaprak hücrelerinden protoplast izolasyonu çalışması 3 genotip x 3 izolasyon koşulu x 3 tekrür olmak üzere Tesadüf Parselleri Faktöriyel Deneme Deseni’ne göre yürütülmüştür.

Enzim ve protoplast kültürü solüsyonu içerisinde yaprak parçacıklarını içeren petri kapları hücre duvarının parçalanması enzimatik sindirmenin gerçekleşmesi amaçlarıyla inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıya aktarılmıştır. Petri kapları 15-16 saat boyunca 26°C’de 40 rpm’de çalkalanmıştır (Şekil 3.34.).



Şekil 3.34. Yaprak mezofil protoplastı üzere yatay çalkalayıcıda inkübasyon

Enzimatik sindirmeden sonraki aşamalarda embriyogenik kallus kaynaklı ve yaprak mezofil kaynaklı protoplast izolasyon işlemleri birlikte yürütülmüştür. Enzimatik sindirmenin başarılı olup olmadığını görmek amacıyla petri kapları invert mikroskopta incelenmiştir. Petri kapları içerisinde bulunan enzim ve protoplast kültürü solüsyonunda protoplast hücreleri ile birlikte kallus ve yaprak parçaları da bulunduğu için protoplastları diğer bitki dokularından ayırmak amacıyla protoplast saflaştırma işlemi yapılmıştır.

3.2.4.4. Protoplastların Saflaştırılması ve Sayımı

Enzimatik sindirme sonrası, petri kapları içerisinde bulunan enzim ve protoplast kültürü solüsyonu içerisinde protoplast hücreleri ile birlikte kallus ve yaprak parçaları da bulunduğu için protoplastları diğer bitki dokularından ayırmak amacıyla protoplast saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminde filtrasyon ve santrifüj yöntemleri kullanılmıştır.

Saflaştırma işleminden protoplastların elektrofüzyon yolu ile birleştirilmesi süresince tüm aşamalar steril kabinde yürütülmüştür. Protoplast saflaştırma işleminde ilk olarak petri kapları içerisindeki enzimatik sindirme solüsyonu 40 µmesh'lik BD Falcon Cell Strainer (REF352340) filtreden geçirilerek pastör pipet yardımı ile 15 ml'lik steril falcon tüplerine aktarılıp 100 g devirde 4 dakika santrifüj edilerek hücrelerin tüpe pellet şeklinde çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant pellete dokunmadan dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Daha sonra pellet üzerine

yavaş bir şekilde kısım kısım toplam 5ml %25 sakkaroz içeren CPW besin çözeltisi (27.2 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l KNO_3 , 150 mg/l CaCl_2 , 250 mg/l MgSO_4 , 2.5 mg/l $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16 mg/l KI, 0.00025 CuSO_4 , pH 5.8) pellet çözündürülerek eklenmiştir. Daha sonra 2 ml %13 mannitol içeren CPW besin çözeltisi pastör pipet yardımıyla sakkaroz çözeltisi üzerine eklenmiştir. Böylece falcon tüpünde yoğunluk farkından dolayı iki faz oluşturulmuş ve 10 dakika 100 g de santrifujlenerek protoplast hücreleri oluşan iki faz arasına toplanmıştır. Canlılığı yüksek olan protoplastlar santrifujdan sonra iki faz arasında askıda kalmıştır (Şekil 3.35).

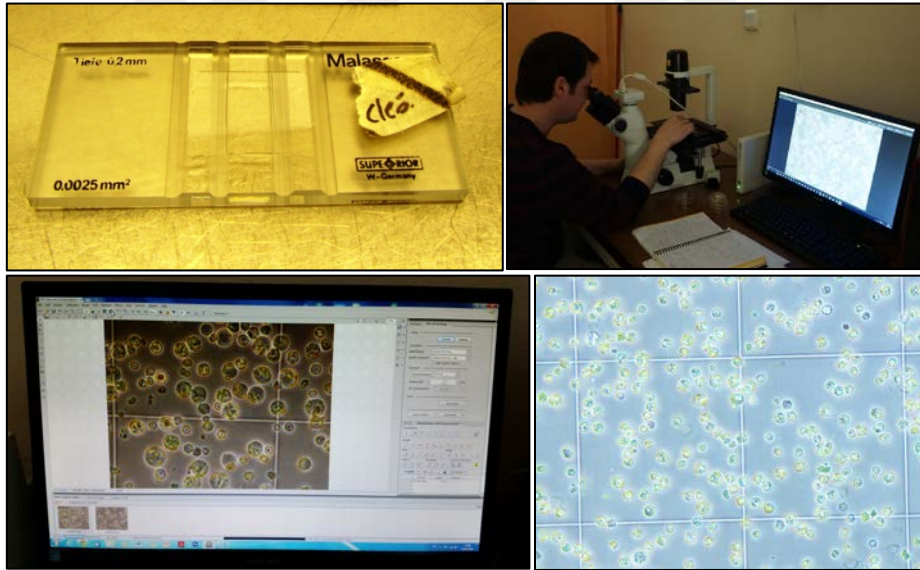


Şekil 3.35. CPW solüsyonları aracılığıyla santrifüj sonrası iki faz arasına toplanan embriyogenik kallus (solda) ve yaprak mezofil hücresi (sağda) kaynaklı protoplastlar

Protoplastlar pastör pipet yardımıyla iki faz arasından alınarak falcon tüplerine aktarılmış ve üzerine 15 ml protoplast yıkama solüsyonu (0.8 M Mannitol, 0.5 mM CaCl_2) eklenerek 4 dakika 100 g'de santrifujlenmiştir. Santrifuj sonrası protoplastlar pellet halinde dibe çöktürülüp, yıkama solüsyonu falcon tüpünden pastör pipet aracılığı ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi iki defa gerçekleştirilmiştir. Son yıkama işlemi sonrasında kalluslarda çökeltiye kadar,

yaprakta ise yeşilin yoğun olduğu yere kadar solüsyon çözeltisi atılmış ve kallusta 4 ml, yaprakta ise 1 ml protoplast yıkama solüsyonu eklenerek pellet sayım için çözündürülmüştür.

Protoplast sayımında hemasitometrik lamlar (Şekil 3.36) kullanılmıştır. Bu lam üzerine 1 ml protoplast çözeltisinden bir damla damlatılarak sayım preparatı oluşturulmuş ve 40 büyütme objektif ve 10 oküler kullanılarak mikroskopta incelenmiştir. Mikroskop ve sayım lamı yardımıyla protoplast hücreleri sayılarak Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11’de belirtilen farklı seviyelerdeki enzim solüsyonu ve süspansiyon kültürünün protoplast elde etme verimliliğine etkisi hemasitometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla protoplast/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. Protoplastların sayımında kullanılan lam ve protoplastların sayım aşamasından genel görüntüler

3.2.4.5. Protoplast Füzyonu

Bu tez çalışmasında embriyogenik kallus kaynaklı rejenere olabilme kapasitesine sahip protoplastlarla klorofil içeren yaprak mezofil protoplastlarının

füzyonu, elektrofüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrofüzyonun başarılı olabilmesini sağlamak üzere protoplast yoğunlukları kallus için 0.35×10^6 protoplast/ml, yaprak için 0.6×10^6 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (Dambier et al., 2011). Embriyogenik kallus hücrelerinden ve yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastlar belirtilen miktarlarda 0.8 M mannitol + 0.5 mM CaCl_2 izotonik protoplast solusyonu içerisinde son hacimlere getirildikten sonra elektrofüzyon işlemine geçilmiştir.

İstenilen protoplast yoğunluğu sağlandıktan sonra 60 x 15 mm petri kaplarının tam ortasına birleştirilmek istenen her iki ebeveynden 0.5 ml alınarak karıştırılmıştır. Füzyonu gerçekleştirecek jeneratör (Şekil 3.37) koşulları AC 20 V, DC 220 V, 1 MHz 35 μs olarak ayarlanmıştır. Füzyon jeneratörüne problar bağlanarak önce optimum füzyon koşulları için 20 s 20 V elektrik verilerek hizalama gerçekleştirilmiş, daha sonra 35 μs süresince 220 V üç kere verilerek füzyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ayrıca füzyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini görüntülemek ve doğrulamak amacıyla aynı işlemler ters objektifli mikroskop altında gerçekleştirilerek görüntüler kaydedilmiştir.



Şekil 3.37. Protoplast füzyonunda kullanılan prob ve füzyon jeneratöründen genel görüntüler

3.2.4.6. Heterokaryonların Kültürü ve Rejenerasyon Çalışmaları

Elektrofüzyon sonrasında heterokaryonlardan bitki rejenerasyonu Dambier ve ark. (2011)'e göre 6 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Elektrofüzyon sonrası protoplastların 2 hafta boyunca 28°C katı MT ortamı üzerinde 0.6 M BH3 sıvı ortamında kültürü.
2. Oluşan pro-embriyoların 1 ay süresince modifiye edilmiş 25 ml MT (0.15 M sukroz, 500 mg l⁻¹ malt ekstratı, %0.3 gelrite) besin ortamı içeren petri kaplarında kültüre alınması.
3. Embriyoların 0.15 M galaktoz içeren MT besin ortamında olgunlaştırılması.
4. Olgunlaşan embriyoların çimlendirme ortamına (MT + 0.1 M sorbitol + 0.1 M galaktoz + 500 mg l⁻¹ malt ekstratı + 1 µM GA3 + %0.3 gelrite) aktarılarak çimlenmenin sağlanması.
5. Çimlenen bitkiciklerin gelişmesi ve sürgün oluşturabilmesi için MT/2 + 0.1 M sorbitol + 0.1 M galaktoz + 0.3% gelrite ortamına aktarılması.
6. Bitkiciklerin gelişimi ve dış ortama adaptasyonuna geçilmeden önce gelişimlerini tamamlama için 5. maddedeki aynı besin ortamı içeren majenta kaplarına aktarılması.
7. Elektrofüzyon sonrası elde edilecek bitkilerde daha önce açıklanan yöntemle flow sitometri analizi yapılarak ploidi seviyelerinin belirlenmesi.

Füzyon işleminden hemen sonra heterokaryonlar 4.5 ml 0.6 M BH3 protoplast besin solüsyonu içerisinde agar üzerinde sıvı kültür tekniği prensibi esasına göre kültüre alınmıştır. Sıvı kültür olarak 0.6 M BH3, katı kültür olarak ise EME besin ortamı kullanılmıştır. Elektro füzyon işleminden hemen sonra katı ortam üzerinde sıvı kültür tekniğine göre karanlıkta kültüre alınarak mikroskop gözlemlerine başlanmıştır (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. Elektro füzyon işlemi sonrası katı ortam üzerinde sıvı kültür tekniği kullanılarak protoplastların ve heterokaryonların kültüre alınması

Kültüre alınmış heterokaryonların gelişme durumu günlük olarak gözlemlenmiştir. Kültürden 7 gün sonra gelişme görülen petriler içerisine 2 ml 0.6M BH3 sıvı kültür ortamı eklenmiş ve 16/8 saat aydınlık/karanlık ışıklandırma koşullarında kültür işlemi sürdürülmüştür. Heterokaryonlardan elde edilen mikrokalluslar elektro füzyon işlemi takip eden 30. gün sonunda 25 ml modifiye edilmiş MT besin ortamını (0.15 M sukroz, 500 mg l⁻¹ malt ekstratı, %0.3 gelrite) içeren petri kaplarında kültüre alınmıştır. Bu ortamda mikro kalluslardan embriyojenik kallus ve embriyo gelişimi sağlanmıştır. Bir ay süreyle olgunlaştırma ortamında tutulan embriyolarda çimlenmeyi sağlamak amacıyla ortam değişikliği yapılarak embriyolar MT + 0.1 M sorbitol + 0.1 M galaktoz + 500 mg l⁻¹ malt ekstratı + 1 µM GA₃ + %0.3 gelrite ortamına aktarılmıştır. Çimlenen bitkicikler, bitki gelişimi ve sürgün oluşumunu sağlamak amacıyla MT/2 + 0.1 M sorbitol + 0.1 M galaktoz + 0.3% gelrite ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyonu tamamlanan bitkicikler 7.5 g/L agar ile katılaştırılmış herhangi bir bitki büyümeyi düzenleyici içermeyen 45 ml MT/2 besin ortamı içeren magentalara aktarılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında; dünya pazarlarında yer bulabilecek verimli, yüksek kaliteli, özellikle çekirdeksiz ve iri meyveli mandarin çeşitleri ile üretim dönemini daha geniş bir zamana yaymak amacıyla özellikle geç dönemde olgunlaşan mandarin çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla fiziksel mutajen uygulaması; ploidi ıslahı yoluyla çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin ve portakal çeşitlerini geliştirmek için tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi amacıyla kimyasal mutajen uygulaması; ülkemiz ekolojik koşullarına uygun turunca alternatif yeni anaçların geliştirilmesine yönelik klasik ve somatik melezleme çalışmaları yürütülmüştür. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular dört ana başlık altında ele alınmıştır.

4.1. Gama Işını Uygulaması ile Mandarin Çeşitlerinde Popülasyonların Oluşturulması

Çalışmada, Hernandina klemantin mandarini ve Ortanique tangor çeşitlerinden alınan aşı gözü kalemlerine ⁶⁰Co kaynağı kullanılarak 50 gray akut gama ışın uygulaması yapılmıştır. Aşı gözleri uygulamadan hemen sonra yerli turunç (*Citrus aurantium* L.) anacı üzerine aşılanmıştır. Yerli turunç anacı üzerine aşılanan ve süren gözler M₁V₁ popülasyonunu oluşturmuştur. Gama ışın uygulaması yapılmış göz sayısı, uygulama sonrası yapılan aşılamalardan elde edilen fidan sayısı ve uygulama sonrası % canlılık oranı Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Gama ışını uygulaması sonrası aşılanan ve tutan göz sayıları

İşinlenen Çeşit	İşinlenen göz sayısı	Sürmüş göz sayısı	Canlılık oranı
Hernandina	29 adet	16 adet	%55.17
Ortanique	58 adet	35 adet	%60.34
<i>Ortalama</i>	<i>43.5 adet</i>	<i>25.5 adet</i>	<i>%57.76</i>

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi Hernandina mandarin çeşidinden alınan 29 adet aşı gözüne yapılan gama ışın uygulaması sonucu 16 göz sürmüş ve Hernandina çeşidinde uygulama sonrası canlılık oranı %55.17 olarak belirlenmiştir. Ortanique tangor çeşidinden alınan 58 adet aşı gözüne gama ışını uygulanmış ve uygulama sonrası yapılan aşılarından 35 tane sürerek M_1V_1 bitkilerini oluşturmuştur. Ortanique tangor çeşidinde aşı gözüne gama ışını uygulaması sonrası canlılık oranının %60.34 olduğu belirlenmiştir. Gama ışın uygulaması ile mandarin çeşitlerinde popülasyonların oluşturulması amacıyla çalışma genelinde ortalama 43.5 adet göz ışınlanmış ve bu gözlerden ortalama 25.5 adedi sürerek M_1V_1 popülasyonunu oluşturmuştur. Bu çalışmada iki farklı mandarin çeşidinde gerçekleştirilen mutasyon uygulamasında ortalama canlılık oranı %57.76 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Russo ve ark (1981), yapay mutasyonların turuncgil ıslahında kullanılması olanaklarını inceledikleri araştırmalarında, Monreal klemantin çeşidine 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 krad dozlarında gama ışını uygulamışlar ve 8 ve 10 krad dozlarını letal doz olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde Hearn (1984), Pineapple portakalı ile Duncan ve Foster altıntopu tohumlarına 10, 15, 20, 25 ve 30 Krad dozlarında gama ışını uygulamıştır. LD_{50} değerlerinin Pineapple için 10-15, Duncan için 15, Foster için 10 krad’dan düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca Tuzcu ve ark (1988), Fremont mandarini, Valencia portakalı, Redblush altıntopu, Kütdiken limonu ve Tuzcu 33-9 turuncunun aşı gözlerine Kobalt 60 kaynağı kullanılarak gama ışını uygulaması yapmışlardır. Araştırma sonucunda letal dozlar Fremont mandarini ve Valencia portakalında 58 gray; Tuzcu 33-9 turuncunda 72 gray ve Kütdiken limonunda 78 gray olarak belirlemişlerdir. Handaşi ve ark (2012), ‘Anana’, ‘Vietnam’ ve ‘Kara’ çeşitlerine 25 Gy, 30 Gy, 50 Gy, 70 Gy, 90 Gy dozlarında ^{60}Co kaynaklı gama ışını uygulamışlar ve optimum letal dozun bu çeşitlerde 70 Gy olduğunu belirtmişlerdir.

Bir yıl süre ile büyütülen, gelişen ve aşı gözü alınabilecek duruma gelen bitkilerden alınan gözler kullanılarak yapılan aşılama ile M_1V_2 popülasyonu oluşturulmuştur. Işınlama yoluyla elde edilen mutasyonun durulmasını sağlamak

amacıyla, son aşama olarak bu generasyondan aşı gözleri alınarak Carrizo sitranjı üzerine aşılanarak mutasyon ıslahının M_1V_3 aşamasına geçilmiş ve popülasyonu oluşturan fidan sayıları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Qi ve ark (2008), M_1V_3 aşamasında mutasyonun ve çekirdeksizliğin stabil hale geldiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. M_1V_3 popülasyonunu oluşturan fidan sayısı

Çeşit	Sürmüş göz sayısı (M_1V_2)	Sürmüş göz sayısı (M_1V_3)
Hernandina	83	363
Ortanique	174	852
Toplam	257	1215

Hernandina M_1V_2 popülasyonunu oluşturan 83 adet bireyden alınan aşı gözlerinin aşılanması sonucu M_1V_3 aşamasına geçilmiş ve 363 adet birey elde edilmiştir. Ortanique tangor çeşidinde ise 174 adet M_1V_2 aşamasında olan fidandan alınan aşı gözleri kullanılarak 852 bireylik M_1V_3 popülasyonu oluşturulmuştur (Çizelge 4.2).

Böylece, orta-erken ve orta-geç dönemde olgunlaşan yeni mandarin çeşitleri ile orta-geç, çekirdeksiz ve ihracata uygun yeni mandarin çeşitlerinin geliştirilmesi amaçları doğrultusunda M_1V_3 aşamasına getirilmiş Hernandina ve Ortanique çeşitlerine ait toplam 1215 adet birey elde edilmiştir. Fidanlar, Şubat 2017 tarihinde 4x1.5 m mesafeyle araziye dikilmiştir. Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerine ait mutant bitkilerin kültürel bakım işlemleri sürdürülmüştür. Gelişmekte olan fidanlar Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Hernandina ve Ortanique çeşitlerinden gama ışını uygulaması yoluyla elde edilmiş bitkilerle kurulmuş bahçeden genel görüntüler

4.1.1. Hernandina mutant popülasyonunda pomolojik analizler

Aşı gözü kalemlerine uygulanan akut gama ışını uygulaması sonucu elde edilen M_1V_3 aşamasındaki mutant bireylerle kurulan bahçede Eylül 2017 tarihinde yapılan gözlemlerde 363 adet mutant Hernandina fidanından 89 tanesinin 10 adedin üzerinde meyve tutumu sağladığı belirlenmiştir. Meyve tutumu gözlemlenen bireyler etiketlenerek Aralık 2017 tarihinde meyve örnekleri alınmış ve pomolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Deneme parselinde bulunan ışınlama uygulaması yapılmamış kontrol bitkilerinde ise meyve tutumu aynı yıl görülmediğinden dolayı bu bitkilerde pomolojik analizler yapılamamıştır. Ancak tez çalışmasından elde edilen pomolojik analizlere ait bulguların Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerinin standart çeşit özelliğini bu çalışmadan elde edilen verilerle karşılaştırmak amacıyla; Adana koşullarında, optimum hasat olgunluğunda olan ve bu çeşitlerin farklı bir bahçede bulunan ağaçlarından alınan meyve örneklerinde de pomolojik analizler yapılmıştır.

Popülasyonu oluşturan M_1V_3 Hernandina fidanlarından alınan meyve örneklerinde meyve ağırlığı (g), meyve yüksekliği (mm), meyve çapı (mm), meyve indeksi (en/boy), kabuk kalınlığı (mm), dilim sayısı (adet), tohum sayısı (adet), orta eksen çapı (mm), usare miktarı (%), suda çözünabilir kuru madde (SÇKM) miktarı (%), titre edilebilir asit miktarı (%), SÇKM/Asit oranı gibi ölçümle değerlendirilen

özellikler yanında, meyve dış görünüşü, meyve şekli, meyve kabuk yapısı, meyve kabuk rengi, meyve et rengi, meyve suyu rengi, meyve et tekstürü ve kabuğun ete bağlılığı gibi gözlemle değerlendirilen özellikler yapılan pomolojik analizlerle belirlenmiştir. İncelenen 89 M₁V₃ bitkisine ait pomolojik analiz sonuçları birey bazında EK 1 ve EK 2’de sunulmuştur.

Pomolojik analizlerden elde edilen 20 adet değişkene ait bulgular popülasyondaki varyansı gözlemleyebilmek ve farklı olan bireyleri belirlemek amacıyla tanımlayıcı istatistik ve dağılım analizlerine tabi tutularak değerlendirilmiştir. Pomolojik analizlerle incelenen 89 adet M₁V₃ bireyine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 4.3’de sunulmuştur.

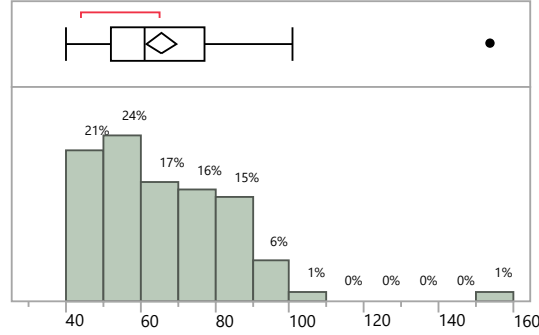
Çizelge 4.3. Hernandina mutant popülasyonunda incelenen pomolojik özelliklere ait maksimum, minimum, ortalama değerler ile standart hatalar

İncelenen özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart hata
Meyve Ağırlığı (g)	40.00	154.00	65.51	±18.51
Meyve Yükseliği (mm)	38.66	68.18	48.31	±5.27
Meyve Çapı (mm)	43.63	69.14	51.48	±4.96
Meyve Şekil İndeksi (en/boy)	0.91	1.26	1.07	±0.05
Kabuk Kalınlığı (mm)	1.88	8.49	3.06	±0.80
Dilim Sayısı (adet)	8.00	12.00	10.08	±0.79
Tohum Sayısı (adet)	0.17	11.00	3.93	±2.17
Orta Eksen Çapı (mm)	2.97	13.29	8.69	±2.03
Usare Miktarı (%)	12.00	46.35	35.62	±6.99
SÇKM (%)	9.50	15.40	11.89	±1.05
Titre Edilebilir Asitlik (%)	0.73	1.96	1.15	±0.22
SÇKM/Asit Oranı	5.56	15.16	10.71	±2.05
Meyve Dış Görünüşü	2.00	4.00	3.07	±0.33
Meyve Şekli	1.00	3.00	2.06	±0.31
Meyve Kabuk Yapısı	2.00	4.00	2.78	±0.52
Meyve Kabuk Rengi	6.00	7.00	6.65	±0.48
Meyve Et Rengi	4.00	4.00	4.00	±0.00
Meyve Suyu Rengi	4.00	4.00	4.00	±0.00
Meyve Et Tekstürü	1.00	3.00	2.26	±0.63
Kabuğun Ete Bağlılığı	1.00	3.00	1.99	±0.92

4.1.1.1. Meyve Ağırlığı (g)

Hernandina mutant popülasyonu içerisinde 89 adet bireyden alınan meyve örnekleri meyve ağırlığı bakımından incelendiğinde bireyler arasında yüksek varyasyon gözlemlendiği belirlenmiştir. Bireylerin minimum meyve ağırlığının 40.00 g, maksimum meyve ağırlığının 154.00 g ve popülasyon ortalama meyve ağırlığının 65.51 g olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3). Pomolojik özellikler bakımından incelenen 89 adet bireyin %21'inin meyve ağırlığı 40-50 g, %24'ünün 50-60 g, %17'sinin 60-70 g, %16'sının 70-80 g, %15'inin 80-90 g, %6'sının 90-100 g, %1'inin 100-110 g ve %1'inin 150-160 g arasında olduğu yapılan dağılım analizleri ile saptanmıştır (Şekil 4.2). Kontrol uygulaması olarak kabul edilen Adana ekolojik koşullarında yetiştirilen Hernandina çeşidinin meyve ağırlığı ise 80.00 g olarak bulunmuştur. Bu çalışmada M₁V₃ bitkilerinden alınan ilk yıl meyve örnekleri meyve ağırlığı bakımından incelendiğinde, bireylerin %23'lük bir kısmının meyve ağırlığının 80 g ve üzeri olduğu ve ileriki yıllarda tekrarlanacak pomolojik analizlerle Hernandina çeşidinden daha iri meyvelerin alınabileceği belirlenmiştir.

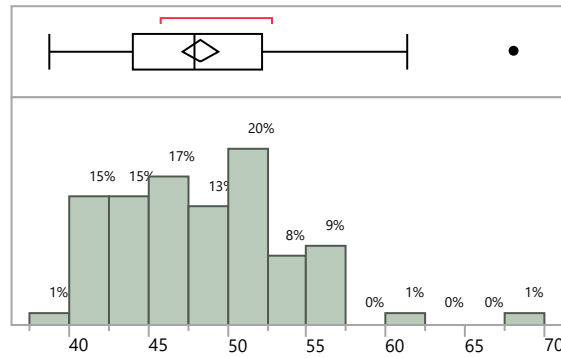
Mutasyon ıslahı yönteminin turuncgillerde olgunlaşma dönemi, çekirdeksizlik, meyve etinde renklilik gibi meyve kalite parametrelerinin yanında meyve iriliği ve dolayısıyla ağırlığına da olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Vardi ve Spiegel-Roy, 1988). Tang ve ark (1993), 'Hongjiangcheng' mandarininde tohum sayısını azaltmak amacıyla, sürgünlere 8 krad gama ışını uyguladıkları çalışmada ortalama meyve ağırlığı 122 gramın üzerinde olan bireyler elde etmişlerdir. Martiz ve Montanola (2012), Şili'de yürüttükleri turuncgil ıslah programı kapsamında mutasyon uygulaması yoluyla 14 mandarin çeşidinin meyve ağırlığı bakımından kontrol bitkilerinin üzerine geçerek ümitvar olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Grosser ve Gmitter (2016), mutasyon ıslahı yoluyla Valensiya portakal çeşidinde meyve iriliğini artırarak çekirdeksiz çeşitlerin geliştirildiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.2. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve ağırlığı (g) dağılımı

4.1.1.2. Meyve Yüksekliği (mm)

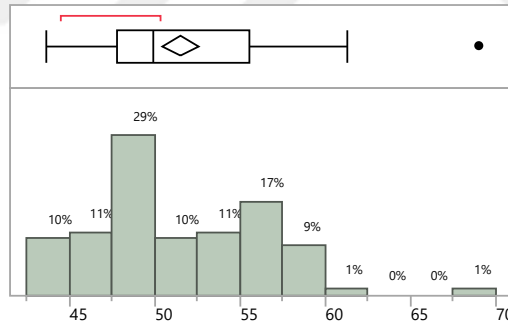
Çalışma sonunda Hernandina çeşidinin aşı gözlerinin ışınlaması yoluyla elde edilen popülasyonun 89 bitkisinde gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucu meyve yüksekliği 38.66 ile 68.18 mm arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Popülasyonun meyve yüksekliği ortalaması ise 48.31 mm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Şekil 4.3. incelendiğinde meyve örnekleri alınan bireylerin %60'ının meyve yüksekliği 40-50 mm, %37'sinin ise 50-60 mm arasında olduğu görülmektedir. Hernandina çeşidinin meyve yüksekliği ise 50.42 mm olarak belirlenmiş olup, popülasyonun %19'lık bir kısmından alınan meyve örneklerinde meyve yükseklik değerinin Hernandina çeşidinin üzerinde olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve yüksekliği (mm) dağılımı

4.1.1.3. Meyve Çapı (mm)

Meyve çapı bakımından pomolojik analizlere ait bulgulara yapılan tanımlayıcı istatistikler incelendiğinde, Hernandina mutant bireylerinin meyve çapı bakımından büyük varyasyon gösterdiği belirlenmiştir. Popülasyon içerisinde meyve çapı 43.63 ile 69.14 mm arasında değişim gösterirken popülasyon ortalama meyve çapı 51.48 mm olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonu oluşturan bireylerin %10'unun meyve çapı 42.5-45.0 mm, %11'inin 45.0-47.5 mm, %29'unun 47.5-50.0 mm, %10'unun 50.0-52.5 mm, %11'inin 52.5-55.0 mm, %17'sinin 55.0-57.5 mm, %9'unun 57.5-60.0 mm, %1'inin 60.0-62.5 mm ve %1'inin 67.5-70.00 arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Adana ekolojik koşullarında Hernandina çeşidinden alınan meyve örneklerinde ise meyve çapı 55.42 mm olduğu saptanmıştır. Çalışmada incelenen bireylerin %28'inden alınan meyve örneklerinde meyve çapının Hernandina çeşidine ait değerin üzerinde yer aldığı yapılan dağılım analizleriyle belirlenmiştir.

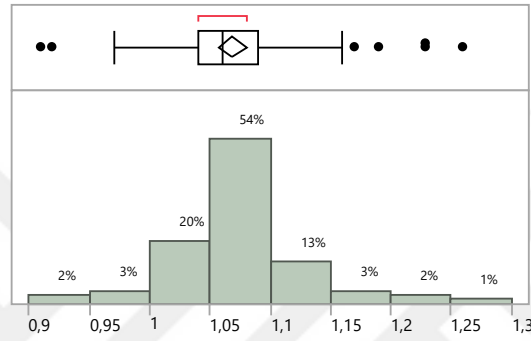


Şekil 4.4. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve çapı (mm) dağılımı

4.1.1.4. Meyve Şekil İndeksi (çap/yükseklik)

Hernandina M₁V₃ bitkileri içerisinde meyve tutumu gözlemlenen 89 bitkiden alınan meyve örnekleri incelendiğinde, popülasyon içerisinde meyve indeksi bakımından yüksek bir varyasyonun olmadığı gözlemlenmiştir. Popülasyonun meyve şekil indeksi 0.91 ile 1.26 arasında değişim göstermiş,

ortalama meyve şekil indeksi ise 1.07 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonu oluşturan bitkilerden alınan meyve örneklerinin %54'ünün meyve şekil indeksi 1.05 ile 1.10, %20'sinin ise 1.00-1.05 arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Hernandina çeşidinden alınan meyve örneklerinde ise meyve şekil indeksinin 1.09 olduğu gözlemlenmiştir.

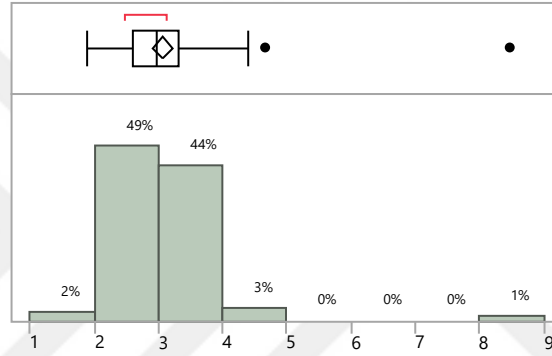


Şekil 4.5. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve şekil indeksi dağılımı

4.1.1.5. Kabuk Kalınlığı (mm)

Popülasyonu oluşturan bitkilerden alınan meyve örneklerinde kabuk kalınlığının 1.88 ile 8.49 mm arasında değişim gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonun ortalama kabuk kalınlığı ise 3.06 mm olarak belirlenmiştir. Yapılan dağılım analizi sonuçlarına göre kabuk kalınlığı bakımından popülasyon varyansının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bireylerin %2'sinin kabuk kalınlığının 1-2 mm, %49'unun 2-3 mm, %44'ünün 3-4 mm, %3'ünün 4-5 mm ve %1'inin 8-9 mm arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6). Hernandina çeşidinden alınan meyve örneklerinde kabuk kalınlığının 3.15 mm olduğu saptanmıştır. Popülasyonda incelenen bireylerin %51'inden alınan meyve örneklerinde kabuk kalınlığı değerinin, Hernandina çeşidinin altında olduğu saptanmıştır. Turuncgillerde mutasyon ıslahı çalışmalarında meyve kabuk kalınlığının, renginin ve pürüzlülüğün etkilendiği bildirilmiş, mutasyon uygulamasının diğer birçok meyve kalite

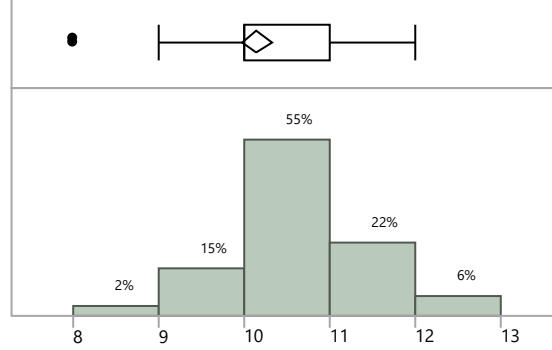
parametresi gibi meyve kabuk yapısı üzerine de etkili olduğu belirtilmiştir (Donini, 1992). Bu tez çalışmasında popülasyonun önemli bir kısmının meyve kabuk kalınlığı standart çeşit özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Ancak popülasyon içerisinde bazı bireylerin kabuk kalınlığında değişim olduğu gözlemlenmiştir. Bireylerin %2’lik bir kısmının kabuk kalınlığının önemli ölçüde azaldığı diğer yandan %1’inin kabuk kalınlığında yüksek bir artış olduğu, pomolojik verilerde gerçekleştirilen dağılım analizleri ile belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda kabuk kalınlığı (mm) dağılımı

4.1.1.6. Dilim Sayısı (adet/meyve)

Hernandina M₁V₃ bitkileriden alınan meyve örnekleri incelendiğinde, dilim sayısının 8 ile 12 adet arasında değişim gösterdiği ve ortalama dilim sayısının 10.08 ± 0.79 adet olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Popülasyonu oluşturan bireylerin %2’sinin dilim sayısının 8 adet, %15’inin 9, %55’inin 10, %22’sinin 11, ve %6’sının 12 adet dilim sayısına sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7).

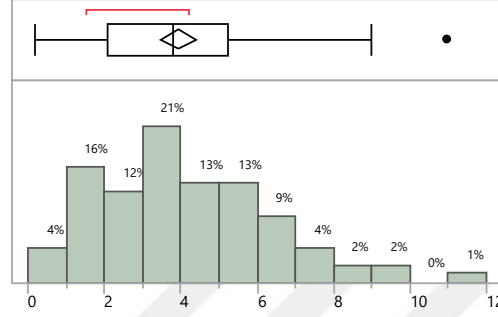


Şekil 4.7. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda dilim sayısı (adet) dağılımı

4.1.1.7. Tohum Sayısı (adet/meyve)

Tez çalışmasının kapsamında Hernandina mandarin çeşidinin aşısı gözlerine gama ışını uygulaması yapılarak elde edilmiş M₁V₃ bitkilerinden oluşan popülasyonda 89 bireyden alınan meyve örnekleri tohum sayısı bakımından açıkta serbest tozlanma koşullarında değerlendirilmiştir. Bireylerin tohum sayısı bakımından yüksek varyasyona sahip olduğu, meyve başına düşen tohum sayısının 0.17 ile 11.00 adet arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalamasının ise 3.93 ± 2.17 adet olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Değerlendirilen popülasyon içerisindeki 89 bireyin %4'lük bir kısmının tohum sayısının 0-1 arasında olduğu belirlenmiştir. Bireylerden %16'sının 1-2 adet, %12'sinin 2-3 adet, %21'inin ise 3-4 adet tohum içerdiği saptanmıştır. Yapılan ilk yıl gözlemlerine göre incelenen bireylerin %53'ünün ticari çekirdeksiz (tohum sayısı ≤ 4) olduğu belirlenmiştir. Popülasyonun %47'sinin tohum sayısı ise 4 ve 4'ün üzeri olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Adana ekolojik koşullarında Aralık 2017 tarihinde Hernandina çeşidinden alınan meyve örneklerinde yapılan pomolojik analizler sonucunda çeşidin açıkta serbest tozlanma koşullarında çeşidin tohum sayısının 7.65 adet/meyve olduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen M₁V₃ Hernandina bitkilerinden ilk yıl alınan meyve örneklerinin önemli bir kısmının

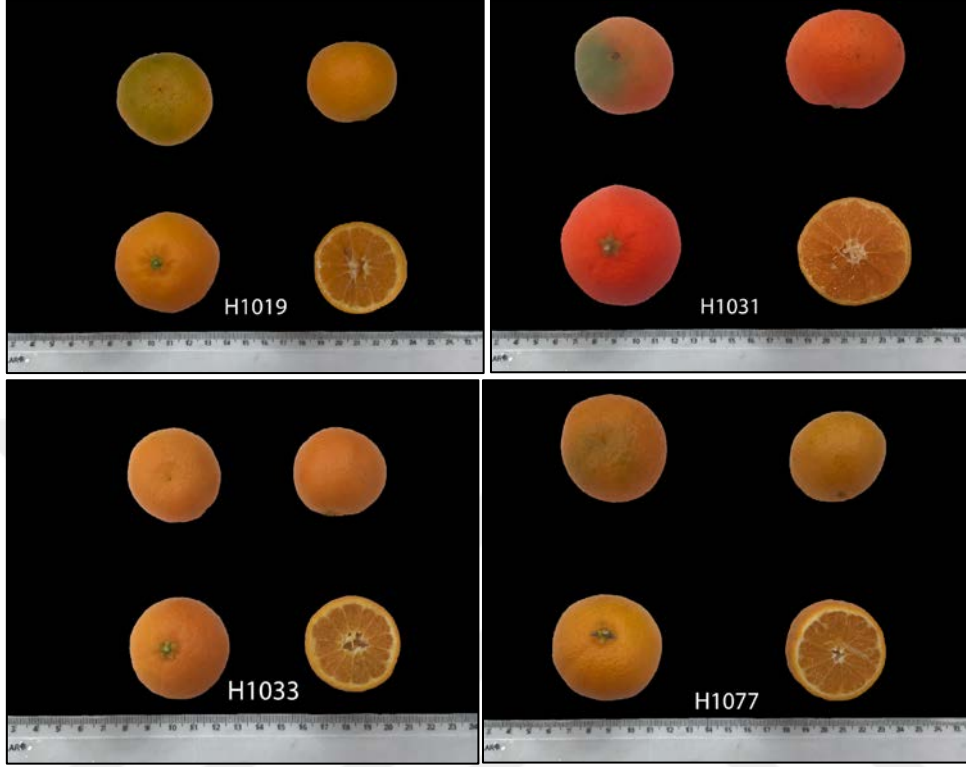
tohum sayısının Hernandina çeşidinin tohum sayısının altında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda tohum sayısı (adet) dağılımı

Kaliforniya-Riverside koşullarında açıkta serbest tozlanan Hernandina mandarin çeşidinin meyve başına düşen tohum sayısının ortalama 15.30, bu çeşidin Adana-Çukurova Üniversitesi koşullarında açıkta serbest tozlanan meyvelerinde ise tohum sayısının, yıllara göre değişmekle birlikte 7-16 adet arasında olduğu bilinmektedir. Hernandina M₁V₃ popülasyonu içerisinde ilk yıl gözlemi yapılarak değerlendirilen mutantlar içerisinde H1019, H1031, H1033 ve H1077 kodlu bireylerinin ortalama tohum sayıları sırasıyla 0.5, 0.17, 0.86 ve 0.75 adet olarak belirlenmiştir. Bireylerin meyve görüntüleri Şekil 4.9’da sunulmuştur. Mutasyon ıslahı yöntemi ile turuncgillerde olgunlaşma dönemi, çekirdeksizlik, meyve etinde renklilik, meyve iriliğinin ve verimin artışı gibi birçok olumlu özelliğin ortaya çıkarılması sağlanmıştır. Russo ve ark (1981), Monreal klemantin çeşidi kalemlerine 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 krad dozlarında gama ışını uygulamışlardır. Çalışma sonucunda ticari anlamda çekirdeksiz meyveleri olan bireyler (4-5 tohumlu) elde etmişlerdir. Kontrolde ise ortalama 20 adet tohum bulunmuştur. Hearn (1984), Pineapple portakalı ile Duncan ve Foster altıntopu tohumlarına gama ışını uyguladığı çalışmada az sayıda tohum içeren mutantların yanında tohumuz mutantlar da elde etmiştir. Froneman ve ark (1996), gama ışınlarını kullanarak

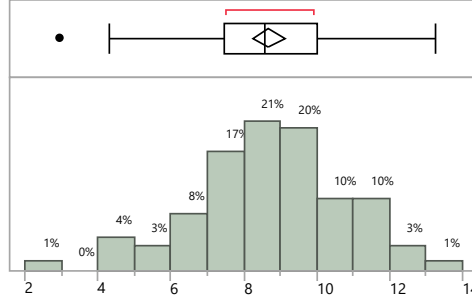
tohumsuz turunçgil çeşitleri elde etmek amacıyla şadok, mandarin ve göbekli portakallar çeşitlerini gama ışınına tabi tutmuşlar, çalışma sonucunda 13 adet tohumsuz tip geliştirmişlerdir. Monreal klemantin mandarinin ışınlanmasıyla çekirdeksiz 'Monreal Verde' elde edilmiştir (Nicotra, 2001). W Murcott'un ışınlanmasıyla tohumsuz 'Tango' elde edilmiştir (Roose ve Williams 2006). Williams (2012), 'Kaliforniya Üniversitesi'nde yürütülen turunçgil ıslah programlarında mutasyon uygulamasının önemli bir yeri olduğunu ve ışınlama uygulamasıyla 'Tango', 'DaisyLS', 'KinnowLS', ve 'FairchildLS' gibi birçok tohumsuz yeni mandarin çeşitlerinin geliştirildiğini belirtmektedir. Candemir (2006), gama ışını uygulamasıyla geliştirilmiş olan Robinson, Nova ve klemantin mandarinini ile Henderson altıntop tiplerinde tohum sayısının önemli ölçüde azaldığını saptamıştır. Benzer şekilde Kafa ve ark (2012), 'Nova' ve 'Robinson' mandarin çeşitlerinin aşı gözü kalemlerine yaptıkları ışınlama uygulamasından elde ettikleri mutant bireylerde tohum sayısının kontrol bitkilerine kıyasla azaldığını bildirmiştir. Montanola ve ark (2015), 2007 yılında Şili'de başlattıkları mutasyon ıslahı programı kapsamında ışınlama yoluyla 164 tohumsuz tip elde ettiklerini ve bu bireylerde gözlemlerin sürdüğünü belirtmişlerdir. İtalya'da ise CREA adlı araştırma enstitüsünün kan portakalı ve tohumsuz mandarin geliştirme konuları üzerine yoğunlaştıkları turunçgil ıslah programı kapsamında Tarocco Meli, Moro M45 ve Sanguinello 49-5-5 portakalları ile Tardivo mandarin çeşidi aşı gözü kalemlerine 40 Gy dozunda gama ışını uygulanarak M_1V_3 aşamasında 2000 bitkilik bir popülasyon elde edilmiştir (Caruso ve ark, 2016).



Şekil 4.9. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda incelenen H1019, H1031, H1033 ve H1077 kodlu bireylere ait meyve fotoğrafları

4.1.1.8. Orta Eksen Çapı (mm)

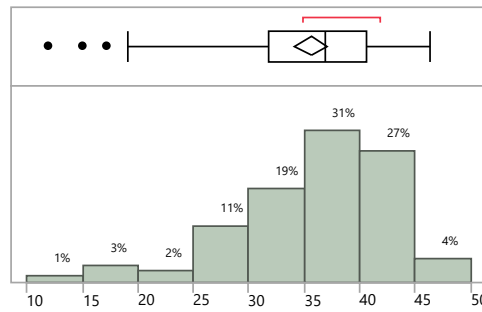
Tez çalışması kapsamında incelenen bireylerine ait meyvelerde orta eksen çapı bakımından yüksek varyasyon gözlemlenmiş olup, orta eksen çapları 2.97 mm ile 13.29 mm arasında değişim göstermiş ve popülasyon ortalaması 8.69 mm olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonu oluşturan bireylerin %1'inin meyvelerinde orta eksen çapı 2-3 mm, %4'ünün 4-5 mm, %3'ünün 5-6 mm, %8'inin 6-7 mm, %17'sinin 7-8 mm, %21'inin 8-9 mm, %20'sinin 9-10 mm, %20'sinin 10-12 mm ve %4'ünün 12-14 mm arasında değişim gösterdiği yapılan dağılım analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.10). Çalışmada Hernandina mandarin çeşidine ait meyvelerde orta eksen çapının 10.55 mm olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.10. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda orta eksen çapı (mm) dağılımı

4.1.1.9. Usare Miktarı (%)

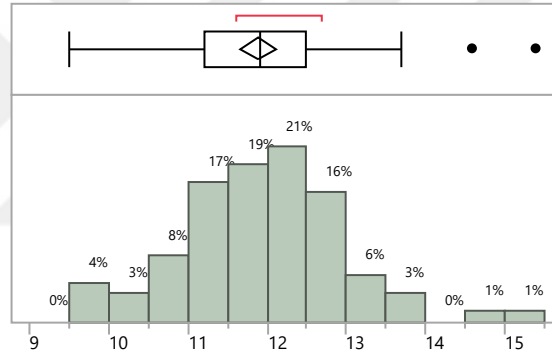
İncelenen Hernandina M_1V_3 bireylerinden alınan meyve örnekleri, % usare miktarı bakımından büyük bir varyasyon göstermiş olup, usare miktarı %12.00 ile %46.35 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.3). Popülasyonun ortalama usare miktarı ise %35.62 olarak belirlenmiştir. Popülasyonun %17'sinin usare miktarının %30'un altında olduğu saptanmıştır. Bireylerin %19'unun %30-35, %31'inin %35-40, %27'sinin %40-45, %4'lük bir kısmının ise %45-50 oranında usare miktarına sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.11). Adana ekolojik koşullarında Hernandina mandarin çeşidinden alınan meyve örneklerinde ise usare miktarının %40 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda usare miktarı (%) dağılımı

4.1.1.10. Suda Çözünabilir Kuru Madde (SÇKM) Miktarı (%)

Hernandina M_1V_3 popülasyonunu oluşturan bitkilerden alınan örnekler SÇKM bakımından incelendiğinde, 89 bireye ait SÇKM oranının %9.50 ile %15.40 arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalamasının %11.89 olduğu pomolojik analizlere uygulanan tanımlayıcı istatistiklerce belirlenmiştir (Çizelge 4.3). SÇKM oranı bakımından yüksek varyasyona sahip olan bireylerin %15'inin SÇKM oranı %9-11 arasında, %73'ünün ise %11-13 arasında, kalan bireylerin ise SÇKM miktarlarının %13 ile %15.5 arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). Hernandina çeşidinin ise SÇKM miktarının %10.00 ile popülasyon ortalamasının altında olduğu gözlemlenmiştir.

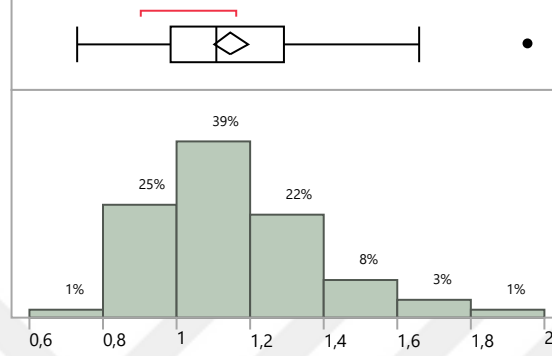


Şekil 4.12. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda SÇKM miktarı (%) dağılımı

4.1.1.11. Titre Edilebilir Asit Miktarı (%)

Titre edilebilir asit miktarı bakımından popülasyondan elde edilen meyve örnekleri incelendiğinde, değerlerinin %0.73 ile %1.96 arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalamasının %1.15 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3). Titre edilebilir asit miktarı Hernandina çeşidinde %0.80 olarak belirlenmiştir. İncelenen bireylere ait meyvelerin %25'inin titre edilebilir asit miktarı %0.8 ile %1.0 arasında olduğu, %39'unun ise %1.0 ile %1.2 arasında olduğu belirlenmiştir.

Bireylerin %22'si %1.2-1.4, %12'si ise %1.4-2.0 arasında titre edilebilir asit miktarına sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13).



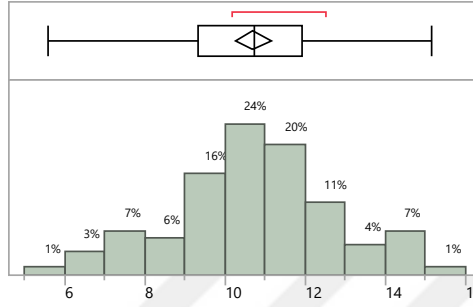
Şekil 4.13. Hernandina M1V3 popülasyonunda titre edilebilir asit miktarı (%) dağılımı

4.1.1.12. SÇKM / Asit Oranı

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen Hernandina M₁V₃ bitkilerinin SÇKM / Asit oranı ortalama 10.71 olarak belirlenmiş ve 5.56 ile 15.16 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.3). SÇKM / Asit oranı bakımından yüksek varyasyonun gözlemlendiği popülasyondan bireylere ait meyve örneklerinin SÇKM / Asit oranının %17'sinin 5-9 arasında, %16'sının 9-10, %24'ünün 10-11, %11'inin 12-13 ve %12'sinin 13-16 arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Çalışmada Hernandina mandarin çeşidinin Aralık 2017 tarihinde SÇKM/asit oranının 12.50 olduğu saptanmıştır. M₁V₃ bitkilerinden alınan meyve örnekleri SÇKM/asit oranı bakımından Hernandina çeşidiyle kıyaslandığında popülasyonun önemli bir kısmının Hernandina'dan daha düşük SÇKM/asit oranına sahip olduğu gözlemlenmektedir.

SÇKM / Asit oranı turunçgillerde önemli bir olgunlaşma ölçütüdür. Tez çalışmasının hedeflerinden biri mutasyon ıslahı yoluyla farklı dönemlerde olgunlaşan mandarin çeşitlerinin geliştirilmesidir. Bu bakımdan çalışmadan elde edilen M₁V₃ bitkilerinin olgunlaşma durumları değerlendirildiğinde, bireylerin

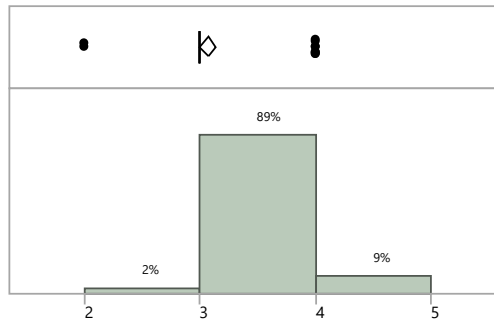
SÇKM / asit oranında yüksek varyasyon olduğu ve birbirinden farklılık gösterdiği yapılan dağılım analiziyle ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.14. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda SÇKM / asit oranı dağılımı

4.1.1.13. Meyve Dış Görünüşü

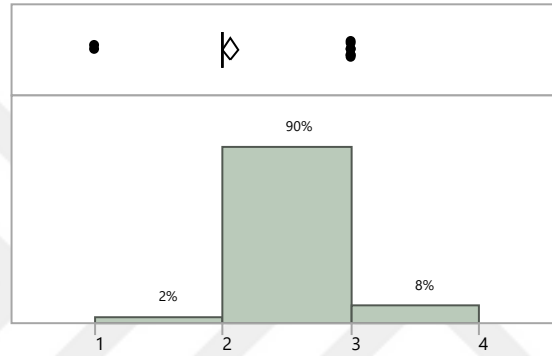
Çalışmada incelenen meyve örneklerinde ortalama meyve dış görünüşü orta (3.07 puan) bulunmuş ve meyvelerin dış görünüşü kötü (2.0 puan) ve güzel (4.0 puan) arasında sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.3). Meyve örnekleri incelenen bireylerin %9'unun meyveleri güzel olarak belirlenirken, %89'u orta ve %2'si kötü olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve dış görünüşü dağılımı

4.1.1.14.Meyve Şekli

Hernandina çeşidinin ışınlanmasıyla elde edilen M_1V_3 bitkileri meyve şekli bakımından incelendiğinde popülasyonun ortalama meyve şeklinin 2.06 puan ile basık yuvarlak olduğu belirlenmiştir. Meyve örneklerinin %90'ının basık yuvarlak (2.0 puan), %2'sinin basık (1.0 puan) ve %8'inin oval olduğu (3.0 puan) gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).



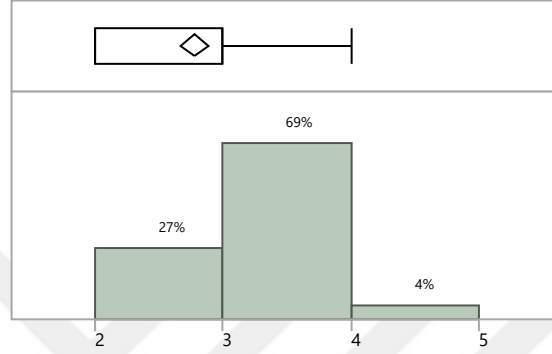
Şekil 4.16. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve şekli dağılımı

4.1.1.15.Meyve Kabuk Yapısı

Çalışma kapsamında yapılan pomolojik analizlerde M_1V_3 bitkilerinden alınan meyve örneklerinin meyve kabuk yapısının pürüzlü (2.0 puan), hafif pürüzlü (3.0 puan), ve pürüzsüz (4.0 puan) olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3). Dağılım analizlerine göre popülasyondan elde edilen meyve örneklerinin %69'unun meyve kabuk yapısı hafif pürüzlü olarak belirlenirken, %27'sinin pürüzlü ve %4'ü pürüzsüz olduğu saptanmıştır (Şekil 4.17).

Yapılan mutasyon çalışmalarında mutant çeşitlerde, yüksek verimlilik, erken olgunlaşma, kırmızımsı kabuk rengi, tohum sayısında azalma, yüksek kaliteli meyve, pürüzsüz meyve kabuğu, ağaç hacminde küçülme vb. farklı olumlu özellikler tespit edilmiştir. Turunçgillerde gerçekleştirilen bazı mutasyon çalışmalarında da yüksek verimlilik, erken olgunlaşma, kırmızımsı kabuk rengi,

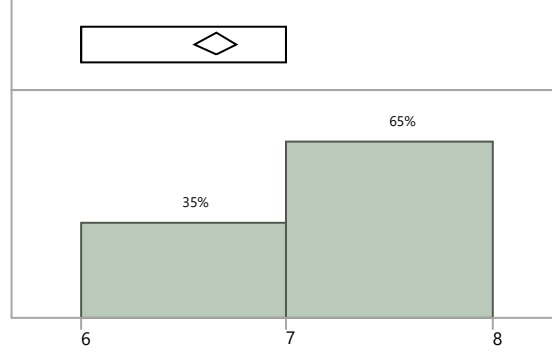
tohum sayısında azalma gibi özelliklerin yanında, meyve kalitesinde artış ve pürüzsüz meyve kabuğu gibi farklı olumlu özellikler tespit edilmiştir (Spiegel-Roy ve Kochba, 1973; Donini, 1992).



Şekil 4.17. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve kabuk yapısı dağılımı

4.1.1.16. Meyve Kabuk Rengi

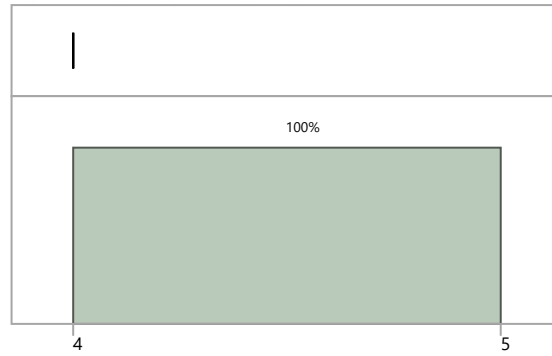
Popülasyondan elde edilen meyvelerde gerçekleştirilen analizler sonucu meyve kabuk renginin 6.0 (açık turuncu) ile 7.0 (turuncu) puan arasında değişim gösterdiği, popülasyon ortalamasının 6.65 puan aldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Meyve kabuk rengi bakımından popülasyonda yüksek varyasyon gözlemlenmemiş, meyve örneklerinin %35'inin meyve kabuk renginin açık turuncu (6.0 puan), %65'inin ise turuncu olduğu (7.0) saptanmıştır (Şekil 4.18). Spiegel-Roy ve Kochba (1973) turunçgillerde gerçekleştirilen mutasyon uygulamalarının meyve kabuk renginde değişimlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise Hernandina çeşidine gama ışını uygulaması sonucu elde edilen meyvelerin meyve kabuk rengi açık turuncu ve turuncu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve kabuk rengi dağılımı

4.1.1.17. Meyve Et Rengi

Hernandina M_1V_3 popülasyonu içerisinde 89 adet bireyde alınan meyve örneklerinde meyve et rengi bakımından herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Tüm bireylerden alınan örneklerin meyve et rengi 4.0 puan ile turuncu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19).

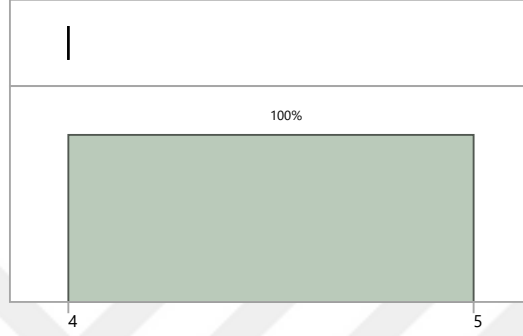


Şekil 4.19. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda meyve et rengi dağılımı

4.1.1.18. Meyve Suyu Rengi

M_1V_3 popülasyonundan yapılan örneklemede meyve et rengine benzer şekilde bireylerin meyve örneklerinde meyve suyu rengi bakımından bir fark

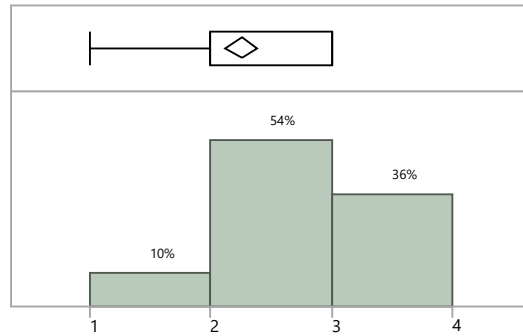
bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonu oluşturan bireylerden alınan tüm meyve örneklerinde meyve suyu rengi 4.0 puan ile turuncu olarak saptanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve suyu rengi dağılımı

4.1.1.19. Meyve Et Tekstürü

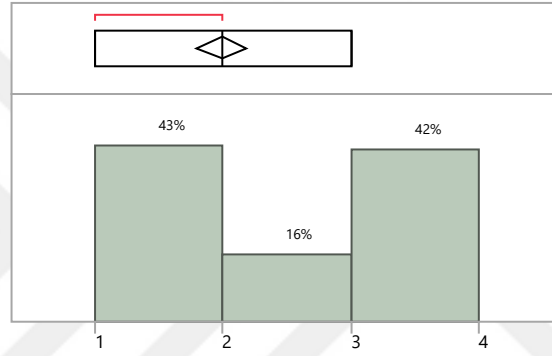
Çalışmada bireylerin meyve et tekstürü puanları minimum 1.0 (kaba), maksimum 3.0 (orta) ve ortalama 2.26 (ince) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Popülasyonun %54'ünün meyve et tekstürü 2.0 puan ile ince olarak belirlenmiş, %10'unun 1.0 puan ile kaba, %36'sının 3 puan ile orta olduğu saptanmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Hernandina M₁V₃ popülasyonunda meyve et tekstürü dağılımı

4.1.1.20.Kabuğun Ete Bağlılığı

Çalışmada gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucunda M_1V_3 bitkilerinden alınan meyve örneklerinde kabuğun ete bağlılığı 1.0 puan (gevşek) ile 3.0 puan (sıkı) arasında değişim göstermiş, popülasyon ortalaması ise 1.99 puan (orta) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Dağılım analizine göre popülasyonu oluşturan bitkilerin %43'ünün kabuğun ete bağlılık durumu gevşek, %16'sının orta ve %42'sinin sıkı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Hernandina M_1V_3 popülasyonunda kabuğun ete bağlılığı dağılımı

Tez çalışmasında Hernandina mandarin çeşidinin aşı gözü kalemlerine akut gama ışını uygulaması yoluyla çeşidin meyve kalite özelliklerinde farklılık yaratılmaya çalışılmıştır. Mutasyon uygulaması yoluyla oluşturulan Hernandina M_1V_3 bitki popülasyonunda ilk yıl 89 bireyde meyve tutumu gözlemlenmiş ve bitkilerden alınan meyve örneklerinde pomolojik analizler yürütülmüştür. Pomolojik analizler kapsamında incelenen 20 adet değişkenden elde edilen verilerde tanımlayıcı istatistik ve dağılım analizleri gerçekleştirilmiştir. Pomolojik analizlere ait bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, mutasyon uygulamasının incelenen bireylerin meyve özelliğinin birçoğunda farklılık yarattığı gözlemlenmiştir.

Meyve örneklerinde özellikle meyve ağırlığı, meyve uzunluğu ve meyve genişliği bakımından yüksek varyasyon olduğu ve mutasyon uygulamasının meyve iriliği bakımından bireyler arasında farklılık yarattığı saptanmıştır. Açıkta serbest tozlanma koşullarında pomolojik olarak incelenen bireylerin tohum sayıları 0.17 ile 11.00 arasında değişim göstermiş ve mutasyon uygulamasının bireylerin tohum sayılarında yüksek varyasyon yarattığı belirlenmiştir. Diğer yandan incelenen 89 bireyden alınan meyve örneklerinde SÇKM, asit miktarı ve SÇKM/Asit oranı bakımından yüksek varyasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bireyler arasında meyve et rengi ve meyve suyu rengi bakımından herhangi bir varyasyonun görülmediği saptanmıştır.

4.1.2. Ortanique Mutant Popülasyonunda Pomolojik Analizler

Aşı gözü kalemlerine uygulanan akut gama ışını uygulaması sonucu elde edilen M_1V_3 aşamasındaki mutant bireylerle kurulan bahçede Aralık 2017 tarihinde yapılan gözlemlerde 852 adet mutant Ortanique fidanından 68 tanesinin 10 adetinin üzerinde meyve tutumu sağladığı belirlenmiştir. Meyve tutumu gözlemlenen bireyler etiketlenerek Mart 2018 tarihinde meyve örnekleri alınmış ve pomolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Ortanique çeşidinin ışınlanmasıyla elde edilen M_1V_3 popülasyonundan alınan meyve örneklerinde meyve ağırlığı (g), meyve uzunluğu (mm), meyve genişliği (mm), meyve indeksi (en/boy), kabuk kalınlığı (mm), dilim sayısı(adet), tohum sayısı (adet), usare miktarı (%), suda çözünebilir kuru madde (SÇKM) miktarı (%), titre edilebilir asit miktarı (%), SÇKM / asit oranı, meyve dış görünüşü, meyve şekli, meyve kabuk yapısı, meyve kabuk rengi, meyve et rengi, meyve suyu rengi, meyve et tekstürü ve kabuğun ete bağlılığı yapılan pomolojik analizlerle belirlenmiştir. İncelenen 68 M_1V_3 bitkisine ait pomolojik analiz sonuçları birey bazında EK 3 ve EK 4’de sunulmuştur.

Pomolojik analizlerden elde edilen 19 adet değişkene ait bulgular popülasyondaki varyansı gözlemleyebilmek ve farklı olan bireyleri belirlemek

amacıyla tanımlayıcı istatistik ve dağılım analizlerine tabi tutularak değerlendirilmiştir. İncelenen 68 adet M₁V₃ bireyine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

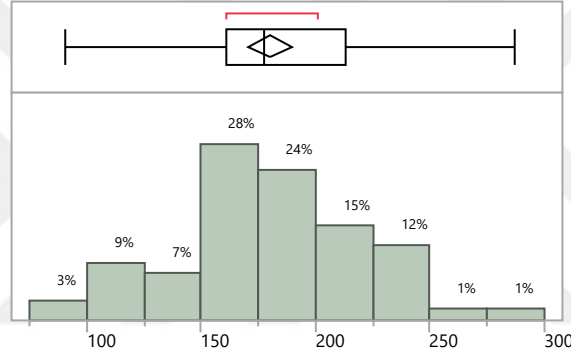
Çizelge 4.4. Ortanique mutant popülasyonunda incelenen değişkenlere ait maksimum, minimum, ortalama değerler ile standart hatalar

İncelenen özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart hata
Meyve Ağırlığı (g)	90.00	287.60	179.93	±39.49
Meyve Yüksekliği (mm)	48.45	72.80	62.41	±5.19
Meyve Çapı (mm)	56.72	84.79	72.79	±5.83
Meyve Şekil İndeksi (en/boy)	0.99	1.36	1.17	±0.05
Kabuk Kalınlığı (mm)	2.76	5.47	4.28	±0.55
Dilim Sayısı (adet)	8.00	12.00	10.67	±0.67
Tohum Sayısı (adet)	0.60	13.10	5.78	±2.85
Usare Miktarı (%)	42.59	58.89	51.29	±3.58
SÇKM (%)	8.70	12.00	10.12	±0.85
Titre Edilebilir Asitlik (%)	1.09	1.62	1.37	±0.13
SÇKM/Asit Oranı	5.96	9.20	7.46	±0.72
Meyve Dış Görünüşü	2.00	4.00	3.00	±0.17
Meyve Şekli	1.00	2.00	1.06	±0.24
Meyve Kabuk Yapısı	2.00	3.00	2.22	±0.42
Meyve Kabuk Rengi	6.00	7.00	6.66	±0.48
Meyve Et Rengi	4.00	4.00	4.00	±0.00
Meyve Suyu Rengi	4.00	4.00	4.00	±0.00
Meyve Et Tekstürü	1.00	3.00	1.56	±0.89
Kabuğun Ete Bağlılığı	3.00	3.00	3.00	±0.00

4.1.2.1. Meyve Ağırlığı (g)

Ortanique mutant popülasyonu içerisinde 68 adet bireyden alınan meyve örnekleri, meyve ağırlığı bakımından incelendiğinde bireyler arasında yüksek varyasyon gözlemlendiği belirlenmiştir. Bireylerin minimum meyve ağırlığının 90.00 g, maksimum meyve ağırlığının 287.60 g, popülasyon ortalama meyve ağırlığının ise 179.93±39.49 g olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Pomolojik

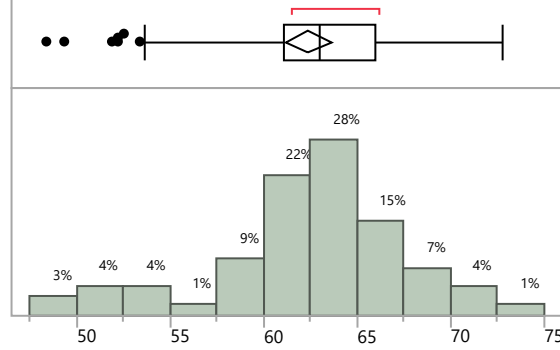
özellikler bakımından incelenen 68 bireyin %19'unun meyve ağırlığı 150 g'ın altında, %28'inin 150-175 g aralığında, %24'ünün 175-200 g, %27'sinin 200-250 g ve %2'sinin 250-300 g aralığında olduğu yapılan dağılım analizleri ile saptanmıştır (Şekil 4.23). Kontrol uygulaması olarak değerlendirilen Ortanique çeşidinin meyve ağırlığı ise aynı dönemde 194.73 g olarak bulunmuştur. Popülasyon dağılım analizi değerlendirildiğinde, bireylerin %29'unun meyve ağırlığı bakımından Ortanique çeşidinden önde olduğu gözlemlenmiş ancak büyük bir kısmının ise Ortanique çeşidinden daha düşük meyve ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.23. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve ağırlığı (g) dağılımı

4.1.2.2. Meyve Yüksekliği (mm)

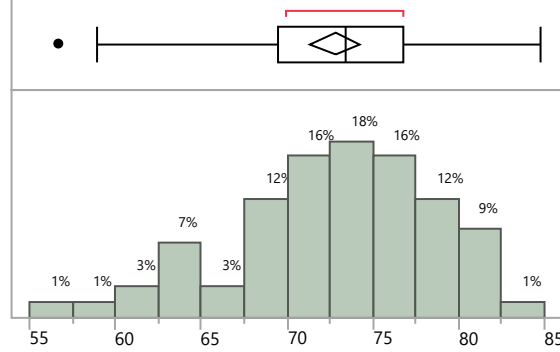
Popülasyonda yapılan örneklemelerde meyve yüksekliğinin 48.45 mm ile 72.80 mm arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalama meyve yüksekliğinin 62.41±5.19 mm olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Popülasyonun %8'lik bir kısmının meyve yüksekliğinin 50-55 mm arasında, %10'unun 55-60 mm, %50'sinin ise 60-65 mm arasında olduğu saptanmıştır. Popülasyonu oluşturan bireylerin %22'sinin meyve yüksekliği 65-70 mm arasında yer alırken, %5'inin ise 70-75 mm arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24). Ortanique çeşidinin meyve yüksekliğinin ise 60.70 mm olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.24. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve yüksekliği (mm) dağılımı

4.1.2.3. Meyve Çapı (mm)

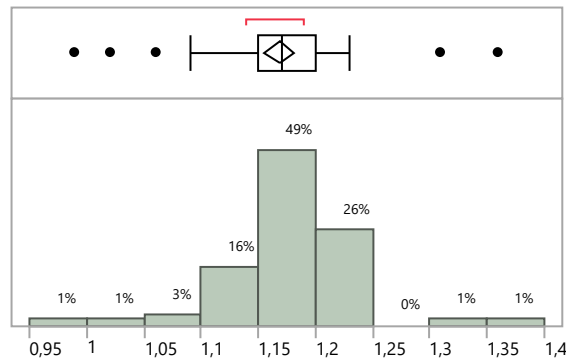
Ortanique M₁V₃ popülasyonundan alınan 68 adet bireyin meyve örnekleri meyve çapı bakımından incelendiğinde, meyve çapının 56.72 mm ile 84.79 mm arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalamasının 72.79 ± 5.83 mm olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Bireyler arasında meyve çapı bakımından 55-85 mm arasında dağılan yüksek varyasyonun gözlenmiştir. Bireylerden alınan meyvelerin %2'sinin meyve çapı 55-60 mm, %10'unun 60-65 mm, %15'inin 65-70 mm, %34'ünün 70-75 mm, %28'inin 75-80 mm ve %10'unun ise 80-85 mm arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.25). Çalışmada Ortanique çeşidinin meyve çapının 76.56 mm olduğu belirlenmiştir. M₁V₃ Ortanique popülasyonundan alınan meyve örnekleri meyve çapı bakımından değerlendirildiğinde, bireylerin %38'inin meyve çaplarının Ortanique çeşidinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve genişliği (mm) dağılımı

4.1.2.4. Meyve Şekil İndeksi (çap/yükseklik)

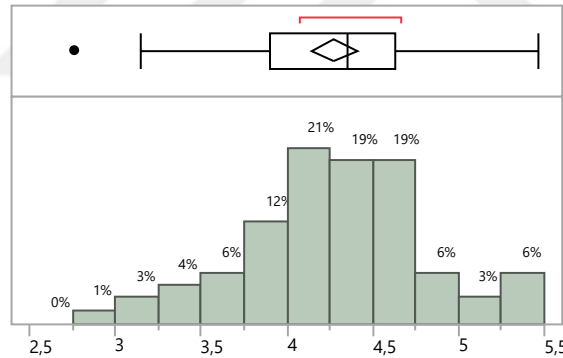
Popülasyonu oluşturan bireylerde meyve şekil indeksi bakımından yüksek bir varyasyon gözlemlenmemekle birlikte meyve şekil indeksi minimum 0.99 maksimum 1.36 ve ortalama 1.17 ± 0.05 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Şekil 4.25 incelendiğinde popülasyonun %49'unun meyve şekil indeksinin 1.15-1.20, %16'sının 1.10-1.15 ve %26'sının 1.20-1.25 aralığında olduğu görülmektedir. İncelenen bireylerin %5'lük bir kısmının meyve şekil indeksinin 0.95 ile 1.10, %2'lik kısmının ise 1.30 ile 1.40 aralığında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.26). Ortanique çeşsinde ise meyve şekil indeksi 1.26 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.26. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve indeksi (en/boy) dağılımı

4.1.2.5. Kabuk Kalınlığı (mm)

Ortanique M₁V₃ popülasyonundan 68 bitkide yapılan meyve örnekleri kabuk kalınlığı bakımından incelendiğinde popülasyonda yüksek bir varyasyon görüldüğü saptanmıştır. Ortanique mutantlarının kabuk kalınlığı ortalamasının 4.28 ± 0.55 mm olduğu ve 2.76 mm ile 5.47 mm arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). İncelenen bireylerin %1'inin kabuki kalınlığı 2.5-3.0 mm, %7'sinin 3.0-3.5 mm, %18'inin 3.5-4.0 mm, %40'ı 4.0-4.5 mm, %25'inin 4.5-5.0 mm ve %9'unun ise 5.0-5.5 mm arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.27). Çalışmada Adana ekolojik koşullarında Ortanique çeşidinden alınan meyve örneklerinde gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucunda çeşidin kabuk kalınlığının 4.27 mm ile popülasyon ortalamasına yaklaşık olarak eşit olduğu saptanmıştır. Popülasyonda incelenen bireylerin %47'sinde meyve örneklerinin kabuk kalınlığı değeri, Ortanique çeşidinden daha düşük olmuştur.

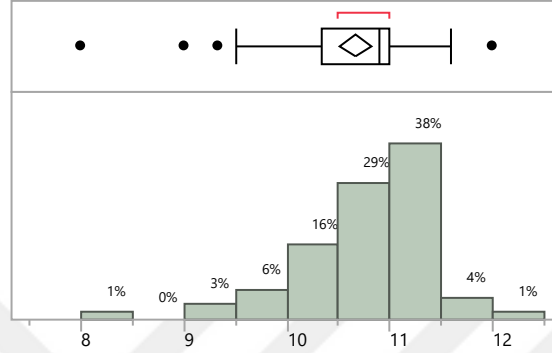


Şekil 4.27. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda kabuk kalınlığı (mm) dağılımı

4.1.2.6. Dilim Sayısı (adet)

Çalışmada incelenen 68 Ortanique mutantının dilim sayısı 8 adet ile 12 adet arasında değişim göstermiş, dilim sayısı popülasyon ortalamasının 10.67 ± 0.67 adet olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Popülasyonu oluşturan bireylerin %10'unun

dilim sayısı 8-10 adet, %45'inin 10-11, %43'ünün 11-12 arasında olduğu, %1'inin ise 12'den fazla olduğu yapılan dağılım analizleriyle belirlenmiştir (Şekil 4.28).

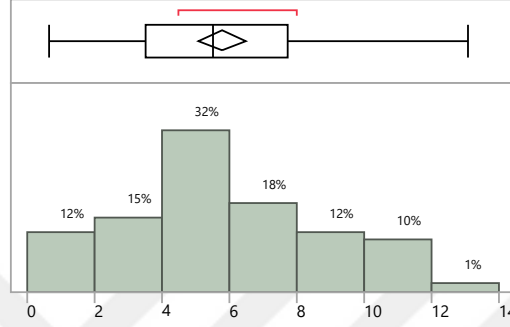


Şekil 4.28. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda dilim sayısı (adet) dağılımı

4.1.2.7. Tohum Sayısı (adet)

Çalışmada Ortanique çeşidinden elde edilen M₁V₃ popülasyonunu oluşturan bireyler arasında meyve tutan 68 tanesinin tohum sayısı incelenmiştir. Bireyler tohum sayısı bakımından oldukça yüksek bir varyasyon göstermiş, bireyler içerisinde meyve başına düşen tohum sayısı 0.6 adet ile 13.10 adet arasında değişim göstermiştir. Tohum sayısı popülasyon ortalamasının ise 5.78 ± 2.85 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Işınlama yoluyla elde edilmiş Ortanique M₁V₃ bitkileri içerisinde 68 adet bireyin %12'sinin tohum sayısı 0-2 adet olarak saptanmıştır. Bireylerin %15'inin ise tohum sayısının 2-4 arasında olduğu görülmüştür. 68 adet bireyin %27'sinin yapılan ilk yıl gözlemlerine göre açıkta serbest tozlanma koşullarında 'ticari çekirdeksiz' (≤ 4) olduğu belirlenmiştir. İncelenen bireylerin %32'sinin tohum sayısı 4-6 adet, %18'inin 6-8 adet, %12'sinin 8-10 adet, %10'unun 10-12 adet ve %1'inin 12-14 adet olduğu saptanmıştır (Şekil 4.29). Ortanique çeşidinde yapılan pomolojik analizler sonucu ortalama tohum sayısının meyve başına ortalama 10.70 adet olduğu belirlenmiştir. Değerlendirmeye alınan popülasyonda meyve başına düşen ortalama tohum sayısı

5.78 adet ile bu değerin altında bulunmuştur. Çalışmada bireylerin önemli bir kısmının Ortanique çeşidinden daha düşük tohum sayısına sahip olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 4.29. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda tohum sayısı (adet) dağılımı

Kaliforniya-Riverside koşullarında açıkta serbest tozlanan Ortanique mandarini çeşidinin meyve başına düşen tohum sayısının ortalama 15.30, Adana-Çukurova Üniversitesi koşullarında ise açıkta serbest tozlanan bu çeşidin meyve başına düşen tohum sayısının yıllara göre değişmekle birlikte 8-16 adet arasında olduğu bilinmektedir. Ortanique M₁V₃ popülasyonu içerisinde ilk yıl gözlemi yapılarak değerlendirilen bireyler içerisinde 2-88 ve 5-70 kodlu bireylerin (Şekil 4.30) ortalama tohum sayısı 0.60, 1-24 ve 5-90 kodlu bireylerinin ortalama tohum sayılarının 1 olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber elde edilen bu bulguların ilk yıl meyve örneklerine ait olduğu göz önüne bulundurulmalıdır.

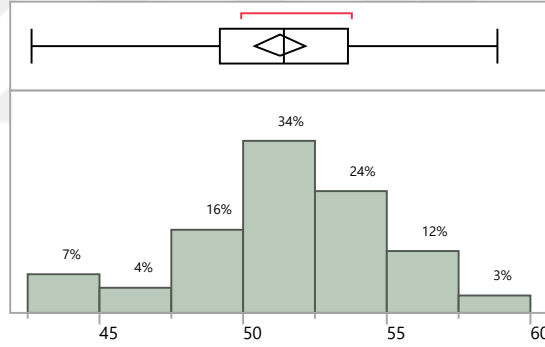


Şekil 4.30. 2-88 ve 5-70 kodlu Ortanique mutantlarının meyvelerinden genel görüntüler

Günümüzde bilinen ve ticari anlamda yetiştiriciliği yapılan turuncgil çeşitlerinin çoğu mutasyonlar sonucu meydana gelmiştir. Spontane olarak oluşan göz mutasyonu veya somaklonal varyasyonlar, gözlere mutagen uygulamasını izleyen yararlı değişikliklerin seleksiyonu yeni çeşitlerin geliştirilmesi için en etkin yaklaşım olmuştur. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda elde edilmiş ve ticari olarak değer bulmuş birçok çeşit vardır. Williams ve Roose (2008a), 10-20 çekirdek içeren W. Murcott mandarininden aşı gözüne uygulanan mutasyon ile meyve başına 1 ya da daha az çekirdek içeren Tango çeşidini ıslah ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar meyve başına ortalama 20-30 çekirdek içeren Daisy, Fairchild ve Kinnow mandarinlerinde, aşı gözü gama ışını uygulamasıyla meyve başına 2-3 çekirdek oluşturan Daisy SL, Fairchild SL ve Kinnow SL çeşitlerini ıslah ettiklerini bildirmişlerdir (Williams ve Roose, 2008b). Khalil ve ark (2011), Kinnow mandarininde ortalama çekirdek sayısının 25 olduğunu ve bu çekirdek sayısını 20 Gy doz uygulaması ile ortalama olarak 5 adet/meyve olacak şekilde azalttıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Çin’de, Meiguicheng portakal çeşidinin aşı gözü kalemlerine ⁶⁰Co kaynaklı 50 gray akut gamma ışını uygulaması sonucu çeşidin ticari çekirdeksiz mutant bireyi elde edilmiştir (Huang ve ark, 2017).

4.1.2.8. Usare Miktarı (%)

İncelenen Ortanique M_1V_3 bireylerinden alınan meyve örnekleri % usare miktarı bakımından incelendiğinde bu değişkenin %42.59 ile %58.89 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.4). Popülasyonun ortalama usare miktarı ise 51.29 ± 3.58 olarak belirlenmiştir. Popülasyonun %7'sinin usare miktarının %45'in altında olduğu, %20'lik bir kısmının %45-50 arasında, bireylerin %58'inin %50-55, %15'lik bir kısmının ise %55-60 oranında usare miktarına sahip olduğu yapılan dağılım analizleriyle belirlenmiştir (Şekil 4.31). Ortanique mandarin çeşidinden alınan meyve örneklerinde ise usare miktarının %49.86 olduğu saptanmıştır. M_1V_3 bitkilerinden alınan meyve örnekleri usare miktarı bakımından incelendiğinde bireylerin %73'ünün Ortanique mandarininden daha yüksek meyve suyu içerdiği gözlemlenmiştir.

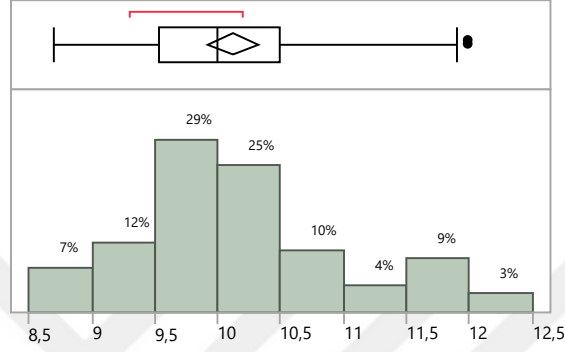


Şekil 4.31. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda usare miktarı (%) dağılımı

4.1.2.9. Suda Çözünabilir Kuru Madde (SÇKM) Miktarı (%)

Ortanique M_1V_3 popülasyonunu oluşturan bitkilerden alınan örnekler SÇKM bakımından incelendiğinde, 68 bireye ait SÇKM oranının %8.7 ile %12.00 arasında değişim gösterdiği ve popülasyon ortalamasının 10.12 ± 0.85 olduğu pomolojik analizlere uygulanan tanımlayıcı istatistiklerle belirlenmiştir (Çizelge 4.4). SÇKM oranı bakımından varyasyon görüldüğü popülasyonda incelenen

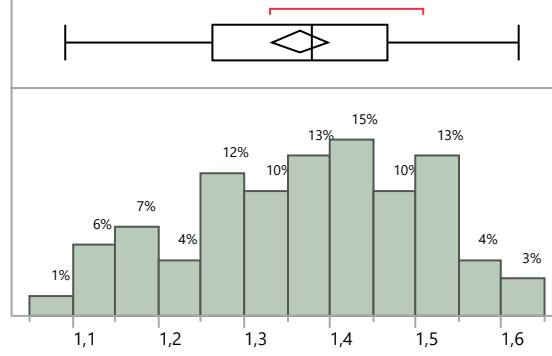
bireylerin %19'unun SÇKM oranı %8.5-9.5 arasında, %54'ünün %9.5-10.5 arasında, %14'ünün %10.5-11.5 arasında, kalan bireylerin ise SÇKM miktarlarının %11.5 ile %12.5 arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda SÇKM miktarı (%) dağılımı

4.1.2.10. Titre Edilebilir Asit Miktarı (%)

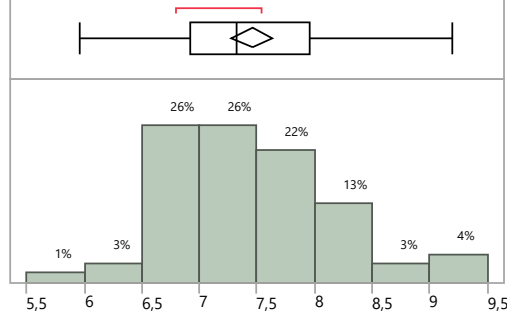
İncelenen bireylerin titre edilebilir asit miktarı %1.09 ile %1.62 arasında değişim göstermiş, ortalama titre edilebilir asit miktarı ise %1.37±0.13 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Popülasyon içerisinde titre edilebilir asit miktarı bakımından yüksek bir varyasyon gözlemlenmiş ve popülasyon dağılımı Şekil 4.33'de sunulmuştur. Bireylerin %13'lük bir kısmının titre edilebilir asit miktarı %1.1-1.2, %16'sının %1.2-1.3, %23'ünün %1.3-1.4, %25'inin %1.4-1.5, kalan bireylerin ise %1.5-1.6 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.33. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda titre edilebilir asit miktarı (%) dağılımı

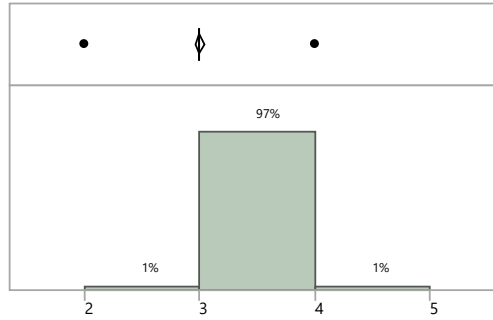
4.1.2.11. SÇKM/Asit Oranı

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen Ortanique M₁V₃ bitkilerinin SÇKM / Asit oranı ortalama 7.46 ± 0.72 olarak belirlenmiş ve 5.96 ile 9.2 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.4). SÇKM / Asit oranı bakımından yüksek varyasyonun gözlemlendiği popülasyonda bireylere ait meyve örneklerinin SÇKM / Asit oranının, %4'ünün 5.5-6.5, %26'sının 6.5-7.0, %26'sının 7.0-7.5, %22'sinin 7.5-8.0, %13'ünün 8.0-8.5 ve %7'sinin 8.5-9.5 arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34). Ortanique mandarin çeşidinde ise aynı dönemdeki meyve örneklerinde SÇKM / Asit oranı %8.39 olarak saptanmıştır. Popülasyonu oluşturan bireylerin %7'lik bir kısmından alınan meyve örneklerinde SÇKM / Asit oranının Ortanique çeşidinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 4.34. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda SÇKM/Asit oranı (%) dağılımı

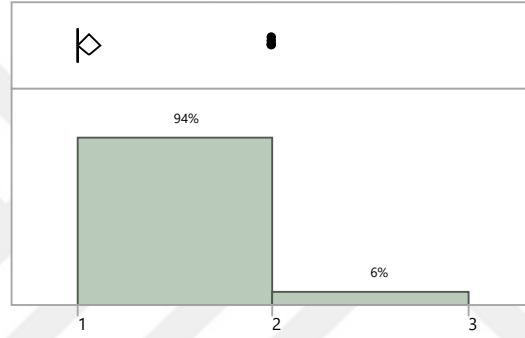
4.1.2.12. Meyve Dış Görünüşü

Ortanique M₁V₃ popülasyonunda birinci yıl meyve tutan 68 birey meyve dış görünüşü bakımından kalitatif olarak belirlenmiştir. Meyve örneklerinin dış görünüşü olarak incelenen bireyler arasında yüksek bir varyasyona rastlanmamıştır. Meyve dış görünüşünün ortalama 3 puan ile orta olduğu kalitatif olarak saptanmıştır. Şekil 4.35’de görüldüğü gibi değerlendirilen bireylerin %97’sinin meyve dış görünüşü orta (3 puan) olarak, %1’inin kötü, kalan bireylerin ise 4 puanla meyve dış görünüşü güzel olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.35. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve dış görünüşü dağılımı

4.1.2.13.Meyve Şekli

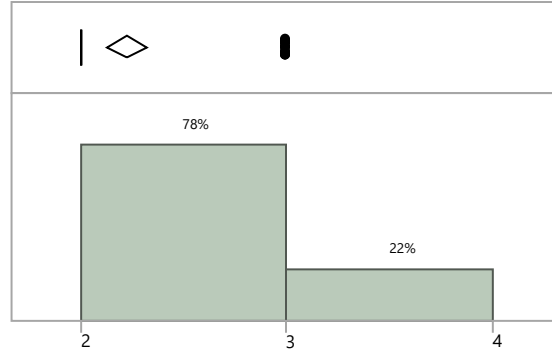
Ortanique M_1V_3 popülasyonundan alınan meyve örnekleri meyve şekli bakımından incelendiğinde sırasıyla 1 ve 2 puan alarak basık ve basık yuvarlak olarak belirlenmiş, popülasyon genelinin ise meyve şeklinin basık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Şekil 4.36’de de görüldüğü gibi popülasyonu oluşturan bireylerden alınan meyve örneklerinin %94’ü basık, %6’sı ise basık yuvarlak olarak gruplandırılmıştır.



Şekil 4.36. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve şekli dağılımı

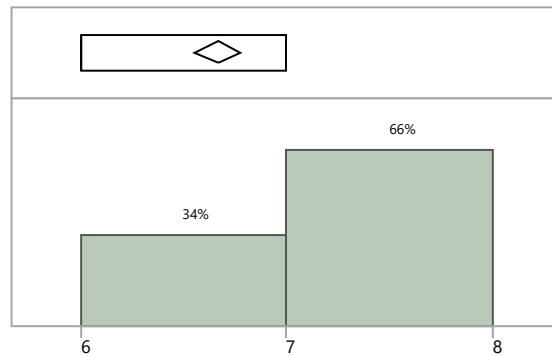
4.1.2.14.Meyve Kabuk Yapısı

Meyve kabuk yapısı bakımından incelenen 68 bireylik popülasyonda kabuk yapısı 2 ve 3 puanla sırasıyla pürüzlü ve hafif pürüzlü olarak saptanmış, popülasyon ortalamasının ise 2.22 puanla pürüzlü olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bireyler arasındaki dağılım incelendiğinde, bireylerin %78’inin meyve kabuk yapısı pürüzlü, %22’sinin ise hafif pürüzlü olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.37).

Şekil 4.37. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve kabuk yapısı dağılımı

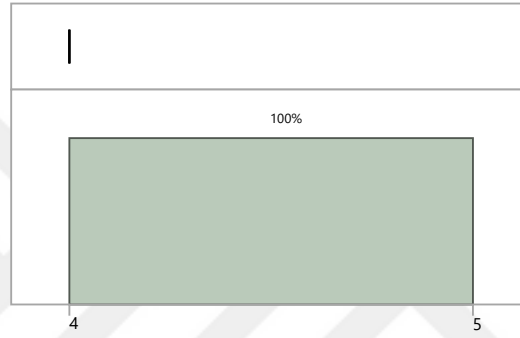
4.1.2.15. Meyve Kabuk Rengi

Ortanique M₁V₃ popülasyonunda gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucunda bireylerin meyve kabuk renginin minimum 6 maksimum 7 puan ile sırasıyla açık turuncu ve turuncu olduğu popülasyon ortalamasının ise 6.66 puan olduğu saptanmıştır. Bireyler içerisinde meyve kabuk rengi dağılımı incelendiğinde popülasyonu oluşturan bireylerin %34'ünün açık turuncu, %66'sının ise turuncu meyve kabuk rengine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.38).

Şekil 4.38. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve kabuk rengi dağılımı

4.1.2.16. Meyve Et Rengi

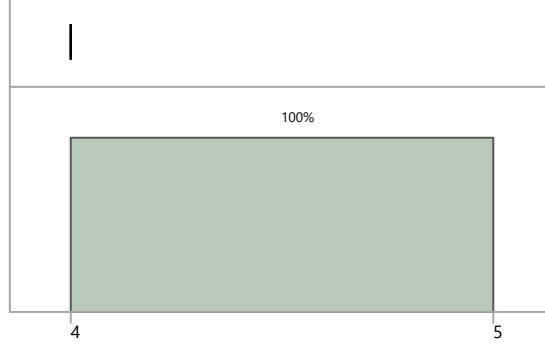
Ortanique M_1V_3 popülasyonu içerisinde 68 adet bireyde alınan meyve örneklerinde gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucunda meyve et rengi bakımından herhangi bir varyasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.4). Tüm bireylerden alınan örneklerin meyve et rengi 4.0 puan ile turuncu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.39).



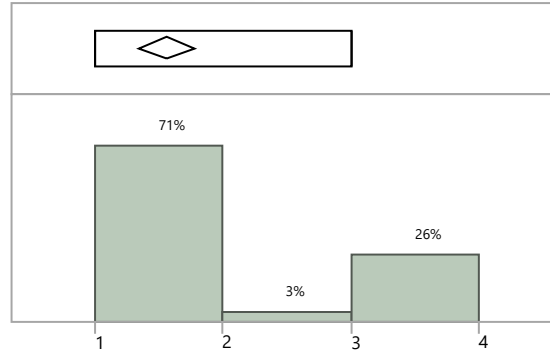
Şekil 4.39. Ortanique M_1V_3 popülasyonunda meyve et rengi dağılımı

4.1.2.17. Meyve Suyu Rengi

Ortanique M_1V_3 popülasyonundan yapılan örneklemede meyve et rengine benzer şekilde bireylerin meyve örneklerinde meyve suyu rengi bakımından herhangi bir varyasyon gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.4). Popülasyonu oluşturan bireylerden alınan tüm meyve örneklerinde meyve suyu rengi 4.0 puan ile turuncu olarak saptanmıştır (Şekil 4.40).

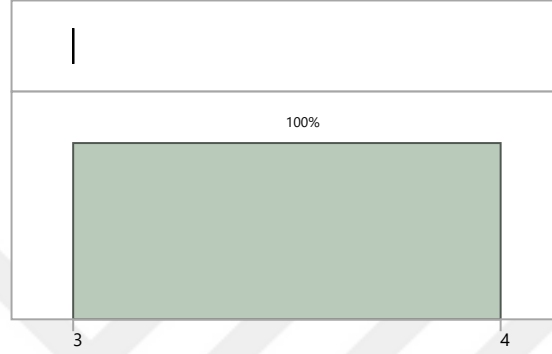
Şekil 4.40. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve suyu rengi dağılımı**4.1.2.18. Meyve Et Tekstürü**

Çalışmada bireylerin meyve et tekstürü puanları minimum 1.0, maksimum 3.0 ve ortalama 1.56 (orta) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4). Popülasyonun %71'inin meyve et tekstürü 1.0 puan ile kaba olarak belirlenmiş, %26'sının ise 3.0 puan ile orta olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.41).

Şekil 4.41. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda meyve tekstürü dağılımı**4.1.2.19. Kabuğun Ete Bağlılığı**

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi çalışmada gerçekleştirilen pomolojik analizler sonucunda M₁V₃ bitkilerinden alınan meyve örneklerinde kabuğun ete

bağlılığı bakımından varyasyon saptanmamış, bireylerin tümünde alınan meyve örneklerinde kabuğun ete bağlılığı 3.0 puan ile sıkı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Ortanique M₁V₃ popülasyonunda kabuğun ete bağlılığı dağılımı

Bu çalışmada Ortanique aşısı gözü kalemlerinin ışınlanmasıyla elde edilen M₁V₃ popülasyondan ilk yıl meyve bağlayan 68 bireyden alınan meyve örneklerinde gerçekleştirilen pomolojik analizlere ait bulgular tanımlayıcı istatistik ve dağılım analizleriyle yorumlanmıştır. Analizler genel olarak değerlendirildiğinde, mutasyon uygulamasının incelenen değişkenlerin birçoğunda varyasyon yarattığı gözlemlenmiştir.

Özellikle meyve iriliğini açıklayan meyve ağırlığı, meyve uzunluğu ve meyve genişliği değişkenleri bakımından yüksek varyasyon görülmekte ve mutasyon uygulamasının meyve iriliğinde bireyler arasında farklılık yarattığı saptanmıştır. Açıkta serbest tozlanma koşullarında pomolojik olarak incelenen bireylerin tohum sayıları 0.60 ile 13.10 arasında değişim göstermiş ve mutasyon uygulamasının bireylerin tohum sayılarında yüksek varyasyon yarattığı belirlenmiştir. Diğer yandan incelenen 68 bireyden alınan meyve örneklerinde SÇKM, asit miktarı ve SÇKM / Asit oranı bakımından farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Bireyler arasında meyve kabuk rengi, meyve et rengi, meyve

suyu rengi ve kabuğun ete bağlılığı değişkenlerinde herhangi bir değişim olmadığı saptanmıştır.

4.2. Kolhisin Uygulaması Yoluyla Tetraploid Ebeveynlerin Elde Edilmesi

4.2.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulaması

Bu tez çalışmasında W.Murcott ve Klemantin 22D mandarinleri ile Moro kan portakalının aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması yöntemiyle ploidi seviyesi 2x olan bitkilerden 4x bitki elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda 15.05.2014 tarihinde bir yıllık ilkbahar sürgünlerinden alınan 5 cm'lik aşı gözü kalemlerine %0.0, %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8 dozlarında 4, 6 ve 8 saat süreyle kolhisin uygulaması yapılmıştır. Kolhisin uygulaması, her çeşit ve tipten her doz için 30 göz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolhisin uygulaması esnasında kolhisin çözeltisi içerisinde bulunan aşı gözü kalemleri dakikada 60 defa olacak şekilde yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Uygulama süresi dolduktan sonra kolhisinli aşı gözü kalemleri iki defa sudan geçirilerek aşılanmıştır. Kolhisin uygulaması sonucu aşılanan gözler sürmeye başlamış ve 2 ay süreyle sera koşullarında yetiştirilmiştir.

4.2.1.1. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında % Canlılık Oranı

Kolhisin uygulaması, her çeşit ve tipten her doz ve uygulama süresi için 30 göz kullanılarak gerçekleştirilmiş ve deneme kapsamında tüm çeşitlere ait olarak toplamda 1350 adet göz kullanılmıştır. Uygulamadan sonra gözler Carrizo sitranjı üzere aşılanmış ve gözlerin sürmesi beklenmiştir. Gözler sürdükten sonra canlılık oranları (%) hesaplanmıştır. Uygulama sonucu W.Murcott ve Klemantin 22D mandarinleri ile Moro kan portakalına ait canlılık oranları Çizelge 3, 4 ve 5 'de sunulmuştur.

Çalışma sonunda yapılan varyans analizi sonuçları incelendiğinde W. Murcott mandarininin canlılık oranı üzerine kolhisin uygulama sürelerinin ($p<0.01$) ve dozlarının ($p<0.01$) istatistiksel olarak önemli etkisi olduğu görülmektedir. W.

Murcott mandarininin canlılık oranları dozlara göre farklılık göstermiş ve en yüksek canlılık oranının %0.0 kolhisin uygulamasında (%70.83), en düşük canlılık oranının ise %0.8 uygulamasında (%1.11) olduğu belirlenmiştir. Uygulama süresi bakımından ise % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sürelerinde sırasıyla %43.26, %29.67 ve %17.48 olarak bulunmuştur. Uygulama sonucunda W. Murcott mandarininde 4 ve 8 saat süreyle %0.8 kolhisin dozunda süren göz olmamış, bu dozun 6 saatinde ise canlı bitki oranı %3.33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucu W.Murcott mandarini canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	87.50	75.00	50.00	70.83 (58.13) a
0.2	56.67	46.67	20.00	41.11 (39.52) b
0.4	40.00	13.33	10.71	21.35 (26.60) c
0.6	32.14	10.00	6.67	16.27 (22.66) c
0.8	0.00	3.33	0.00	1.11 (3.51) d
Ortalama**	43.26 a (38.40)	29.67 ab (30.71)	17.48 b (21.14)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 9.724. LSD_{0.05}(doz), 12.552.

Parantez içindeki değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Aşı gözü kalemlerine yapılan uygulamada farklı kolhisin süre ve uygulama dozlarının Klemantin 22D mandarini canlılık oranı üzerine %99 güvenle istatistiksel olarak önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Klemantin 22D mandarinine ait % canlılık oranı dozlar bakımından incelendiğinde ortalama % canlılık %0.0 dozunda %66.67 olarak belirlenmiştir. Klemantin 22D mandarininin aşı gözü kalemlerine %0.8 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda hiçbir aşı gözü sürmemiş olup, bu dozda canlılık oranı %0.0 olmuştur. Uygulama süresi bakımından ise ortalama % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %31.33, 22.67 ve 16.67 olarak belirlenmiştir. En yüksek canlılık oranı %83.33 ile %0.0 dozunda 4 saat, en düşük canlılık oranları ise %0.8 dozunda 4, 6 ve 8 saat uygulama sürelerinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucu Klemantin 22D mandarinini canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	83.33	66.67	50.00	66.67 (55.24) a
0.2	26.67	23.33	23.33	24.44 (29.64) b
0.4	26.67	13.33	6.67	15.56 (22.50) bc
0.6	20.00	10.00	3.33	11.11 (18.52) c
0.8	0.00	0.00	0.00	0.00 (3.55) d
Ortalama**	31.33 a (30.95)	22.67 ab (24.71)	16.67 b (19.88)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 6.830. LSD_{0.05}(doz), 8.818.

Parantez içindeki değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Moro kan portakalının aşı kalemlerine kolhisin uygulaması sonucunda genel olarak mandarin çeşitlerine oranla daha fazla bitki elde edilmiş ve dolayısıyla canlılık oranları hem uygulama hem süre faktörleri bakımından W. Murcott ve Klemantin 22D mandarinlerinden daha yüksek olmuştur. Ayrıca farklı uygulama sürelerinin ($p<0.05$) ve dozlarının ($p<0.05$) canlılık oranı üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kolhisin dozu bakımından % canlılık oranları incelendiğinde %0.0 dozunda ortalama %75.00 canlılık, %0.8 dozunda ise ortalama %17.06 canlılık oranı belirlenmiştir. Moro kan portakalının aşı gözü canlılık oranları uygulama süreleri arttıkça azalmış, 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %50.33, 41.71 ve 29.57 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucu Moro kan portakalı canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama*
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	75.00	100.00	50.00	75.00 (65.03) a
0.2	66.67	36.67	40.00	47.78 (43.77) ab
0.4	53.33	30.00	20.00	34.44 (35.58) b
0.6	36.67	28.57	20.00	28.41 (32.06) b
0.8	20.00	13.33	17.86	17.06 (24.34) b
Ortalama*	50.33 a (45.12)	41.71 a (42.86)	29.57 b (32.49)	

*, 0.05 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 9.371. LSD_{0.05}(doz), 21.748.

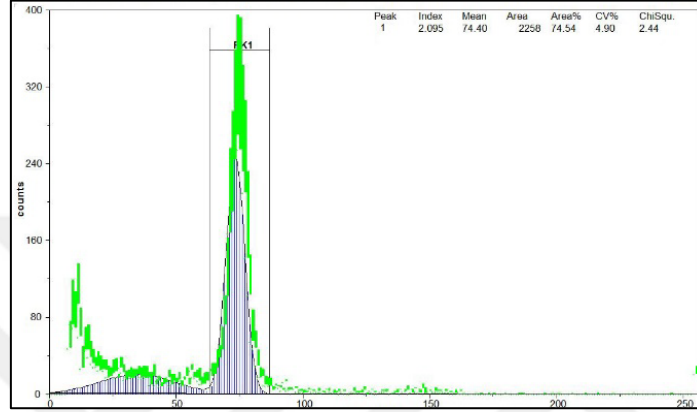
Parantez içindeki değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Çalışma sonunda farklı süre ve dozlarda yapılan kolhisin uygulaması sonucunda W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden toplam 1350 aşı gözünden sırasıyla 80, 58 ve 123 olmak üzere 261 adet fidan elde edilmiş ve ortalama canlılık oranı %19.33 olarak belirlenmiştir. Çeşitlerin aşı gözü kalemlerine yapılan kolhisin uygulaması sonucunda artan süre ve kolhisin dozlarına bağlı olarak % canlılık oranının azaldığı belirlenmiştir. Wakana ve ark (2005) Kizu ve Hanayu çeşitlerine %0.05, %0.1, %0.2, %0.4 ve %0.8 kolhisin dozlarını 6 saat; Yuzu çeşidine %0.05, %0.1, %0.2 ve %0.4 dozlarını ise 4, 8, 12 ve 16 saat uygulayarak tetraploid çeşit elde etmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda uygulama yapılan toplam 240 sürgünden 83 tanesinin sürdüğü ve canlılık oranının %34.58 olduğunu bildirilmiştir. Aleza ve ark (2009) sürgün ucu mikro aşılama yöntemi kullanarak kolhisin uygulamasında ‘Clemenules’ mandarin çeşidinde canlılık oranını %37.50 olarak saptamışlardır.

4.2.1.2. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi

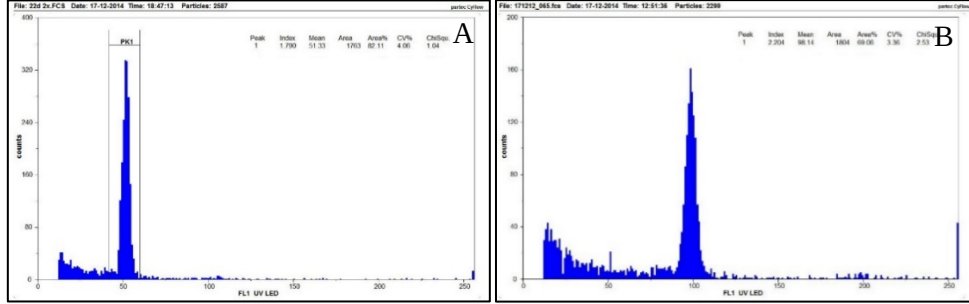
Aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması çalışmasında 1350 adet kolhisin uygulanmış göz aşılanmış, uygulama sonucu 261 adet göz canlılığını koruyarak fidan haline gelmiştir. Dolayısıyla çalışmada toplam 261 adet yaprak örneğinde flow sitometri yoluyla ploidi seviyesi tespiti gerçekleştirilmiştir. Örnek okumalarına geçilmeden her çeşide ait kolhisin uygulaması yapılmamış diploid yaprak örneklerinde okumalar yapılarak elde edilen piklerin 365 nm dalga boyundaki pik noktaları belirlenmiştir. Ayrıca kontrol ve karşılaştırma sağlamak amacıyla bir adet doğal triploid (Bearss laymı, 3x) ve bir adet yapay triploid çeşide (Oroblanco, 3x) ait yaprak örneklerinden elde edilen pik noktalarına ait florasın ışık yoğunlukları belirlenmiştir. Böylece, triploid yapıdaki Bearss laymı ve Oroblanco çeşidinin 365 nm UV Led kaynağının altında yaprak hücresi nükleus miktarlarının pik yaptığı ortalama değer standart referans olarak alınmıştır. Örneklerin ploidi seviyeleri referans nükleus miktarının verdiği ortalama ışımaya

yoğunluğu değeri ile kıyaslama yapılarak belirlenmiştir. Referans bitkinin yaprak hücresi nüklear DNA içeriği ve ışıma yoğunluk noktası Şekil 4.43'de görülmektedir.



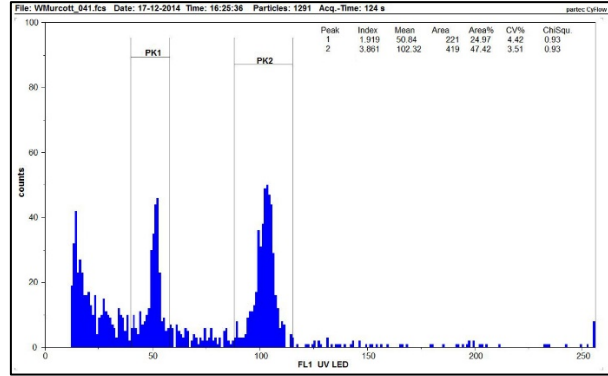
Şekil 4.43. Triploid (3x) standart referans olarak kullanılan Bearss laymına ait yaprak hücresi nüklear DNA içeriği

Kolhisin uygulaması yoluyla tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi çalışmasında W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerine ait toplam 261 adet yaprak örneğinde flow sitometri analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda Klemantin 22D mandarininden bir adet tetraploid (4x) bitki elde edilmiş olup, bu örneğe ve kolhisin uygulanmamış Klemantin 22D yaprak örneğine ait flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri Şekil 4.44'de sunulmuştur. Klemantin 22D mandarinine ait tetraploid birey, çeşidin aşı gözü kaleminin 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 4.44. Klemantin 22D mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri. A: 2x ploid seviyesinde Klemantin 22D mandarinini, B: 4x ploid seviyesinde Klemantin 22D mandarinine ait yaprak örnekleri

Çalışmada Moro kan portakalı çeşidinin aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucunda toplam üç adet bitkide mixoploid yapıda ($2x+4x$) olan birey belirlenmiştir. Bu sitokimerik yapıda olan üç bitki, Moro çeşidinin aşı gözü kalemine 6 saat süreyle %0.6, 8 saat süreyle %0.2 ve 8 saat süreyle %0.8 uygulaması sonucunda elde edilmiştir. Bununla birlikte W. Murcott mandarin çeşidinde de bir adet mixoploid yapıda olan $2x+4x$ bitki 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiştir (Şekil 4.45). Turunçgillerde *in vitro* ve *in vivo* kolhisin uygulamaları sonrası yapılan ploid seviyesi belirleme analizleri sonucunda; 1) uygulama yapılan bitkideki kromozom sayısı, 2) uygulama yapılan bitkinin kromozom sayısının iki katı, 3) Sitokimera kaynaklı mixoploid yapı (örn. $2X+4X$ ya da $X+2X$) olmak üzere üç durum gözlemlendiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wakana ve ark, 2005; Aleza ve ark, 2009). Taehyun ve ark (2016), satsuma mandarininde yürüttükleri çalışmada kolhisin uygulanmış gözleri üç yapraklı anacı üzerine aşılamış, oluşan sürgünlerde çok sayıda mixoploid birey elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da çeşitli süre ve dozlarda kolhisin uygulaması sonucunda diploid, tetraploid ve mixoploid kromozom seviyesine sahip bireyler tespit edilmiştir.



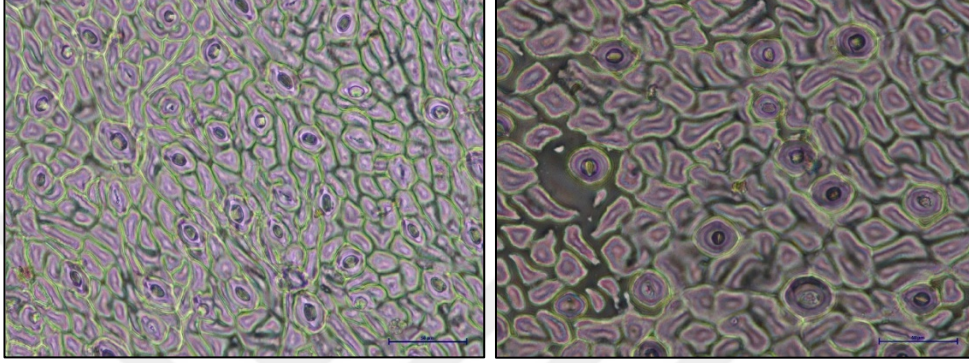
Şekil 4.45. 2x+4x mixoploid W.Murcott mandarininin yaprak hücresi nükleer DNA içeriği

Aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucunda 1350 adet uygulama yapılmış aşı gözü içerisinde Klemantin 22D mandarininde 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanmasıyla bir adet stabil tetraploid bitki elde edilmiş, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı çeşitlerinden ise toplam dört adet mixoploid bitki elde edilmiştir.

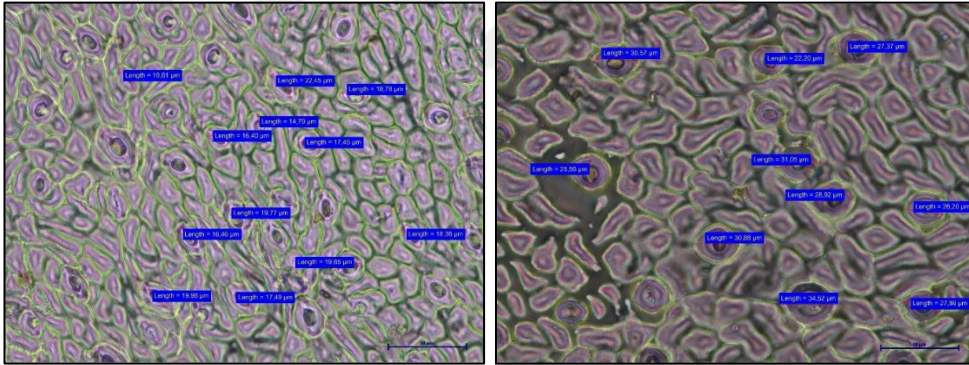
4.2.1.3. Aşı Gözü Kalemlerine Kolhisin Uygulamasında Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler

Tez çalışması kapsamında kolhisin uygulaması yapılan ve ploid seviyeleri bakımından farklılık gösterdiği flow sitometri ile belirlenen bitkilerde mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Bitkilerin yaprak stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, stoma büyüklüğü ve stoma indeksi değişkenleri incelenmiştir. Yaprak stoma yoğunluğunun belirlenmesi için stoma sayımlarında oje yöntemi kullanılmıştır (Usman ve ark, 2008). Yönteme göre stomaların bulunduğu yaprakların alt yüzüne mono nitro selüloz maddesi sürülmüş ve kurumalarını takiben alt epidermis bu madde ile birlikte sıyrılmış ve lamel üzerine yerleştirilerek 40 büyütme objektif ve 10 büyütme oküler ağ mikrometrede $200 \times 200 \mu\text{m}^{-2}$ 'deki stoma sayıları kaydedilmiştir. Stoma yoğunluğu her bitkiye ait 2 'şer yaprakta 2 okuma şeklinde sayılmıştır. Hazırlanan aynı preparatlar stoma uzunluğu ve

genişliği ölçümleri için de kullanılmıştır (Şekil 4.46). Stoma sayımları, stoma genişliği ve uzunluğu hazırlanan preparatlarda Nikon NIS-Elements v4.0 yazılımıyla kaydedilmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.46. Klemantin 22D mandarininin 2x (solda) ve 4x (sağda) ploidi seviyelerine sahip bitkilere ait yaprak stoma yoğunluk ve stoma büyüklüğü farkını gösteren görüntüler



Şekil 4.47. Klemantin 22D mandarininin 2x (solda) ve 4x (sağda) ploidi seviyelerine sahip bitkilerine ait stoma uzunluğu ve genişliği ölçümlerinden genel görüntüler

Klemantin 22D mandarininin diploid ploidi seviyesinde ve kolhisin uygulaması yoluyla elde edilmiş tetraploid ploidi seviyesindeki bitkilerin yaprak stoma karakteristikleri karşılaştırıldığı *t* testinde mm^{-2} 'ye düşen stoma sayısının diploid bitkide tetraploid bitkiye oranla daha yoğun olduğu görülmektedir. Stoma

büyüklikleri de karşılaştırıldığında tetraploid bitkinin yaprak stoma iriliğinin diploid bitkiye kıyasla daha büyük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Diploid (2x) ve tetraploid (4x) kromozom sayısına sahip Klemantin 22D mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	4x
Stoma yoğunluğu (adet/mm ²) ^{**}	475.00±22.47	285.00±21.54
Stoma uzunluğu (µm) ^{**}	22.22±1.42	27.52±1.84
Stoma genişliği (µm) ^{**}	13.07±1.11	18.50±1.49
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, µm ²) ^{**}	290.45±29.13	509.14±25.42
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik) ^{**}	1.70±0.02	1.49±0.04

2x: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, 4x: 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiş bitkiye ait yaprak örnekleri

^{**}, t testinde $P < 0.01$ 'e göre önemli

W.Murcot mandarininde kolhisin uygulaması sonucu elde edilen mixoploid bitkinin yaprak örneklerinde yapılan gözlemlerde stoma yoğunluğunun diploid örneğe kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Ancak Klemantin 22D mandarininden elde edilen tetraploid bireyin stoma sayısı ile karşılaştırıldığında stoma yoğunluğunun daha yüksek olduğu görülmektedir. Benzer şekilde yapılan “t” testinde stoma büyüklüğü mixloid bitkide diploid bitkiye oranla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge4.9).

Çizelge 4.9. Diploid (2x) ve mixoploid (2x+4x) kromozom sayısına sahip W.Murcott mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	2x+4x
Stoma yoğunluğu (adet/mm ²) ^{**}	492.00±27.10	365.00±23.20
Stoma uzunluğu (µm) [*]	18.73±2.84	21.12±3.14
Stoma genişliği (µm) [*]	12.02±3.14	14.42±2.65
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, µm ²) ^{**}	225.13±18.31	304.55±19.21
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.55±0.02	1.46±0.03

2x: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, 2x+4x: 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiş bitkiye ait yaprak örnekleri

^{**}, t testinde $P < 0.01$ 'e göre önemli; ^{*}, t testinde $P < 0.05$ 'e göre önemli

Moro kan portakalının aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucu elde edilen üç mixoploid bitkinin stomatal karakteristiklerinin ortalamaları alınarak Çizelge 4.10'da sunulmuştur. $2n$ ploidi seviyesindeki Moro kan portakalının yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğu ve stoma büyüklüğü, $2n$ Klemantin 22D ve W.Murcott mandarin çeşitlerine benzerlik göstermiştir. Mixoploid bitkilerde diploid bitkilere kıyasla ortalama yaprak stoma yoğunluğunun daha düşük ve stoma büyüklüğünün daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Diploid ($2x$) ve mixoploid ($2x+4x$) kromozom sayısına sahip Moro kan portakalında yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	$2x$	$2x+4x$
Stoma yoğunluğu (adet/mm ²)**	460.00±29.81	340.00±23.53
Stoma uzunluğu (µm)*	19.32±2.15	21.43±1.34
Stoma genişliği (µm)	14.02±3.47	16.89±2.45
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, µm ²)**	270.87±18.93	361.95±20.83
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.37±0.02	1.29±0.02

$2x$: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, $2x+4x$: farklı süre ve dozlarda kolhisin uygulamalarından elde edilmiş üç mixoploid bitkinin yaprak örneklerine ait ortalamalar

**, t testinde $P < 0.01$ 'e göre önemli; *, t testinde $P < 0.05$ 'e göre önemli

Yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğu, stoma bekçi hücrelerinin uzunluğu ve genişliği birçok bitki türünde ploidi seviyesini tespit etmek amacıyla morfolojik marker olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde stomal gözlemleri içeren çalışmalarda genel anlamda yaprak stoma bekçi hücrelerinin büyüklüğü artan ploidi seviyesi ile birlikte artarken yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğunun azaldığı bildirilmektedir (Ye ve ark, 2010). Bu tez çalışmasında aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması sonucunda ploidi seviyesi farklılık gösteren bitkiler diploid ploidi seviyesine sahip olan bitkilerle karşılaştırıldığında elde edilen bulgular bu duruma paralellik göstermiştir.

4.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulaması

Bu uygulamada C-35 sitranjı anacı üzerine aşılı W. Murcott mandarini, Klemantin 22D mandarini ve Moro kan portakalı çeşitlerine ait fidanlarda seçilen sürgünler kolhisin çözeltisine daldırılmıştır. Kolhisin uygulamaları fidanlardaki sürgünlerin 6 ve 8 saat süreyle %0.0, %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8 dozlarında çözeltiler içerisinde bekletilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. Sürgünlere kolhisin uygulaması işleminden genel bir görünüm

4.2.2.1. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında % Canlılık Oranı

Sürgünlere kolhisin uygulaması, her çeşit ve tipten her doz ve uygulama süresi için 30 göz kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çalışma kapsamında tüm çeşitlere ait toplam 1350 adet göz kullanılmıştır. Çözelti içerisinde bekleme süresi tamamlanan uygulama grubunun sürgünleri çözelti içerisinde çıkartılmış ve bükülerek gövdeye bağlanmış olan sürgünler serbest bırakılmıştır. Bitkiler % canlılık oranı, flow sitometri yoluyla ploidi analizi ve bazı mikroskopik gözlemler için 2 ay süreyle sera koşullarında yetiştirilmiştir. Tüm bitkiler sürdüğünde canlılık oranı (%) hesaplanmıştır.

W. Murcott mandarin fidanlarının sürgün uçlarına kolhisin uygulaması sonunda yapılan varyans analizi değerlendirildiğinde W. Murcott mandarininin canlılık oranı üzerine kolhisin uygulama sürelerinin ($p<0.01$) ve dozlarının ($p<0.01$) istatistiksel olarak önemli etkisi saptanmıştır. W. Murcott mandarininin uygulama yapılmış sürgünler üzerindeki gözlerde canlılık oranları dozlara göre farklılık göstermiş ve en yüksek canlılık oranının %0.0 kolhisin uygulamasında (%72.22), en düşük canlılık oranı ise %0.8 uygulamasında (%1.11) olduğu belirlenmiştir. Uygulama süresi bakımından ise % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sürelerinde sırasıyla %42.00, %34.67 ve %24.00 olarak bulunmuştur. Uygulama sonucunda W. Murcott mandarininde 6 ve 8 saat süreyle %0.8 kolhisin dozunda süren göz olmamış bu dozun 4 saatinde ise canlı bitki oranı %3.33 olarak belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek % canlılık oranı 4 saat süreyle %0.0 uygulamasında, en düşük ise %0.8 dozunda 6 saat ve 8 saat uygulamalarında belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Sürgünlere kolhisin uygulaması sonucu W.Murcott mandarini canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	76.67	76.67	63.33	72.22 (58.35) a
0.2	56.67	46.67	26.67	43.33 (41.02) b
0.4	43.33	33.33	16.67	31.11 (33.53) bc
0.6	30.00	16.67	13.33	20.00 (26.25) c
0.8	3.33	0.00	0.00	1.11 (3.51) d
Ortalama**	42.00 a (38.99)	34.67 b (32.73)	24.00 c (25.88)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. $LSD_{0.05}(\text{süre})$, 4.668. $LSD_{0.05}(\text{doz})$, 9.026.

Parantez içindeki değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Sürgünlere kolhisin uygulaması çalışması sonunda Klemantin 22D mandarini canlılık oranı incelendiğinde farklı kolhisin süre ve uygulama dozlarının sırasıyla %95 ve %99 güvenle istatistiksel olarak önemli etkileri olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Klemantin 22D mandarinine ait % canlılık oranı

dozlar bakımından incelendiğinde ortalama % canlılık %0.0 dozunda %70.00 olarak belirlenmiştir. Klemantin 22D mandarininin aşı gözü kalemlerine %0.8 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda hiçbir aşı gözü sürmemiş olup, bu dozda canlılık oranı %0.0 olarak saptanmıştır. Uygulama süresi bakımından ise ortalama % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %33.33, %30.67 ve %24.67 olarak belirlenmiştir. Sürgünlere kolhisin uygulamasında Klemantin 22D mandarininde en yüksek % canlılık oranı %0.0 dozunda 4 saat süreyle yapılan uygulamada, en düşük ise %0.8 dozunun tüm sürelerinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Sürgünlere kolhisin uygulaması sonucu Klemantin 22D mandarin canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	76.67	70.00	63.33	70.00 (56.91) a
0.2	36.67	33.33	33.33	34.44 (35.95) b
0.4	30.00	30.00	16.67	25.56 (30.19) bc
0.6	23.33	20.00	10.00	17.78 (24.64) c
0.8	0.00	0.00	0.00	0.00 (0.00) d
Ortalama*	33.33 a (32.11)	30.67 a (30.38)	24.67 b (26.11)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. *, 0.05 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 3.939. LSD_{0.05}(doz), 7.623.

Parantez içindeki değerler aşı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Moro kan portakalının fidanlarının sürgünlerine kolhisin uygulaması sonucunda genel olarak mandarin çeşitlerine oranla aşı gözü kalemleri yapılan uygulamada olduğu gibi daha fazla bitki elde edilmiştir. Dolayısıyla canlılık oranları hem uygulama hem süre faktörleri bakımından W. Murcott ve Klemantin 22D mandarinlerinden daha yüksek olmuştur. Ayrıca farklı uygulama sürelerinin ($p<0.01$) ve dozlarının ($p<0.01$) canlılık oranı üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kolhisin dozu bakımından % canlılık oranları incelendiğinde en yüksek canlılık oranı %67.78 ile %0.0 dozunda, en düşük canlılık oranı ise %16.67 ile %0.8 dozunda olduğu tespit edilmiştir. Moro kan portakalının aşı gözü

canlılık oranları uygulama süreleri arttıkça azalmış, 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %50.67, %41.33 ve %28.67 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada Moro kan portakalında en yüksek canlılık oranının %76.67 ile %0.0 dozunda 6 saat süreyle yapılan uygulamada, en düşük canlılık oranının ise %13.33 ile %0.8 dozunda 8 saat süreyle yapılan uygulamada olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Sürgünlere kolhisin uygulaması sonucu Moro kan portakalı canlılık oranı (%)

Kolhisin Dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	73.33	76.67	53.33	67.78 (55.67) a
0.2	66.67	46.67	33.33	48.89 (44.39) b
0.4	56.67	36.67	26.67	40.00 (39.08) b
0.6	36.67	30.00	16.67	27.78 (31.54) c
0.8	20.00	16.67	13.33	16.67 (24.04) d
Ortalama**	50.67 a (45.29)	41.33 a (39.78)	28.67 b (31.77)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. $LSD_{0.05}(\text{süre})$, 5.508. $LSD_{0.05}(\text{doz})$, 7.114. Parantez içindeki değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Sürgünlere kolhisin uygulaması çalışmada üç çeşide ait toplam 1350 adet göze uygulama yapılmıştır. Kolhisin uygulaması sonrası W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden toplam 1350 gözünden sırasıyla 151, 133 ve 181 olmak üzere 465 adet sürgün elde edilmiş ve ortalama canlılık oranı %34.44 olarak belirlenmiştir. Artan süre ve kolhisin dozlarına bağlı olarak % canlılık oranının her üç çeşitte de azaldığı belirlenmiştir. Uygulamalardan sonra süren bitkilere ait genel görünüm Şekil 4.49'da sunulmuştur.



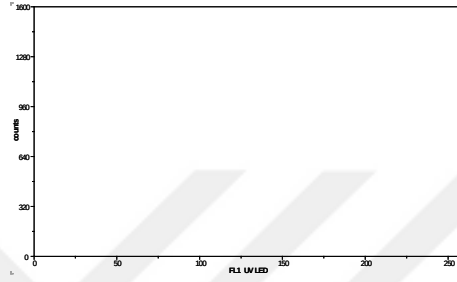
Şekil 4.49. Sürgünlere kolhisin uygulaması sonrasında gelişmekte olan sürgünler

4.2.2.2. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi

Çalışmada sürgünlere kolhisin uygulaması yapılan gözlerin %34.44'ü sürerek 465 adet sürgün oluşmuştur. W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden sırasıyla 151, 133 ve 181 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgünlerin yapraklarından flow sitometri analizleri için Tuna (2014)'nın bildirdiği şekilde yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri alınırken, örneğin ploidi seviyesi bakımından farklılık göstermesi durumunda ilgili yaprak ve aşı gözünü kolay tespit etmek amacıyla, her örnek bitki üzerinde cam yazar yardımıyla işaretlenmiştir. Alınan yaprak örnekleri Niğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında bulunan Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Germany) flow sitometresi ile ploidi düzeyleri incelenmiştir.

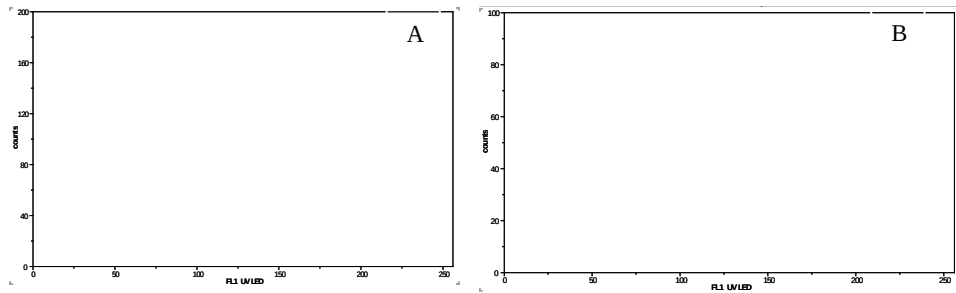
Sürgünlere kolhisin uygulaması çalışması sonucu elde edilen bitkilerden alınan 465 adet yaprak örneğinde flow sitometri cihazında okuma yapılmıştır. Örnek okumalarına geçilmeden her çeşide ait kolhisin uygulaması yapılmamış diploid yaprak örneklerinde okumalar yapılarak elde edilen piklerin 365 nm dalga boyundaki pik noktaları belirlenmiştir. Çalışmada aşı gözü kalemlerine kolhisin uygulaması denemesinde olduğu gibi kontrol ve karşılaştırma sağlamak amacıyla

bir adet doğal triploid (Bearss laymı, 3x) ve bir adet yapay triploid çeşide (Oroblanco, 3x) ait yaprak örneklerinden elde edilen pik noktalarına ait florasan ışıık yoğunlukları belirlenmiştir. Referans bitkinin yaprak hücresi nüklear DNA içeriği ve ışııma yoğunluk noktası Şekil 4.50'de görölmektedir.



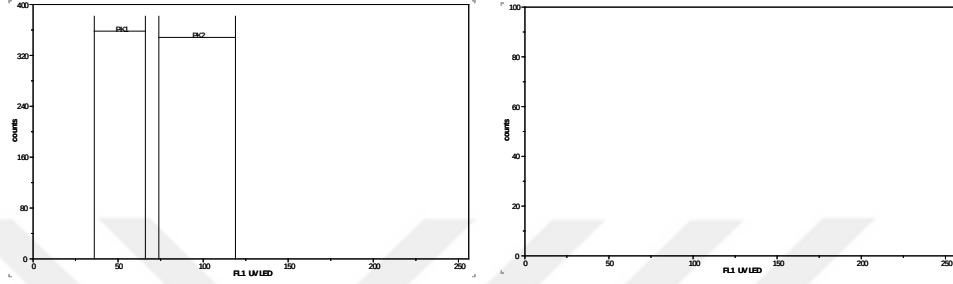
Şekil 4.50. Triploid (3x) standart referans olarak kullanılan Bearss laymına ait yaprak hücresi nüklear DNA içeriği

Flowsitometri analizleri sonucunda Klemantin 22D mandarininden bir adet tetraploid (4x) bitki elde edilmiş olup, bu örneğe ve kolhisin uygulanmamış Klemantin 22D yaprak örneğine ait flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri Şekil 4.51'de sunulmuştur. Klemantin 22D mandarinine ait tetraploid birey, çeşidin sürgünü üzerinde bulunan gözlere 6 saat süreyle %0.6 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir.



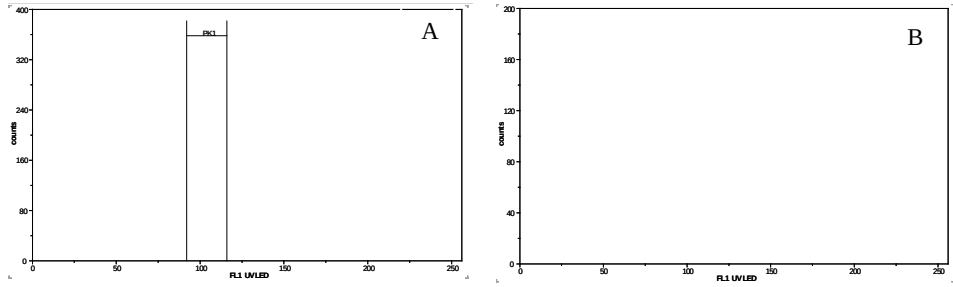
Şekil 4.51. Klemantin 22D mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri. A: 2x ploid seviyesinde Klemantin 22D mandarinini, B: 4x ploid seviyesinde Klemantin 22D mandarinine ait yaprak örnekleri

Ayrıca Klemantin 22D mandarini sürgünlerine 6 saat süreyle %0.2 dozunda yapılan kolhisin uygulaması sonucunda iki adet mixoploid ($2x+4x$) bitki elde edilmiş ve nüklear DNA içerikleri Şekil 4.52'de sunulmuştur.



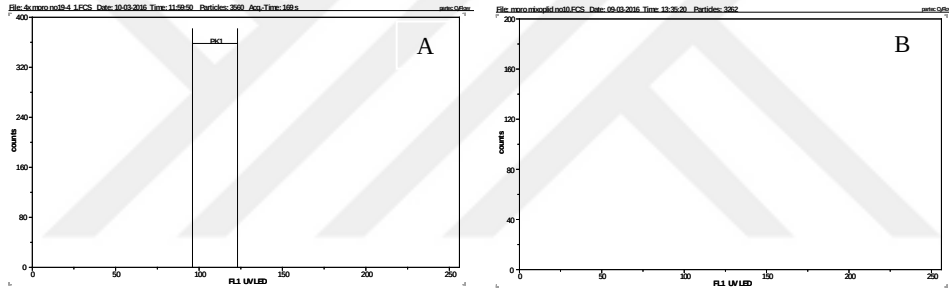
Şekil 4.52. Mixoploid ($2x+4x$) Klemantin 22D mandarini genotiplerinin yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri

Sürgünlere yapılan kolhisin uygulaması sonucunda elde edilen bitkilerde gerçekleştirilen flow sitometri yoluyla ploidi analizi sonuçlarına göre, W.Murcott mandarininden alınan yaprak örneklerinde bir adet tetraploid ($4x$) ve bir adet mixoploid ($2x+4x$) bitki belirlenmiştir (Şekil 4.53). W.Murcott mandarinine ait tetraploid ve mixoploid bireyler, çeşidin aşısı kaleminin 6 saat süreyle %0.6 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 4.53. W.Murcott mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nüklear DNA içerikleri. A: $4x$ ploidi seviyesinde W.Murcott mandarini, B: $2x+4x$ ploidi seviyesinde W.Murcott mandarinine ait yaprak örneği

Kolhisin uygulaması yapılmış Moro kan portakalından alınan yaprak örneklerinde flow sitometri yoluyla ploidi analizi yapılarak bir adet tetraploid ($4x$) ve bir adet mixoploid ($2x+4x$) bitki belirlenmiştir (Şekil 4.56). Moro kan portakalına ait tetraploid ve mixoploid bireyler, çeşidin aşısı gözünü kaleminin 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir. Taehyun ve ark (2016), çekirdeksiz mandarin ıslah programlarında kullanılmak üzere satsuma mandarininden kolhisin uygulamasıyla tetraploid bireyler elde etmeyi hedefledikleri çalışmada da araştırmacılar satsuma mandarinini sürgünlerine %0.1 dozunda 30 dakika boyunca kolhisin uygulayarak az sayıda tetraploid ve çok mixoploid bireyler elde etmişlerdir.



Şekil 4.54. Moro kan portakalının flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi nükleer DNA içerikleri. A: $4x$ ploidi seviyesinde Moro kan portakalı, B: $2x+4x$ ploidi seviyesinde Moro kan portakalı

Kolhisin uygulaması yoluyla tetraploid ebeveynlerin elde edilmesi hedeflenen bu tez çalışması kapsamında sürgünlerin kolhisin çözeltisi içerisinde bekletilmesi yoluyla W.Murcott mandarininden bir tetraploid ($4x$) ve bir mixoploid ($2x+4x$); Klemantin 22D mandarininden bir tetraploid ($4x$) ve iki mixoploid ($2x+4x$); Moro kan portakalı çeşidinden ise bir tetraploid ($4x$) ve bir mixoploid ($2x+4x$) bireyler elde edilmiş olup, gelişmekte olan tetraploid ve mixoploid bitkiler Şekil 4.55’de sunulmuştur.



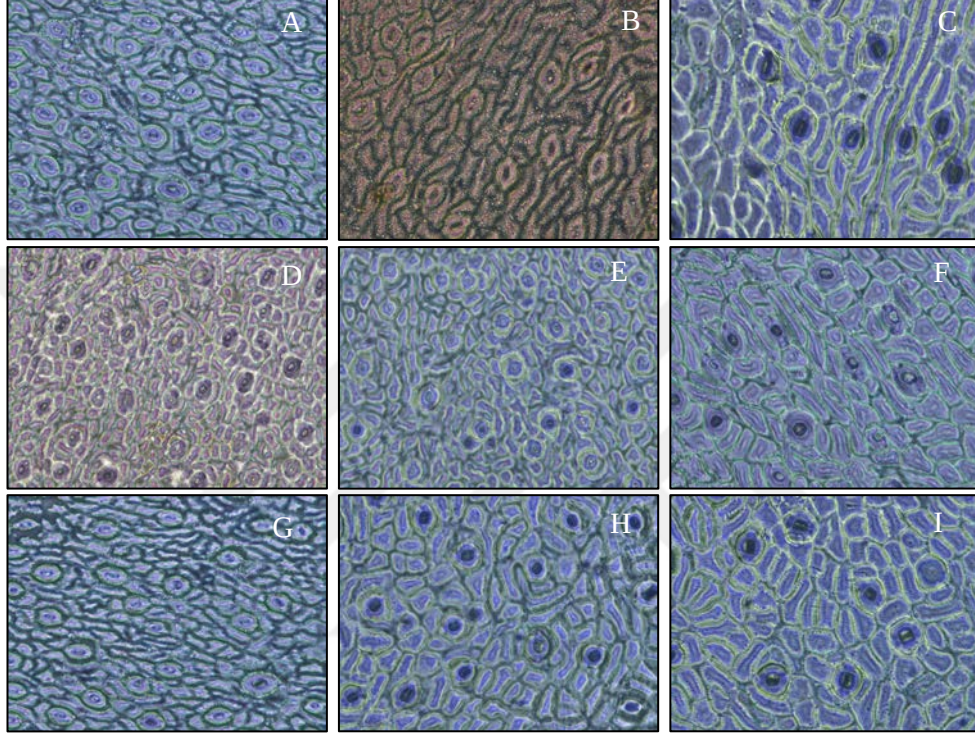
Şekil 4.55. Gelişmekte olan tetraploid ve mixoploid bitkilere ait genel görüntüler

4.2.2.3. Sürgünlere Kolhisin Uygulamasında Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Diğer İncelemeler

Tez çalışmasının sürgünlere kolhisin uygulamasından elde edilen ploidi seviyesi bakımından farklılık gösteren bireylerde diğer kolhisin uygulamasında olduğu gibi mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Kolhisin uygulamasının ploidi seviyesine olan etkisini belirlemek amacıyla yaprak stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, stoma büyüklüğü ve stoma indeksi değişkenleri gözlemlenmiştir. Bu değişkenlerin incelenmesi aşırı gözü kalemlerine kolhisin uygulamasında olduğu gibi Usman ve ark (2008)'e göre hazırlanan preparatlarda gerçekleştirilmiştir.

Farklı ploidi seviyelerinde yapılan mikroskopik incelemelerden elde edilen görüntülerden bazıları Şekil 4.56'de sunulmuştur. Her üç genotipin farklı ploidi seviyelerinden alınan yaprak örnekleriyle hazırlanan preparatlarda ploidi seviyesi yükseldikçe stoma büyüklüğünün (stoma genişliği x stoma uzunluğu) arttığı buna

karşı birim alana düşen stoma sayısının azaldığı yapılan mikroskopik incelemelerde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.56. Farklı ploidi seviyesindeki bitkilerde alınan yaprak örneklerinde stomatal gözlemler. A: Klemantin 22D (2x); B: Klemantin 22D (2x+4x); C: Klemantin 22D (4x); D: W.Murcott (2x); E: W.Murcott (2x+4x); F: W.Murcott (4x); G: Moro kan portakalı (2x); H: Moro kan portakalı (2x+4x); I: Moro kan portakalı (4x)

Sürgünlere kolhisin uygulaması sonucunda yapılan flow sitometri analizlerine göre Klemantin 22D mandarini çeşidinden 2 adet mixoploid ve 1 adet tetraploid bitki elde edilmiş, bu bireylerden alınan yaprak örneklerinde yapılan incelemeler sonucu bireylerin stomatal karakteristiklerine ait elde edilen bulgular Çizelge 4.14’de sunulmuştur. Farklı ploidi seviyelerindeki bitkilerin yaprak stoma karakteristikleri incelendiğinde mm^2 ’ye düşen stoma sayısı bakımından istatistiksel olarak $\alpha=0.01$ ’e göre önemli farklılıklar saptanmıştır. En yüksek stoma

yoğunluğunun mm^2 'de 430.00 stoma ile 2x Klemantin 22D mandarininde olduğu, en düşük ise 265.00 adet/ mm^2 ile tetraploid bireyde olduğu belirlenmiştir. Stoma büyüklükleri karşılaştırıldığında ise tetraploid bitkinin yaprak stoma büyüklüğünün diploid bitkiye kıyasla $P<0.05$ önem seviyesinde daha büyük olduğu belirlenmiştir. En yüksek stoma uzunluğu ve genişliği sırasıyla 28.91 μm ve 19.02 μm ile tetraploid Klemantin 22D mandarini yaprak örneğinde belirlenmiş, en düşük stoma uzunluğu ve genişliği sırasıyla 19.06 μm ve 14.21 μm ile diploid kontrol bireyinde incelenen yaprak örneklerinde saptanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Diploid (2x), mixoploid (2x+4x) ve tetraploid (4x) kromozom sayısına sahip Klemantin 22D mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	2x+4x	4x
Stoma yoğunluğu (adet/ mm^2) ^{**}	430.00 ^a	370.00 ^b	265.00 ^c
Stoma uzunluğu (μm) [*]	19.06 ^b	22.43 ^b	28.91 ^a
Stoma genişliği (μm) [*]	14.21 ^b	18.27 ^a	19.02 ^a
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, μm^2) [*]	270.84 ^c	409.80 ^b	549.87 ^a
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.34	1.23	1.49

^{**}, $P < 0.01$ 'e göre önemli; ^{*}, $P < 0.05$ 'e göre önemli; $\text{LSD}_{0.05}$ 'e göre ortalamalar arasındaki farklar satırlarda farklı harflerle gösterilmiştir

Çizelge 4.15'de görüldüğü gibi W.Murcott mandarininde kolhisin uygulaması sonucu elde edilen diploid, mixoploid ve tetraploid bitkilerinin yaprak örneklerinde yapılan gözlemlerde stoma karakteristiklerinin bireyler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklara sahip olduğu saptanmıştır. Stoma yoğunluğunun mixoploid ve tetraploid örneklerde diploid örneğe kıyasla daha az olduğu yapılan incelemelerde belirlenmiştir ($P<0.01$). En yüksek stoma yoğunluğunun mm^2 'de 390.00 stoma ile 2x W.Murcott mandarininde olduğu, en düşük ise 265.00 adet/ mm^2 ile tetraploid bireyde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen değerler stoma büyüklüğü bakımından incelendiğinde ise en yüksek stoma büyüklüğünün 452.48 μm^2 ile 4x W.Murcott mandarininde, en düşük ise 205.01 μm^2 diploid yaprak örneğinde olduğu saptanmıştır. En yüksek stoma uzunluğu ve genişliği ise sırasıyla 27.78 μm ve 18.26 μm ile tetraploid W.Murcott

mandarini yaprak örneğinde belirlenmiş, en düşük stoma uzunluğu ve genişliği sırasıyla 17.92 μm ve 11.44 μm ile diploid kontrol bireyinde incelenen yaprak örneklerinde saptanmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Diploid (2x), mixoploid (2x+4x) ve tetraploid (4x) kromozom sayısına sahip W.Murcott mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	2x+4x	4x
Stoma yoğunluğu (adet/mm ²)**	390.00 ^a	325.00 ^b	265.00 ^c
Stoma uzunluğu (μm)**	17.92 ^c	22.10 ^b	24.78 ^a
Stoma genişliği (μm)	11.44 ^b	17.35 ^a	18.26 ^a
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, μm^2)**	205.01 ^c	383.44 ^b	452.48 ^a
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.57	1.27	1.36

**, $P < 0.01$ 'e göre önemli; *, $P < 0.05$ 'e göre önemli; LSD_{0.05}'e göre ortalamalar arasındaki farklar satırlarda farklı harflerle gösterilmiştir

Kolhisin uygulaması yoluyla elde edilen farklı ploidi seviyelerindeki Moro kan portakalı yaprak örneklerinde yapılan stomatal karakteristiklerinin ortalama değerleri Çizelge 4.16'de sunulmuştur. İncelenen yaprak örnekleri stoma yoğunluğu bakımından incelendiğinde örneklerin birim alana düşen stoma miktarları (stoma yoğunluğu) $P < 0.01$ önem seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. En yüksek stoma yoğunluğu 460.00 stoma/mm² ile diploid Moro kan portakalında bulunurken, birim alandaki en düşük stoma sayısı 235 adet ile tetraploid Moro kan portakalından alınan yaprak örneğinde belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Ayrıca mikroskopik gözlemler incelendiğinde örneklerin stoma büyüklüklerinde istatistiksel olarak %99 güvenle önemli farklılıklar göstermiştir. Tetraploid bitkiden alınan yaprak örneğinde bulunan stoma büyüklüğü mixoploid ve diploid bitkilerin stoma büyüklüğüne göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek stoma uzunluğu ve genişliği ise sırasıyla 25.21 μm ve 19.04 μm ile tetraploid Moro kan portakalı yaprak örneğinde belirlenmiş, en düşük stoma uzunluğu ve genişliği sırasıyla 19.67 ve 15.30 μm ile diploid kontrol bireyinde incelenen yaprak örneklerinde saptanmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Diploid (2x), mixoploid (2x+4x) ve tetraploid (4x) kromozom sayısına sahip Moro kan portakalında yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	2x+4x	4x
Stoma yoğunluğu (adet/mm ²)**	460.00 ^a	350.00 ^b	235.00 ^c
Stoma uzunluğu (µm)**	19.67 ^c	22.38 ^b	25.21 ^a
Stoma genişliği (µm)**	15.30 ^b	16.89 ^b	19.04 ^a
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, µm ²)**	300.95 ^c	378.00 ^b	480.00 ^a
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.29	1.33	1.32

**, $P < 0.01$ 'e göre önemli; *, $P < 0.05$ 'e göre önemli; $LSD_{0.05}$ 'e göre ortalamalar arasındaki farklar satırlarda farklı harflerle gösterilmiştir

Bu tez çalışmasına konu olan Klemantin 22D ve W.Murcott mandarinleri ile Moro kan portakalı genotiplerinin sürgünlerine kolhisin uygulaması yapılmış ve uygulama sonucunda flow sitometri yoluyla elde edilen bitkilerde ploidi analizi gerçekleştirilmiştir. Ploidi analizi sonuçları değerlendirildiğinde, genotiplerin sürgünlerini farklı süre ve seviyelerde kolhisin çözeltisi içerisinde bekleterek bu genotiplerden mixoploid ve tetraploid bireyler elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen farklı ploidi seviyesindeki bireylerden alınan örneklerde yaprak alt edipermis tabakasındaki bir takım stomal gözlemler mikroskopik olarak gerçekleştirilerek bireylerin diploid ploidi seviyesindekilerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada artan ploidi seviyesine bağlı olarak incelenen stoma uzunluğu, stoma genişliği ve stoma büyüklüğü değişkenlerinde artış, birim alanda bulunan stoma sayısında ise azalmalar gözlemlenmiştir. Literatürde mevcut çalışmalarda stoma yoğunluğunun ve büyüklüğünün özellikle tetraploid, triploid ve diploid bitkilerde başta olmak üzere farklı ploidi seviyelerinin morfolojik olarak karşılaştırılmasında kullanımının yararlı olduğu bildirilmektedir (Khan ve ark 1992; Bashir, 1994; Koksall ve ark 2002; Jaskani ve ark 2005, Usman ve ark 2008). Bu tez çalışmasında, stoma yoğunluğu ve büyüklüğünün ploidi seviyesiyle doğrudan ilişkisini gösteren bulgular elde edilmiştir. Gu ve ark (2005) stoma yoğunluğunun, artan ploidi düzeyi ile önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca pek çok araştırmacı turuncgil yapraklarında artan ploidi seviyesine bağlı olarak stoma genişliği ve uzunluğunun arttığını, stoma yoğunluğunun ise azaldığı bildirmişlerdir

(Barret, 1974; Khan ve ark, 1992). Taehyun ve ark (2016) kolhisin uygulaması yoluyla elde ettikleri satsuma mandarininin tetraploid bitkilerde diploid bitkilere kıyasla daha az stoma yoğunluğu olduğunu tespit etmişlerdir.

Ploidi ıslahı çekirdeksiz çeşit ıslahında gerekli olan tetraploid ebeveynleri elde etmek amacıyla çeşitlere kolhisin uygulayarak tetraploid ebeveynlerin oluşturulması ve daha sonra elde edilmiş tetraploid bireylerin diploidlerle melezlenmesini kapsayan bir yöntemdir. Bu şekilde elde edilmiş birçok triploid çeşit vardır. Örneğin Melagold ve Oroblanco çeşitleri, bir şadok (CRC 2240) ile tetraploid (4x) bir altıntopun melezlenmesiyle elde edilmiştir (Saunt, 2000). Mandared (Red Nules) çeşidi, diploid Nules klemantin mandarini ile tetraploid Tarocco kan portakalı melezi olup, meyve eti kırmızıdır (Reforgiato-Recupero ve ark., 2005). Lemox, triploid çekirdeksiz bir limondur. Bu çeşit diploid *C. limon* femminello x Pera del Commendatore melezinin tetraploid Doppio Lentini ile melezlenmesi sonucu elde edilmiştir (Reforgiato-Recupero ve ark., 2005). Bu tez çalışmasında çekirdeksiz (triploid) çeşit elde edilmesi amacıyla yapılacak olan ıslah programlarında ploidi manipülasyonu için gerekli tetraploid ebeveynleri elde edilmiş durumdadır. Çalışma sonucunda Klemantin 22D mandarini, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı çeşitlerinde gerçekleştirilen kolhisin uygulamaları sonucunda çeşitlerin mixoploid ve tetraploid formları geliştirilmiştir.

4.3. Klasik Melezlemeler ile Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması

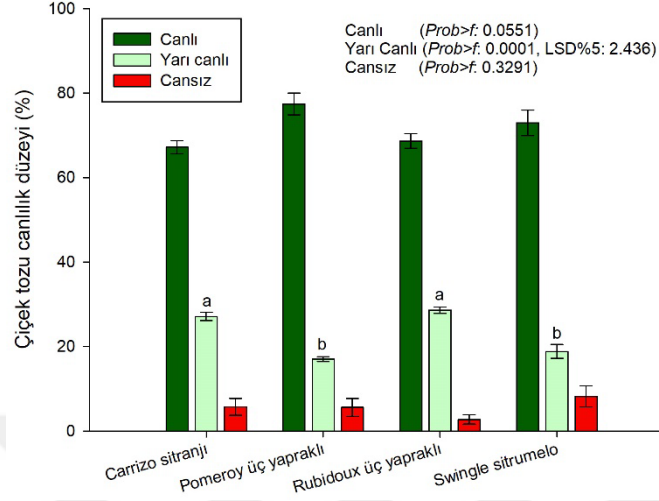
Bu tez çalışmasında ülkemiz koşullarına iyi adapte olabilen yerli turunç anacına alternatif yeni turunçgil anaçlarının geliştirilmesi hedefleri doğrultusunda ‘Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgil Gen Kaynakları’ bahçesinde bulunan, hem dünyada hem de ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinde kullanımı yaygın anaçlarla birlikte anaç özelliği taşıyan genotiplerde klasik melezleme çalışmaları yürütülerek yeni anaç melez popülasyonları oluşturulmuştur.

4.3.1. Melezlemelerde Kullanılan Baba Ebeveynlerde *in vitro* Çiçek Tozu Canlılık Düzeyleri

Çalışmada baba (♂) ebeveyn olarak kullanılan genotiplerden bir gece önceden çıkarılan çiçek tozları canlılık testi için kullanılmıştır. Çiçek tozu canlılığı TTC testi ile Eti (1990)'ye göre belirlenmiştir. Mikroskop altında koyu kırmızı görünen çiçek tozları “canlı”, açık kırmızı görünenler “yarı canlı” ve boyanmayan ya da sarı-krem renginde olanlar ise cansız” olarak değerlendirilmiştir. Her çeşit için 3 lam ve her lamda tesadüfen seçilen 5 ayrı bölgede sayım yapılmıştır. TTC uygulamasında genotipler arasındaki istatistiksel farklılık %5 önem düzeyinde açı transformasyonu uygulandıktan sonra incelenmiştir.

Klasik melezleme kombinasyonlarında yer alan baba ebeveynlere uygulanan TTC testi sonucu saptanan çiçek tozu canlılık düzeyleri (%), Şekil 4.57’de verilmiştir. Baba ebeveynlere ait genotiplerden elde edilen çiçek tozlarına uygulanan TTC testinde canlılık düzeyleri %77.41 ile %67.17 arasında değişim göstermiştir. Çalışmada çiçek tozu canlılık düzeyleri Carrizo sitranjı, Pomeroy üç yapraklı, Rubidoux üç yapraklı ve Swingle sitrumelo genotiplerinde sırasıyla %67.17, %77.41, %68.67 ve %72.97 olarak belirlenmiştir.

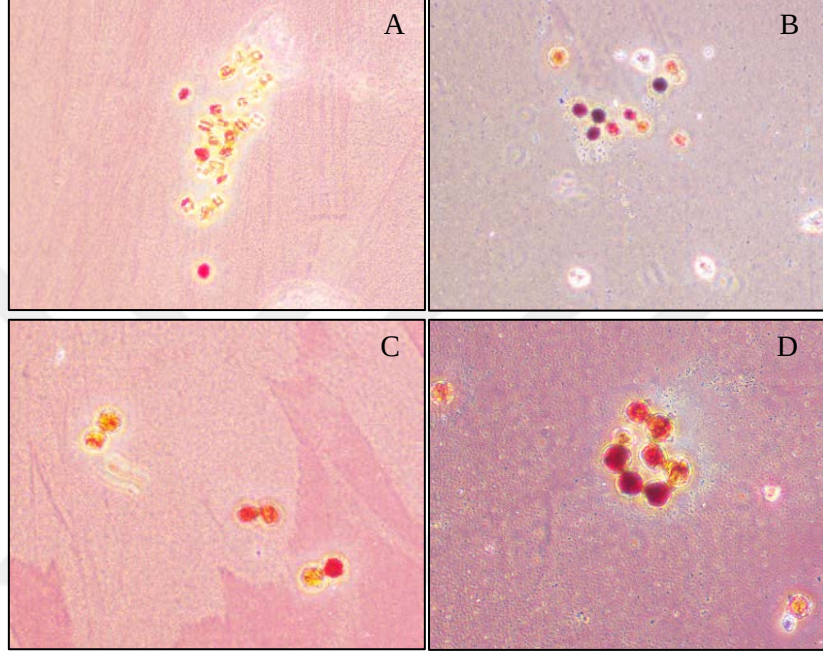
Klasik melezleme çalışmalarında kullanılan baba ebeveynlerin yarı canlı çiçek tozu oranında ise en yüksek değer sırasıyla %28,61 ve %27.11 ile Rubidoux üç yapraklı ve Carrizo sitranjı genotiplerinden elde edilmiştir. TTC ile boyanmamış çiçek tozları cansız olarak değerlendirilmiş ancak genotipler arasında istatistiksel olarak önemli fark saptanmamıştır. Baba ebeveynlerin cansız çiçek tozları %2.73 ile %8.19 arasında değişim göstermiştir.



Şekil 4.57. Klasik melezleme kombinasyonlarında yer alan baba ebeveynlere uygulanan TTC testi sonucu saptanan çiçek tozu canlılık düzeyleri (%)

Eti ve ark (1990), çalışmalarında Kinnow, Robinson, Nova, Fremont, Klemantin, Minneola ve Orlando çeşitlerinde çiçek tozu canlılık düzeylerini TTC ve FDA testleri ile belirlemişlerdir. FDA ve TTC ile yapılan çiçek tozu canlılık testlerinde en yüksek değerin Robinson, en düşük değerin Kinnow mandarininde olduğunu bildirmişlerdir. Guerra ve ark (2013) sera ve tarla koşullarında çevresel faktörlerin etkisini incelemek amacıyla yürüttükleri çalışmada Yerli üç yapraklı, ‘Swingle’, ‘Troyer’, ‘Fepagro C13’, ‘Fepagro’ bitkilerinden elde edilen polenlerin canlılığı ve *in vitro* çimlenmesini üç yıl süresince incelemişlerdir. Araştırmacılar incelenen genotiplerin tarla koşullarında ortalama çiçek tozu canlılığının 2009 yılında Yerli üç yapraklı, Swingle sitrumelo ve Troyer sitranjı için sırasıyla %63.47, %85.46 ve %59.55; sera koşullarında ise, %49.45, %36.70 ve %48.62 olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında klasik melezlemelerde kullanılan üç yapraklı ve melezlerinden elde edilen çiçek tozlarının canlılık düzeylerinin literatür ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Çalışmada konu olan baba ebeveynlerden elde edilen çiçek tozlarının canlılık düzeylerini belirlemede kullanılan TTC testi ile ilgili örnek görüntüler Şekil 4.58’de sunulmuştur.



Şekil 4.58. TTC çiçek tozu canlılık testi uygulanmış Pomeroy üç yapraklı (A), Yerli üç yapraklı (B), Rubidoux üç yapraklı (C) ve Swingle sitrumelo (D) genotiplerine ait çiçek tozları

4.3.2. Klasik Melezleme Çalışmaları

Çalışma kapsamında belirtilen amaçlara yönelik olarak seçilmiş olan ebeveynler arasında oluşturulan kombinasyonlarda kontrollü melezlemeler yapılmıştır. Klasik melezlemeler ebeveynlerin çiçeklenme tarihlerine bağlı olarak 10 - 18 Nisan 2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Melezleme çalışmalarında kullanılan keseler Haziran ayı başında çıkartılarak yerine fileler takılmıştır. Çalışmada ana ebeveynlerin olgunlaşma dönemi göz önüne alınarak meyveler aralık ayı içerisinde sayılarak hasat edilmiştir.

Çizelge 4.17’de melezleme yapılan çiçek sayısı, melezleme sonrası elde edilen meyve sayısı ve meyve tutma oranı (%) sunulmuştur. Klasik melezleme çalışmalarında Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 75 adet çiçek kullanılarak melezleme yapılmıştır. Bu kombinasyonda 11 adet meyve elde edilmiş ve meyve tutma oranı %14.66 olarak belirlenmiştir. Çin turuncu x Rubidoux üç yapraklı melezleme kombinasyonunda 225 adet Çin turuncu çiçeği kullanılarak yapılan melezlemelerden 20 adet meyve elde edilmiş ve meyve tutumu %8.89 olarak belirlenmiştir. Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonunda 200 adet çiçekte melezleme yapılarak 8 adet meyve elde edilmiş ve meyve tutumunun %4.00 olduğu saptanmıştır. Çalışmada 210 adet Sunki mandarini çiçeği, Rubidoux üç yapraklısından elde edilen çiçek tozlarıyla melezlenmiş ve 39 adet meyve elde edilmiştir. Bu kombinasyonda meyve tutma oranının %18.57 olduğu belirlenmiştir. Volkameriana x Rubidoux melezleme kombinasyonunda 300 adet çiçek kullanılarak yapılan melezlemelerden 48 adet meyve elde edilmiştir. Çalışmada bu melezleme kombinasyonunun meyve tutumunun %16.00 olduğu saptanmıştır. Yuzu x Pomeroy üç yapraklı kombinasyonunda ise 75 çiçek kullanılarak 2 adet meyve elde edilmiş ve bu kombinasyonda meyve tutma oranı %2.67 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.17’de Gou Tou turuncu ve Yuzu’nun ana ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonlarda melezleme yapılan çiçek sayısı diğer kombinasyonlara oranla daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum Gou Tou turuncu ve Yuzu ağaçlarının Nisan 2014 tarihinde yeterli çiçek tomurcuğu oluşturmamasından kaynaklanmaktadır.

Klasik melezleme çalışmalarında 6 farklı ana ebeveynde toplam 1085 adet çiçek kullanılarak 128 adet meyve elde edilmiştir. Melezleme çalışmaları meyve tutumu yönünden değerlendirildiğinde, en yüksek meyve tutumu değeri Sunki mandarini x Rubidoux üç yapraklı (%18.57) melezleme kombinasyonundan elde edilirken, en düşük meyve tutma oranı ise Yuzu x Pomeroy üç yapraklı (%2.67) melezleme kombinasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.17). Soost ve Cameron (1985) turunçgillerde arazi koşullarında gerçekleştirilen yapay tozlama

koşullarında meyve tutum oranının değişkenlik gösterebileceğini bildirmişlerdir. Rajasekharan ve ark (1995), farklı koşullarda muhafaza edilmiş üç yapraklı çiçek tozlarıyla Rangpur laymını melezlemişlerdir. Çalışmada araştırmacılar farklı koşullarda muhafaza edilmiş üç yapraklı çiçek tozlarıyla yapılan melezlemelerde meyve tutum oranının %16.66, %37.5 ve %27.77 olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.17. Melezleme kombinasyonları ile melezleme yapılan çiçek sayısı (adet), elde edilen meyve sayısı (adet) ve meyve tutma oranı (%)

Ana ebeveyn (♀)	Baba ebeveyn (♂)	Çiçek sayısı	Meyve sayısı	Tutum oranı (%)
Gou Tou turuncu	x Yerli üç yapraklı	75	11	14.66
Çin turuncu	x Rubidoux üç yapraklı	225	20	8.89
Kleopatra mandarini	x Yerli üç yapraklı	200	8	4.00
Sunki mandarini	x Rubidoux üç yapraklı	210	39	18.57
Volkameriana	x Swingle sitrumelo	300	48	16.00
Yuzu	x Pomeroy üç yapraklı	75	2	2.67
Toplam		1085	128	-

Melezleme çalışmaları gerçekleştirilen ana ebeveynlerin olgunlaşan meyveleri hasat edilerek laboratuvar ortamına getirilmiştir. Hasat edilen meyvelerden tohumlar çıkartıldıktan sonra yıkanmış ve gölge bir ortamda kurutulmuştur. Tohumlar kurutulduktan sonra sayılarak her melezleme kombinasyonuna ait tohum sayısı belirlenmiştir. Çizelge 4.18’de melezleme kombinasyonlarından elde edilen tohum sayısı ve meyve başına düşen ortalama tohum miktarı sunulmuştur.

Çizelge 4.18. Melezleme kombinasyonlarından elde edilen meyve ve tohum sayıları ile meyve başına düşen tohum sayısı (adet)

Ana ebeveyn (♀)	Baba ebeveyn (♂)	Elde edilen tohum sayısı	Tohum/Meyve
Gou Tou turuncu	x Yerli üç yapraklı	232	21.09
Çin turuncu	x Rubidoux üç yapraklı	344	17.20
Kleopatra mandarini	x Yerli üç yapraklı	96	12.00
Sunki mandarini	x Rubidoux üç yapraklı	261	6.69
Volkameriana	x Swingle sitrumelo	362	7.54
Yuzu	x Pomeroy üç yapraklı	37	18.50
TOPLAM		1332	-

Melezleme kombinasyonlarından elde edilen meyvelerde ortalama tohum sayısı 6.69 ile 21.09 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.18). En düşük meyve başına tohum sayısı Sunki mandarini x Rubidoux üç yapraklı melezleme kombinasyonunda saptanmış, en yüksek tohum sayısı ise 21.09 adet ile Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı melezlemesinden elde edilen meyvelerde belirlenmiştir. Çin turuncu x Rubidoux üç yapraklı melezleme kombinasyonundan meyve başına ortalama 17.20 adet, Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan meyve başına ortalama 12.00 adet, Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan meyve başına ortalama 7.54 adet ve Yuzu x Pomeroy melezleme kombinasyonundan meyve başına ortalama 18.50 adet tohum elde edilmiştir (Çizelge 4.18). Rajasekharan ve ark (1995), Rangpur laymı ile farklı koşullarda muhafaza edilmiş üç yapraklı çiçek tozlarıyla yapay tozlamalar gerçekleştirmiş, çalışma sonucunda meyve başına düşen ortalama tohum sayısının 9.4 ile 14.5 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

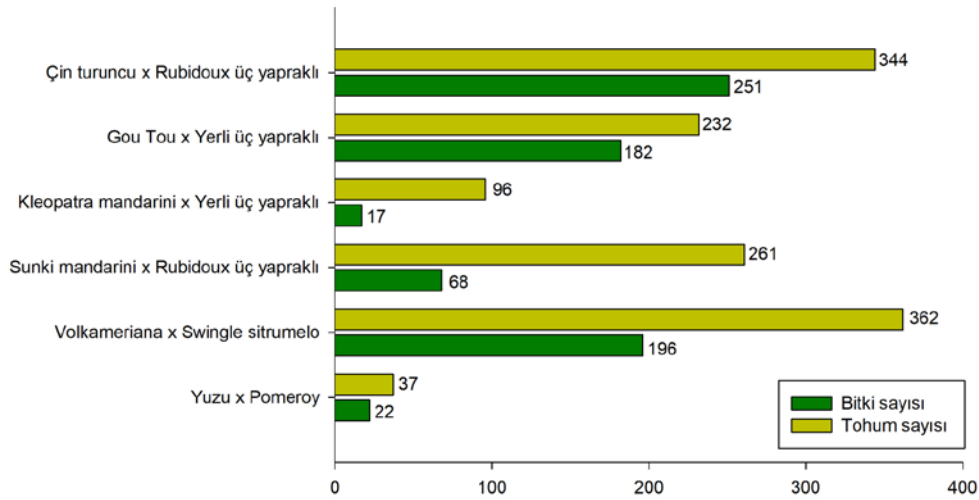
Çalışmada gerçekleştirilen klasik melezlemelerden elde edilen meyvelerden çıkartılan tohumlar kurutulup sayıldıktan sonra, %1 lik “8-Hydroxyquinoline hemisulfate” ile ilaçlanarak ekim zamanına kadar 4-5 °C de muhafaza edilmiştir. Tohumlar Mart 2015 tarihinde serada ithal torf ortamı içeren saksılara ekilmiştir. Tohum ekiminden 1 ay sonra tüm kombinasyonlardan elde edilen tohumlarda çimlenme gözlemlenmiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. Melezleme çalışmalarından elde edilen tohumların çimlenmesiyle oluşan bitkiciklere ait görüntüler

Çimlenme sonucu gelişim gösteren bitkiler 7-8 gerçek yapraklı döneme geldiklerinde kokopit (hindistan cevizi kabuğu) ortamı bulunan saksılara şaşırtılmış ve her kombinasyondan elde edilen bitki sayısı belirlenmiştir.

Şekil 4.60'da melezleme kombinasyonlarından elde edilen tohum ve bitki sayıları sunulmuştur. Bitkilerin şaşırtılmasından sonra gerçekleştirilen sayımlarda Çin turuncu x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 251 adet, Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 182 adet, Kleopatra mandarinini x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 17 adet, Sunki mandarinini x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 68 adet, Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan 196 adet ve Yuzu x Pomeroy üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 22 adet olmak üzere toplam 736 adet bitki elde edilmiştir.



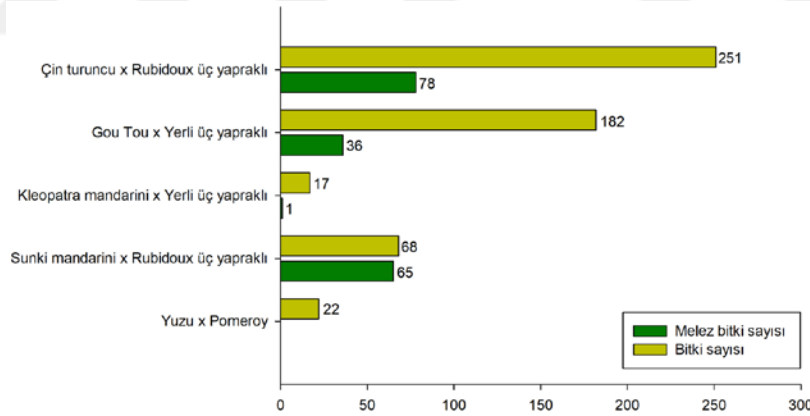
Şekil 4.60. Klasik melezleme kombinasyonların elde edilen tohum sayısı (adet) ve çimlenerek gelişim gösteren bitki sayısı (adet)

4.3.3. Zigotik ve Nuseller Kökenli Bitkilerin Morfolojik Olarak Belirlenmesi

Nisan 2014 tarihinde yürütülen klasik melezleme çalışmalarından elde edilen 736 bireylik popülasyonda Rubidoux ve Pomeroy üç yapraklı genotiplerinin

baba ebeveyn olarak kullanıldığı 5 kombinasyondan elde bitkilerde morfolojik gözlemler yapılmıştır. Bu gözlem sonucunda üç yapraklılık özelliğinin baskın karakter olmasından faydalanan üç yapraklılık gösteren bitkiler zigotik bitki yani melez olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.61’de klasik melezleme çalışmalarında melezleme kombinasyonu bazında elde edilen bitki sayısı ve morfolojik gözlemlerle melez olduğu belirlenen melez bitki sayısı sunulmuştur. Çalışmada Çin turuncu x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 78 adet, Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 36 adet, Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 1 adet ve Sunki mandarini x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 65 adet bitkinin melez olduğu morfolojik olarak belirlenmiştir. Yuzu x Pomeroy üç yapraklı melezleme kombinasyonundan elde edilen bitkilerin hiçbirinde üç yapraklılık özelliği gözlemlenmediğinden dolayı bu melezleme kombinasyonunda melez bitki tespit edilememiştir.



Şekil 4.61. Klasik melezleme kombinasyonlarından elde edilen bitki ve melez sayıları (adet)

Tez çalışmasında gerçekleştirilen klasik melezlemeler sonucunda toplam 180 adet bitkinin melez olduğu morfolojik olarak belirlenmiştir. Gelişmekte olan melez bitkilere ait görüntülerden bazıları Şekil 4.62 ve 4.63’de sunulmuştur.



Şekil 4.62. Çin turuncu x Rubidoux (solda) ve Gou Tou turuncu x Rubidoux (sağda) melezleme kombinasyonlarından elde edilmiş melezlerden genel görüntüler



Şekil 4.63. Sunki mandarini x Rubidoux melezleme kombinasyonundan elde edilmiş melezler

Turunçgillerde tür içi ve türler arası melezlemeler yapmak mümkündür. Bu durum turunçgillerde yeni çeşitlerin geliştirilmesinde büyük avantajlar sağlamaktadır. Birçok çeşit, geçmişte doğada kendiliğinden meydana gelmiş doğal melezlerin, seleksiyon çalışmaları sonunda kültüre alınmasıyla elde edilmiştir. Halen yetiştiriciliği yapılan doğal melezler vardır. Günümüzde turunçgil yetiştiriciliğinde biyotik ve abiyotik stres faktörleri nedeniyle anaç kullanılması bir zorunluluktur. Turunçgillerde tür içi ve türler arası melezlemeler yapılabildiği gibi cinsler arası melezlemeler de yapılabilmektedir. Bu turunçgillerde biyotik ve

abiyotik stres faktörlerine tolerans gösteren yeni anaçlar elde edilmesi bakımından büyük bir avantaj sağlamaktadır. Mevcut bazı anaç ve çeşitler hâlihazırda dünyadaki birçok ıslah programında anaç değeri olan yeni melezler elde etmek için kullanılmaktadır.

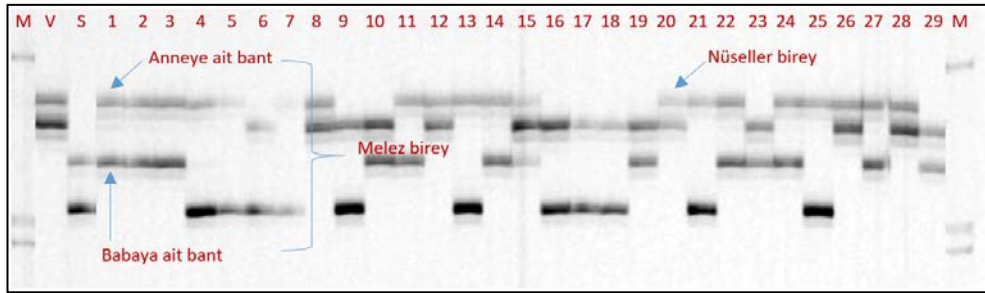
Göbekli portakal ve üç yapraklı melezi olan Carrizo ve Troyer sitranjıları ile altıntop ve üç yapraklı melezi olan Swingle sitrumelo anaçları cinsler arası melezlerden seçilmiştir. Üç yapraklılığın virüs, nematod ve *Phytophthora*'ya toleranslılığının bu anaçlara aktarılmış olduğu bulunmuştur ve bu anaçlar dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD'de *C. reticulata* ve *P. trifoliata* melezlemesinden 'US-852' isimli anaç elde edilmiştir (Bowman ve Rouse, 2006). İspanya'da IVIA Araştırma Enstitüsü Kleopatra mandarini ve *P. trifoliata* melezi iki anaç (Forner Alcaide 5 ve Forner Alcaide 13); Troyer sitranjı ve *P. trifoliata* melezi bir anaç (Forner Alcaide 418); King mandarini ve *P. trifoliata* melezi bir anaç (Forner Alcaide 517) olmak üzere dört anaç geliştirmiştir. Dördü de tristeza hastalığı ve tuza dayanıklıdır. FA-5 nematod, kireçli toprak ve su baskınlarına toleranslıdır. FA-418 kireçli topraklara iyi tolerans gösteren üzerindeki çeşitte meyve iriliğini arttıran bir anaçtır. FA-517 de bir bodur anaçtır ve kireçli topraklara iyi tolerans göstermiştir (Nicotra 2001; Forner ve ark, 2003). 'X639' anacı Kleopatra mandarini ve *P. trifoliata* melezidir. Limon ve mandarinler için ideal bir anaç olduğu ispatlanmıştır; bununla beraber, nematodlara ve kök patojenlerine dayanıklı değildir (Miller ve ark, 2003). Ayrıca, Grosser ve ark (2015), üstün anaç özelliklerine sahip olduğu belirlenen allotetraploid somatik bireyler arasında melezlemeler yaparak 4 farklı bireye ait karakteri bir genotipte toplamaya çalışmışlardır. Araştırmacılar tetraploid bireyler arasında yapılan melezleme çalışmalarından elde edilen bireylere Valquarius ve Vernia portakal çeşitlerini aşılayarak bahçe kurduklarını ve incelemelerin devam ettiğini bildirmişlerdir.

4.3.4. Zigotik ve Nuseller Kökenli Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi

Klasik melezleme çalışmaları sonucu Volkameriana x Swingle sitrumelo kombinasyonundan elde edilen toplam 196 bitkiden 19 bitkinin zigotik kökenli olduğu morfolojik olarak (üç yapraklılık özelliği) tespit edilmiş; geriye kalan ve üç yapraklılık özelliği göstermeyen 177 bitki morfolojik olarak ayırt edilemediği için SSR analizleri yürütülerek bu bitkilerin zigotik ya da nuseller kökenli olduğu kesin olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada, Volkameriana ve Swingle sitrumelo arasında gerçekleştirilen melezlemeler sonucunda elde edilen 177 adet bitki SSR markırları ile taranmıştır. Melezleme çalışmalarında ebeveyn olarak kullanılan Volkameriana ve Swingle sitrumelo bitkileri ile melezleme sonucunda elde edilen bireylerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Ana ebeveyn, baba ebeveyn ve aday melez bitkilerden izole edilen DNA materyali ile SSR analizleri yürütülmüştür. SSR analizlerinde ebeveynlerin polimorfik sonuçlar verdiği ön çalışmalarda belirlenen (54, 83, 84, 105 ve MEST121) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 5 adet SSR primer çifti ile amplifikasyonlar sonucu edilen SSR jel görüntülerinin bazıları Şekil 4.64 - Şekil 4.68'de sunulmuştur.



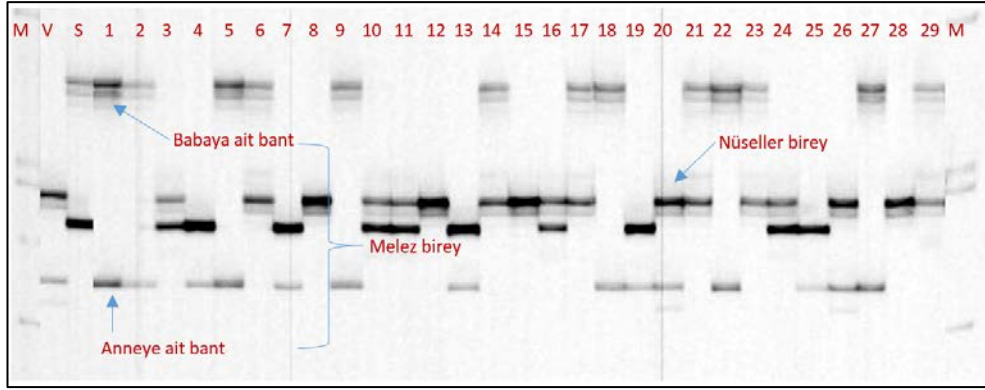
Şekil 4.64. 83 no'lu primere ait jel görüntüsü

M: Markır

V: Volkameriana

S: Swingle sitrumelo

1-29: Volkameriana x Swingle sitrumelo melezlemesinden elde edilen bireyler



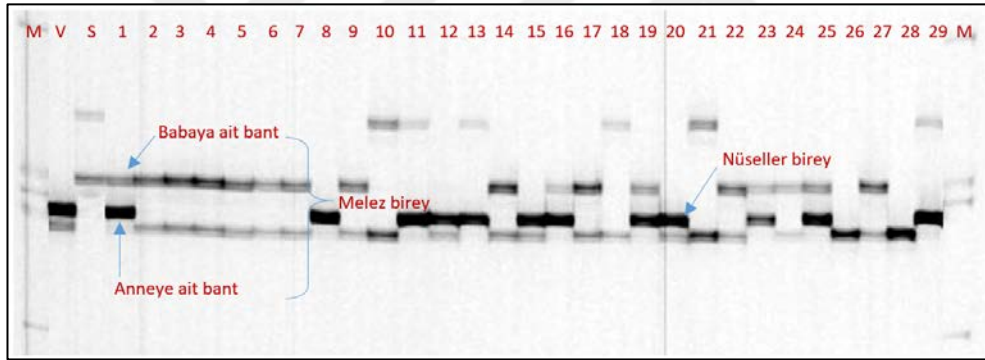
Şekil 4.65. 84 no'lu primere ait jel görüntüsü

M: Markır

V: Volkameriana

S: Swingle sitrumelo

1-29: Volkameriana x Swingle sitrumelo melezlemesinden elde edilen bireyler



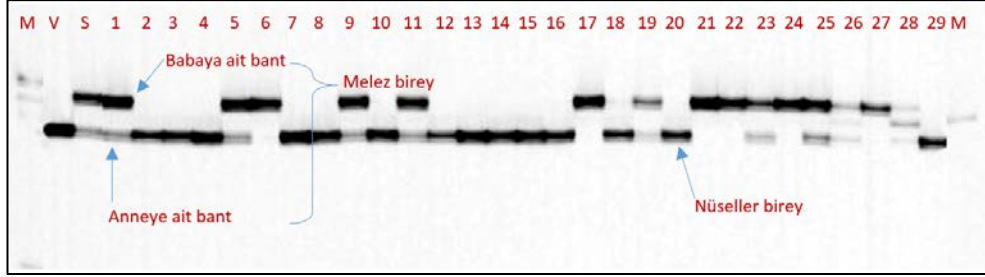
Şekil 4.66. 121 no'lu primere ait jel görüntüsü

M: Markır

V: Volkameriana

S: Swingle sitrumelo

1-29: Volkameriana x Swingle sitrumelo melezlemesinden elde edilen bireyler



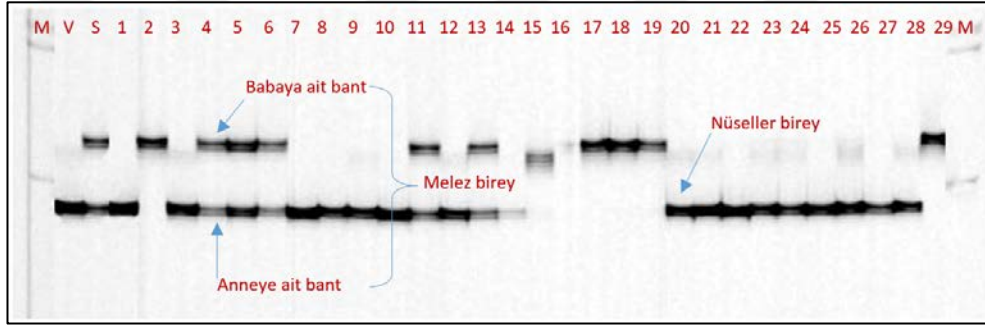
Şekil 4.67. 54 no'lu primere ait jel görüntüsü

M: Markır

V: Volkameriana

S: Swingle sitrumelo

1-29: Volkameriana x Swingle sitrumelo melezlemesinden elde edilen bireyler



Şekil 4.68. 105 no'lu primere ait jel görüntüsü

M: Markır

V: Volkameriana

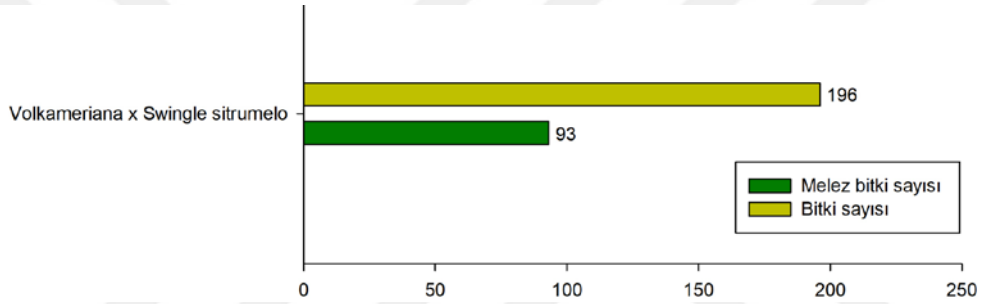
S: Swingle sitrumelo

1-29: Volkameriana x Swingle sitrumelo melezlemesinden elde edilen bireyler

Çalışma sonucunda Volkameriana ana ebeveyninin ve Swingle sitrumelo baba ebeveyninin DNA bant profilleri aday melez bitkilerden elde edilen bant profilleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Sadece ana ebeveyne ait bant veren bitkiler nuseller bitki, ana ve baba ebeveyne ait her iki bantı veren bitkiler melez, ana ebeveyn ile aynı fakat baba ebeveynle farklı bantı veren bitkiler ise outcross olarak ayrılmıştır.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen klasik melezleme kombinasyonları arasında yer alan Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme

kombinasyonundan elde ve morfolojik olarak melez olduğu belirlenemeyen 177 bitkinin 74 tanesinin melez olduğu yapılan SSR analizleri sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca kalan 103 bitki içerisinde 99 tanesinin nüseller kökenli ve 4 tanesinin ise melezleme kombinasyonu dışında olduğu SSR analizlerinden elde edilen bant profilleri incelenerek belirlenmiştir. Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan elde edilen 196 adet bitkiden 74 tanesi moleküler, 19 tanesi ise morfolojik olarak melez olduğu tespit edilerek, bu melezleme kombinasyonundan 93 adet bitkinin melez olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.69.).



Şekil 4.69. Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan elde edilen bitki ve melez sayıları (adet)

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonundan elde edilmiş melez bitkilere ait görüntülerden bazıları Şekil 4.70’de sunulmuştur.



Şekil 4.70. Volkameriana x Swingle sitrumelo melezleme kombinasyonlarından elde edilmiş melezlerden genel görüntüler

PCR'a dayalı bir markör sistemi olan SSR yöntemi güvenilir, tekrarlanabilir, polimorfizm oranı yüksek ve kodominanttır. Birçok bitki türünde genetik haritaların oluşturulması, populasyon analizleri, markör yardımıyla seleksiyon (MAS) ve başka amaçlarla kullanılmaktadır (Gupta ve Varshney, 2000). Ender görülen ve türe özgü tanılayıcı markörler üreten SSR tekniği aynı zamanda tür karmaşasının olduğu durumlarda da başarıyla kullanılabilir (Nimmakayala ve ark, 2009). Özellikle polimorfizm seviyesinin düşük olduğu durumlarda tercih edilen SSR'da markör geliştirilmesinin pahalı ve zahmetli bir işlem olduğu, zaman aldığı Staub ve ark (1996) tarafından bildirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan SSR markırları kodominant özelliğe sahiptir. Kodominant özellik gösteren markır sistemlerinde amplifiye olan bölgenin homozigot veya heterozigot olup olmadığı, bir başka deyişle ebeveynlerinden hangi allelleri aldıkları kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı SSR markırları melez bireylerin tespitinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Yıldız ve ark (2013) yaptıkları çalışmada turuncgillerde gerçekleştirdikleri çeşitli melezleme çalışmaları sonucunda elde ettikleri bireylerin melez olup olmadıklarının kontrolünü SSR markırları ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Valencia Late', 'Midnight Valencia', 'Rhode Red Valencia' ve 'Rio Red' altıntop genotiplerini baba, Robinson ve Fremont mandarinlerini ise anne olarak kullanmışlardır. Melezlemeler sonucunda toplam 500 birey elde etmiş ve bu bireylerin melez olup olmadıklarının kontrolünü toplam 11 SSR markırı ile gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında da SSR markırları melez aday bitkilerimizin melez olup olmadıkları konusunda kesin bilgiler vermiştir. Böylece nüseller kökenli ve kombinasyon dışı bitkilerin elenmesi ve böylece ileriye yönelik yapılacak çalışmalarda gerekli tasarruflar sağlanmıştır.

Klasik melezleme çalışmaları kapsamında 6 melezleme kombinasyonunda gerçekleştirilen melezlemelerden toplam 736 bitki elde edilmiştir. Bu bitkiler gerçekleştirilen morfolojik ve moleküler incelemeler doğrultusunda 273 adet bitkinin melez olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.19'da görüldüğü üzere

çalışmadan elde edilen bitki sayısı ile melez bitki sayısı verileri oranlanarak her kombinasyonunda melez bitki elde etme oranı hesaplanmıştır. Çizelge 4.19 incelendiğinde melezleme kombinasyonları arasında melez bitki oranının %5.88 ile %95.59 arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Sunki mandarini x Rubidoux üç yapraklı melezleme kombinasyonundan %95.59 ile oldukça yüksek bir melez bitki elde etme oranı gözlemlenirken, diğer melezleme kombinasyonlarında bu oranın yüksek olmadığı görülmektedir. Bu durum, Sunki mandarini dışında melezleme kombinasyonlarında ana ebeveyn olarak kullanılan anaçların poliembriyoniye olan eğilimlerinin yüksek olmasından ileri gelmektedir. Soares Filho ve ark (2002) kontrollü melezleme çalışmaları yaparak farklı turuncgillerde melez elde etme oranını araştırmışlar ve Sunki mandarininin poliembryoni oranının %8.3 olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.19. Melezleme kombinasyonları ile elde edilen bitki sayısı (adet), melez bitki sayısı (adet) ve melez bitki oranı (%)

Ana ebeveyn (♀)	Baba ebeveyn (♂)	Bitki sayısı	Melez bitki sayısı	Melez bitki oranı (%)
Gou Tou turuncu	x Yerli üç yapraklı	182	36	19.78
Çin turuncu	x Rubidoux üç yapraklı	251	78	31.08
Kleopatra mandarini	x Yerli üç yapraklı	17	1	5.88
Sunki mandarini	x Rubidoux üç yapraklı	68	65	95.59
Volkameriana	x Swingle sitrumelo	196	93	47.45
Yuzu	x Pomeroy üç yapraklı	22	0	0.00
Toplam		736	273	37.09

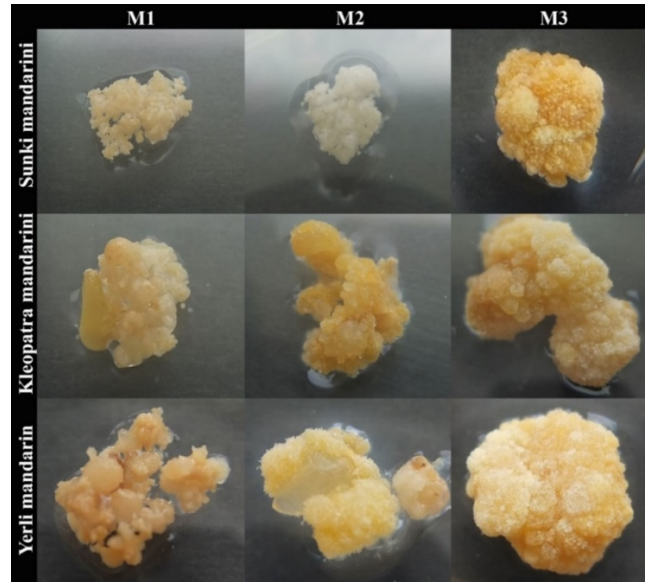
4.4. Somatik Melezleme Yöntemiyle Anaç Popülasyonlarının Oluşturulması

Somatik melezleme yöntemiyle anaç popülasyonlarının oluşturulması kapsamında seçilen kombinasyonlarda protoplast kaynağı olarak embriyogenik kallusları kullanılacak genotiplerden kallus elde etmek amacıyla ovül kültürü çalışmaları yürütülmüştür.

4.4.1. Ovül Kültürü Çalışmasına Ait Bulgular

Ovül kültürü çalışmalarında Kleopatra mandarini, Sunki mandarini ve Yerli mandarin genotiplerinden embriyogenik kallus hatları elde etmek ve somatik melezleme çalışmalarında protoplast kaynağı olarak kullanmak amacıyla izole edilen ovüller farklı büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Ovül kültürü çalışmaları her ortam ve her anaç için 10 petri ve her petride 10 eksplant olacak şekilde iki farklı dönemde (tam çiçeklenmeden 6 ve 8 hafta sonra) yürütülmüştür.

İlk kallus gelişimi, kültürden 5 hafta sonra M1 ortamında bulunan Sunki mandarini ovüllerinde gözlenmiştir. Takip eden haftalarda, çalışmada yer alan tüm genotiplerde kallus gelişimi sağlanmıştır. Ovül kültürünün başlangıcından 120-130 gün sonra besin ortamının durumu ve kallus gelişimine bağlı olarak oluşan kalluslarda % kallus oluşumu hesaplandıktan sonra alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınan ovül eksplantından elde edilmiş kallus görüntülerinden bazıları Şekil 4.71’de sunulmuştur.



Şekil 4.71. Çalışmada kullanılan farklı kültür ortamlarında gelişen kallusların görüntüsü

Kallus oluşum oranı materyal ve metot bölümünde açıklandığı üzere; bir uygulamada bulunan her tekerrürden meydana gelen kallus oluşumları alınarak, o uygulamaya düşen ortalama kallus oluşumu olarak hesaplanmıştır. Eksplantın kültüre alındığı dönem, genotip, besin ortamları ve bunlarının interaksiyonlarının % kallus oluşumuna etkisini incelemek amacıyla elde edilen ortalama değerlere açı transformasyonu uygulanarak üç yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Uygulamaların % kallus oluşum oranına ana ve interaksiyon etkilerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.20'de sunulmuştur.

Elde edilen üç yönlü varyans analizine göre farklı dönemlerde kültüre alınan ovüllerin % kallus oluşum oranına etkisi $\alpha=0.05$ önem düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ortam, genotip, dönem x ortam interaksiyon ve ortam x genotip interaksiyon etkilerinin ise % kallus oluşum oranına etkisi $\alpha=0.01$ önem düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Dönem x genotip ve dönem x ortam x genotip interaksiyon etkilerinin % kallus oluşum oranına etkisi istatistiksel olarak önemli olmadığı yapılan üç yönlü varyans analizi sonuçlarına göre belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Dönem, ortam, genotip ve bu faktörlerin interaksiyonlarının % kallus oluşumu üzerine etkilerine ait üç yönlü varyans analizi sonucu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri	$Pr > F$
Dönem	1	1302.73	1302.73	6.04	0.0155*
Ortam	2	6269.78	3134.89	14.54	<.0001**
Genotip	2	10213.19	5106.59	23.68	<.0001**
Dönem*Ortam	2	3185.44	1592.72	7.39	0.0010**
Dönem*Genotip	2	137.86	68.93	0.32	0.7271
Ortam*Genotip	4	4361.09	1090.27	5.06	0.0009**
Dönem*Ortam*Genotip	4	909.72	227.43	1.05	0.3824

*%95 güvenle istatistiksel olarak önemli olan uygulama etkisini belirtir

**%99 güvenle istatistiksel olarak önemli olan uygulama etkisini belirtir

Ayrıca dönemler içerisinde % kallus oluşum oranı üzerine genotip, ortam ve bunların interaksiyon etkilerini incelemek amacıyla iki yönlü varyans analizine

tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testiyle ($\alpha=0.05$) belirlenmiştir (Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22).

Çizelge 4.21’de tam çiçeklenmeden altı hafta sonra kültüre alınan ovüllerin % kallus oluşum oranları sunulmuştur. Genotip, kültür ortamı ve bunlarının interaksiyonlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri %99 güvenle istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Genotiplerin tam çiçeklenme döneminden altı hafta sonra kültüre alınan tohum taslaklarının kallus oluşturma oranları incelendiğinde her üç ortamda da en yüksek % kallus oluşumunun Kleopatra mandarininde olduğu saptanmış ve bunu sırasıyla Yerli mandarin ve Sunki mandarini izlemiştir. Besin ortamlarının kallus oluşturma oranına etkisi incelendiğinde ise bu dönemde en yüksek kallus oluşum oranı %75.33 ile M3 (EME + 1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA) ortamında olduğu belirlenmiştir. Aynı dönemde, en düşük % kallus oluşumu ise M1 (EME + 1 mg/L Kin) ortamında saptanmıştır. Genotip x kültür ortamı interaksiyon etkisinin % kallus oluşumuna etkisi incelendiğinde en yüksek kallus oluşumunun tam çiçeklenmeden altı hafta sonra M3 ortamında kültüre alınan Kleopatra mandarini (%98.00) genotipinde olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan en düşük % kallus oluşumunun ise M1 ortamında Sunki mandarini (%20.00) eksplantlerinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.21. Tam çiçeklenmeden altı hafta sonra genotip ve kültür ortamlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri

Genotip	Kültür ortamı			Ortalama
	M1	M2	M3	
KM	60.00 (50.96)bc	52.50 (46.76)bc	98.00 (86.36)a	70.17 (61.36)A
SM	20.00 (16.93)e	26.67 (26.08)de	70.00 (62.04)b	38.89 (35.02)C
YM	45.71 (42.60)cd	61.25 (52.13)bc	58.00 (50.34)bc	54.99 (48.36)B
Ortalama	41.90 (36.83)B	46.91 (41.66)B	75.33 (66.24)A	
Genotip $Pr > F$				<.0001*
Kültür ortamı $Pr > F$				<.0001*
Genotip x kültür ortamı interaksiyonu $Pr > F$				0.0021*

KM: Kleopatra mandarini, SM: Sunki mandarini, YM: Yerli mandarin
Parantez içindeki değerler açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir

Tam çiçeklenmeden sekiz hafta sonra genotip ve kültür ortamlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri incelendiğinde sadece genotip faktörünün istatistiksel olarak $\alpha=0.01$ önem seviyesinde önemli olduğu yapılan iki yönlü varyans analizine göre belirlenmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı Kleopatra mandarininde (%60.00) olduğu belirlenmiş olup bu genotipi sırasıyla Yerli mandarin (%45.83) ve Sunki mandarinini (%28.52) izlemiştir. Bu dönemde genotiplere ait ovül eksplantlarının farklı kültür ortamlarında kallus oluşturma oranları %70.00 ile %22.22 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. Tam çiçeklenmeden sekiz hafta sonra genotip ve kültür ortamlarının % kallus oluşum oranı üzerine etkileri

Genotip	Kültür ortamı			Ortalama
	M1	M2	M3	
KM	58.75 (50.62)	51.25 (45.85)	70.00 (59.31)	60.00 (51.93)A
SM	27.78 (31.35)	22.22 (26.25)	35.56 (35.83)	28.52 (31.14)C
YM	41.25 (37.92)	53.75 (47.33)	42.50 (38.53)	45.83 (41.26)B
Ortalama	42.59 (39.96)	42.41 (39.81)	49.35 (44.55)	
Genotip $Pr > F$				<.0001*
Kültür ortamı $Pr > F$				0.4700
Genotip x kültür ortamı interaksiyonu $Pr > F$				0.2841

KM: Kleopatra mandarinini, SM: Sunki mandarinini, YM: Yerli mandarin
Parantez içindeki değerler açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir

Pasquali ve Biricolti (2004), *Citrus limonimedica* türünde yürüttükleri ovül kültürü çalışmalarında MT + 5 mg/l BAP besin ortamında kültüre alınan ovüllerden % kallus oluşum oranının %45 olduğunu bildirmişlerdir. Varol (2007), bazı turuncgil türlerinde ovül eksplantını *in vitro* koşullarda kallus oluşumunu ve bitki oluşumunu araştırmıştır. Araştırmacı en yüksek kallus oluşturma oranının *C. aurantium* (% 52) türünden olduğunu, bunu % 40 kallus oluşturma oranı ile *P. trifoliata* (% 40) cinsinde olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Biçen (2008), bazı turuncgil anaçlarında farklı eksplant kaynağı ve besi ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırmacı ovüllerden elde edilen ortalama % kallus oluşum oranlarının Volkameriana'da %52, Gou Tou turuncunda

%45 ve Tuzcu 31-31 turuncunda ise %30 olduğunu bildirmiştir. Chetto ve ark (2016), anaç ıslah programları kapsamında somatik melezlemelerde protoplast izolasyon kaynağı olarak bazı turuncgil genotiplerinden embriyojenik kallus hatları elde etmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar Yerli üç yapraklı, Kleopatra mandarini, Nasnaran, Volkameriana ve altıntop türlerinden izole ettikleri ovülleri MT ortamına farklı seviyelerdeki 2,4D, BAP ve KIN hormonlarını ekleyerek kültüre almışlardır. Çalışmada en yüksek kallus oluşumunun tüm genotipler için 1mg/l 2,4D + 0.5 mg/l BAP ve 1mg/l 2,4D + 0.5 mg/l KIN hormonlarında gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

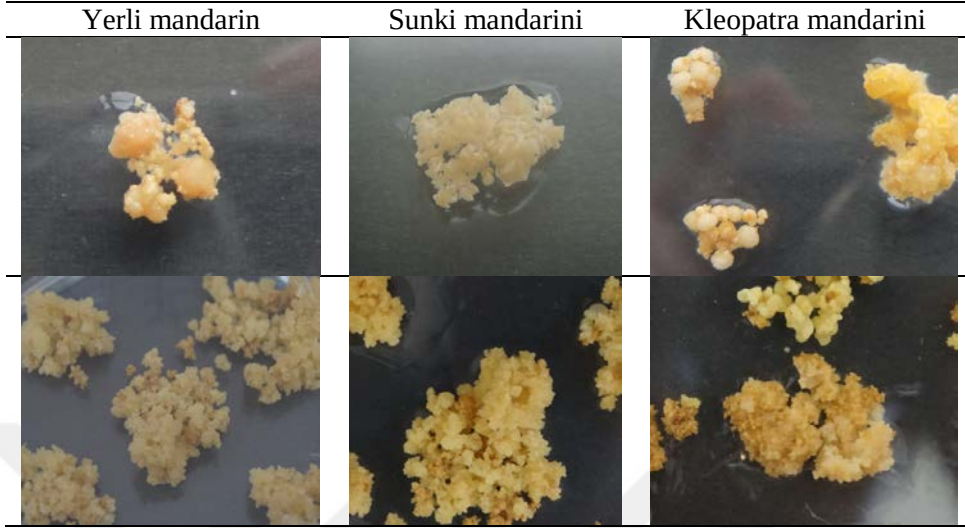
Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen kallus hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksin hormonuna (genellikle 2,4-D) ihtiyaç duyulmaktadır. Embriyojenik hücreler oldukça küçük olmakla birlikte, yoğun sitoplazma içeriğine, büyük çekirdek ve küçük vakuollere sahiptirler. Oksin içeren besin ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortamlara aktarılmalıdır. Bu safhada ortama oksin ilave edilmesi embriyo gelişimini engellemektedir (Özcan ve ark, 2001). Somatik embriyogenesis direk olacağı gibi, embriyogenik kalluslardan da (indirek somatik embriyo oluşumu) elde edilebilir. Direkt somatik embriyogenesisde embriyo, kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden oluşur. Bu tip embriyogenesis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. İndirekt somatik embriyogenesisde ise önce kallus oluşur. Daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşur. Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyojenik kallus adı verilir. Embriyogenik kallus, kompakt yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklere sahiptir (Hatipoğlu, 1999; Şen, 2010).

Çalışmada kültüre başlangıç tarihinden yaklaşık 8 hafta sonra oluşan kalluslar yeniden hazırlanan aynı ortamlara aktarılmıştır. Alt kültüre alma işlemindeki amaç, kallusların protoplast verimliliğine etki eden en önemli faktör olan kallusun kolay dağılır (friable) bir yapı kazanması ve kallus gelişimi için ihtiyaç duyulan bitki besin elementlerinin yenilenmesidir. İlk alt kültürün ikinci ve

üçüncü haftasında her bir genotip için oluşan embriyogenik kalluslar stereo mikroskop altında incelenerek morfolojik olarak saptanmıştır. Embriyogenik kalluslar beyaz/kremsi renk, parlak, kırılkan, kolay dağılabilen, dolgun yuvarlak yapılarıyla gelişen diğer kallus hücrelerinden ayırt edilmiştir (Şekil 4.74).

Embriyogenik kallusların gözlemleri için ovül kültüründen elde edilen tüm kalluslar taranmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda embriyogenik kallus oluşum oranları incelendiğinde, kültüre alınan Yerli mandarin ovüllerinden sadece M1 ortamında %8 oranında embriyogenik kallus geliştiği, Kleopatra mandarininde M3 ortamında %2 oranında ve Sunki mandarininde M1 ortamında %3 oranında kültüre alınan ovüllerden kallus geliştiği gözlemlenmiştir. Çalışmada söz konusu genotiplerin tümünde tam çiçeklenme dönemlerinden 6 hafta sonra yapılan ovül kültüründen embriyogenik kallus gelişimi gözlemlenmiştir. Embriyogenik kallus oluşum değerlerinde her genotip için kullanılan ortamlardan sadece bir tanesinde ve tek dönemde gelişim gözlemlendiğinden çalışmada bu değişken için varyans analizi uygulamak mümkün olmamıştır.

Şekil 4.72’de somatik melezleme çalışmalarında kullanılmaya uygun embriyogenik yapıda olan Yerli mandarin, Sunki mandarini ve Kleopatra mandarinine ait kallus hatlarından örnekler sunulmuştur.



Şekil 4.72. Seçilerek alt kültüre alınan embriyojenik kalluslar (üst satır) ve alt kültürde gelişerek çoğalmış kalluslar (alt satır)

4.4.2. Protoplast İzolasyonu

4.4.2.1. Embriyojenik Kalluslardan Protoplast İzolasyonu

Çalışmada yer alan genotiplerin ovüllerinin kültüre alınmasıyla elde edilen embriyogenik kalluslardan yaklaşık 400 mg kolay dağılır (friable) yapıda olan hücreler seçilerek petri kaplarına aktarılmış ve kallus hücreleri üzerine 0.7 M BH3 protoplast kültür ortamı eklenmiştir. Daha sonra besin ortamı içerisinde bulunan hücrelerin üzerine hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış enzim solüsyonu eklenmiştir.

Çalışmada, farklı izolasyon koşullarının protoplast verimliliğine etkisi hemositometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara yapılan varyans analizine göre genotip ve izolasyon koşullarının protoplast miktarı üzerine istatistiksel olarak önemli ($p \leq 0.01$) etkileri saptanmış, interaksiyon etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.23). Çalışmada genotipler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu, kullanılan bu izolasyon koşullarında genotiplerden elde edilen protoplast miktarlarının değişim gösterdiği belirlenmiştir. Assani ve ark (2001) protoplast

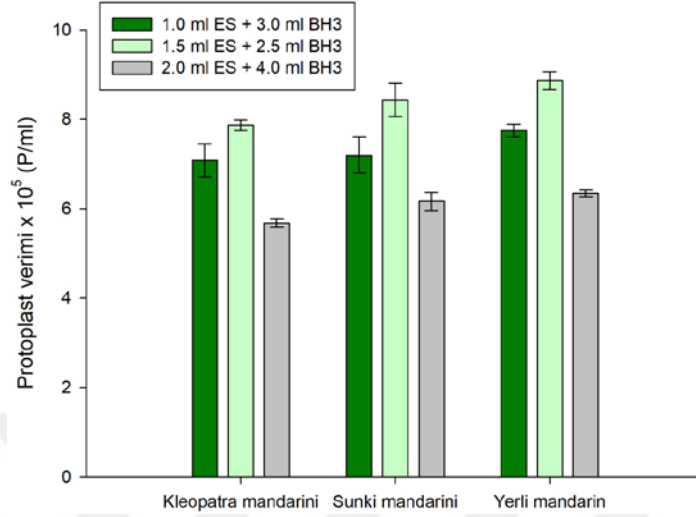
izolasyonundaki başarının, kullanılan donör materyal, enzim karışımı, besin ortamı ve ortamda büyümeyi düzenleyicilerin varlığı gibi birçok faktöre bağlı olduğunu bildirmiştir.

Tüm genotipler izolasyon koşulları bakımından incelendiğinde 1.5 ml enzim solusyonu + 2.5 ml BH3 koşullarında yapılan enzimatik sindirme ve izolasyonda diğer uygulamalara göre daha fazla sayıda protoplast elde edildiği gözlemlenmiştir. Protoplast izolasyon çalışması genotipler bakımından değerlendirildiğinde en yüksek protoplast verimliliğinin Yerli mandarinden genotipinin embriyojenik kalluslarından elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.73). Çalışmadan elde edilen embriyojenik kallus kaynaklı protoplast hücrelerine ait mikroskop görüntülerinden bazıları Şekil 4.74'de sunulmuştur. Kullanılan farklı enzimlere ve miktarlarına bağlı olarak tütünde (Nagata ve Takade, 1984), lilyumda (Chamani ve ark, 2012), patlıcanda (Saxena ve ark, 1987) ve turuncgillerde (Grosser ve ark, 1996) elde edilen protoplast miktarının değişim gösterdiği bildirilmektedir. Chamani ve ark, 2012 izolasyon karışımında artan enzim miktarına bağlı olarak protoplast verimliliğinin artış gösterdiğini belirtmiştir.

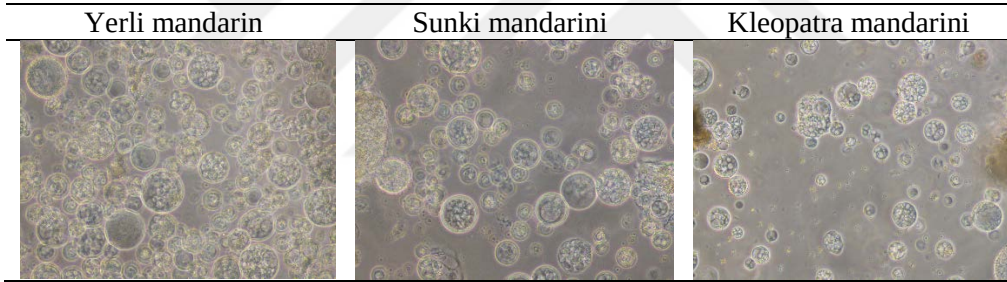
Çizelge 4.23. Farklı izolasyon koşullarında kallus protoplast verimi (P/ml x 10⁵)

Genotip	İzolasyon koşulu			Ortalama
	IK1	IK2	IK3	
KM	7.08±0.37	7.87±0.12	5.68±0.09	6.88 b
SM	7.20±0.40	8.43±0.40	6.17±0.20	7.27 ab
YM	7.75±0.14	8.87±0.14	6.35±0.08	7.66 a
Ortalama	7.34 b	8.39 a	6.07 b	
Genotip $Pr>F$				0.0051*
İzolasyon koşulu $Pr>F$				<.0001*
Genotip x izolasyon koşulu interaksyonu $Pr>F$				0.8470

KM: Kleopatra mandarini, SM: Sunki mandarini, YM: Yerli mandarin



Şekil 4.73. Farklı enzim ve besin ortamı koşullarında embriyojenik kalluslardan elde edilen protoplast verimi (P/ml x 10⁵)



Şekil 4.74. Çalışmada embriyojenik kallus hatlarından elde edilen protoplast hücrelerinden genel görüntüler

4.4.2.2. Yapraklardan Protoplast İzolasyonu

Somatik melezleme çalışmalarında ikinci ebeveyn olarak Carrizo sitranjı, Benecke üç yapraklı ve Rubidoux üç yapraklı genotiplerinin 3-4 haftalık henüz gelişmesini tamamlamış genç yapraklar, protoplast izolasyonu çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

Seradaki bitkilerden alınan yaprak materyali laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra yapraklar steril pens yardımıyla steril petri kutularına aktarılarak yaprakların kanatçık ve orta damarı bistüri yardımıyla

çıkarılmıştır. Yapraklar selüloz, pektinaz ve maceraz enzimlerinin etki edeceği yüzey alanını artırmak amacıyla ince ve düzgün aralıklarla ince şeritler halinde kesilmiştir. Çalışmada enzimatik sindirme sonrası farklı izolasyon koşullarının protoplast verimliliğine etkisi hemositometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla belirlenmiştir.

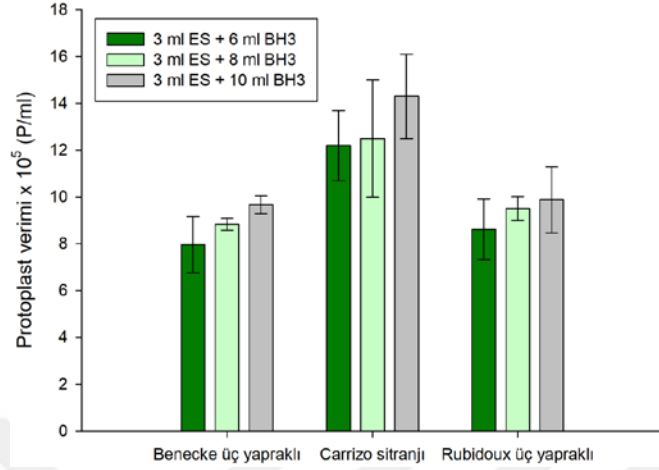
Elde edilen bulgulara yapılan varyans analizine göre genotip faktörünün protoplast miktarı üzerine istatistiksel olarak önemli ($p \leq 0.01$) etkisi saptanmış, izolasyon koşulu ve interaksiyon etkisinin ise istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

Tüm genotipler izolasyon koşulları bakımından incelendiğinde 3.0 ml enzim solusyonu + 10 ml BH3 koşullarında yapılan enzimatik sindirme ve izolasyonda diğer uygulamalara göre daha fazla sayıda protoplast elde edildiği gözlemlenmiştir. Protoplast izolasyon çalışması genotipler bakımından değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamakla birlikte en yüksek protoplast verimliliğinin Carrizo sitranjının yapraklarından elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.75). Çalışmadan elde edilen yaprak mezofil protoplastlarına ait mikroskop görüntülerinden bazıları Şekil 4.76’da sunulmuştur.

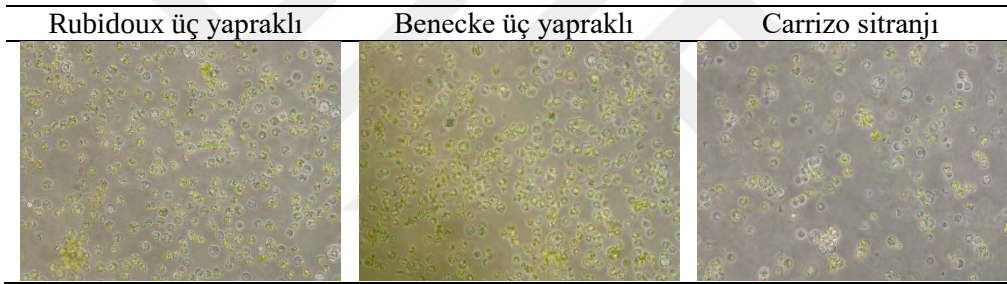
Çizelge 4.24. Farklı enzim ve besin ortamlarında yaprak protoplast verimi (P/ml x 10^5)

Genotip	İzolasyon koşulu			Ortalama
	IK1	IK2	IK3	
BU	7.95±1.21	8.83±0.25	9.67±0.38	8.82 b
CS	12.20±1.53	12.50±2.49	14.30±1.78	13.00 a
RU	8.62±1.29	9.51±0.51	9.88±1.42	9.34 b
Ortalama	9.59	10.28	11.28	
Genotip $Pr > F$				0.0005*
İzolasyon koşulu $Pr > F$				0.1789
Genotip x izolasyon koşulu interaksiyonu $Pr > F$				0.2172

BU: Benecke üç yapraklı, CS: Carrizo sitranjı, RU: Rubidoux üç yapraklı



Şekil 4.75. Farklı enzim ve besin ortamı koşullarında embriyojenik kalluslardan elde edilen protoplast verimi (P/ml x 10⁵)

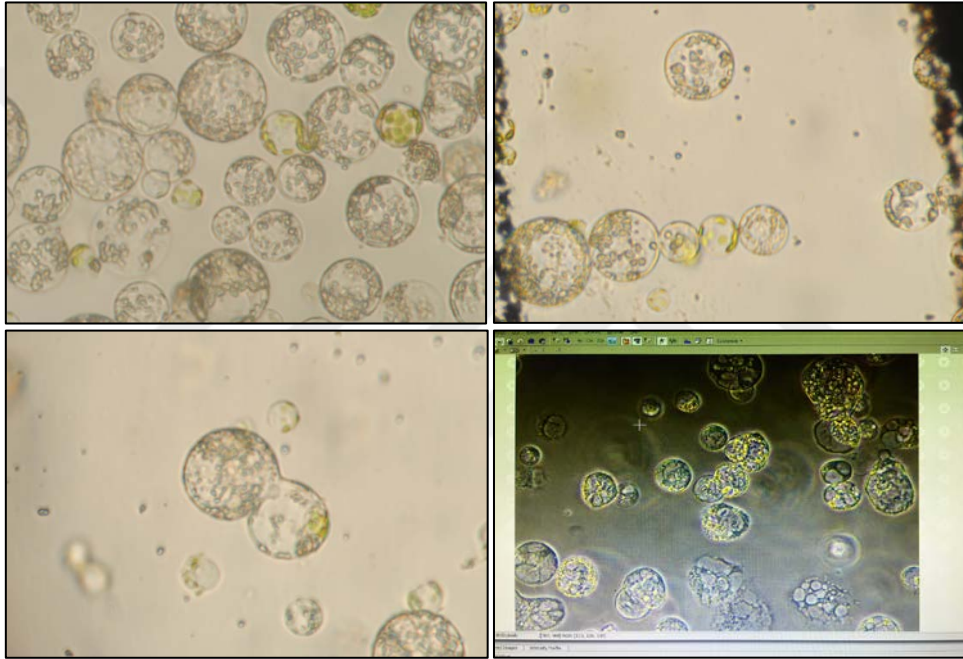


Şekil 4.76. Rubidoux üç yapraklı, Benecke üç yapraklı ve Carrizo sitranjı yapraklarından elde edilen mezofil protoplastlarından genel görüntüler

4.4.3. Protoplast Füzyonu

Embriyogenik kallus hücrelerinden ve yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastlar belirtilen miktarlarda 0.8 M mannitol + 0.5 mM CaCl₂ izotonik protoplast solusyonu içerisinde son hacimlere getirildikten sonra elektrofüzyon işlemine geçilmiştir. Füzyon jenaratörüne probalar bağlanarak önce optimum füzyon koşulları için 20 s 20 V elektrik verilerek hizalama gerçekleştirilmiş ve 35 µs süresince 220 V üç kere verilerek aseptik koşullarda füzyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır (Şekil4.77).

Kleopatra mandarini + Rubidoux üç yapraklı, Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı somatik melezleme kombinasyonlarında yürütülen füzyon işlemi sonrası heterokaryonların rejenerasyon şansını arttırmak amacıyla ebeveynlerden elde edilen protoplastların tümü melezlemede gerekli uygun hücre yoğunluğu değeri göz önünde bulundurularak kullanılmıştır.



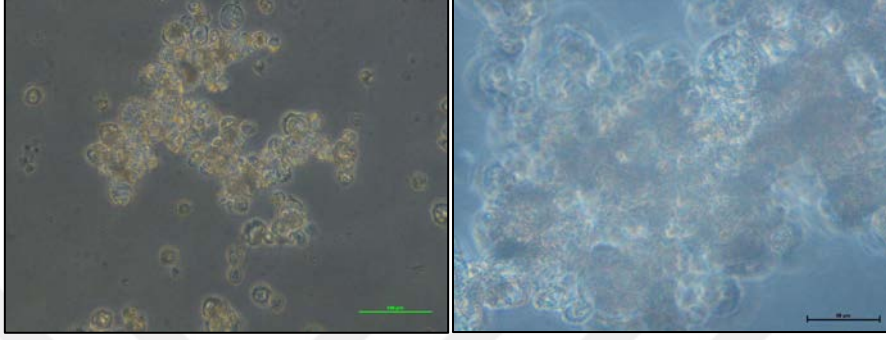
Şekil 4.77. Füzyon işleminin gerçekleşme aşamasına ait genel görüntüler

4.4.4. Heterokaryonların Rejenerasyonu

Füzyon işleminden hemen sonra heterokaryonlar agar üzerinde sıvı kültür tekniği prensibi esasına göre kültüre alınmıştır. Kültüre alınmış heterokaryonların gelişme durumu günlük olarak gözlemlenmiştir.

Heterokaryonların aydınlıkta kültüre alınmasından yaklaşık 20-25 gün sonra hücre koloni varlığı ve hücre kolonilerinden pro-embriyoları oluşturacak mikro

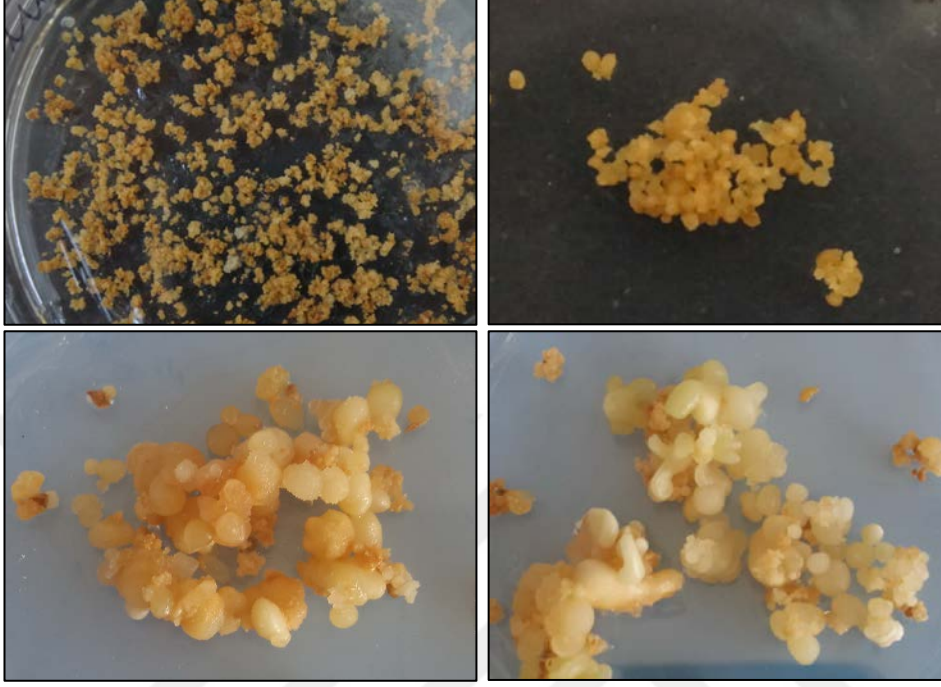
kallusların oluşumu tüm somatik melezleme kombinasyonlarında gözlemlenerek kaydedilen görüntüler Şekil 4.78’de sunulmuştur.



Şekil 4.78. Kültürden 20 gün sonra heterokaryonlardan elde edilmiş hücre kolonileri (sağda) ve mikro kallus oluşumu (solda)

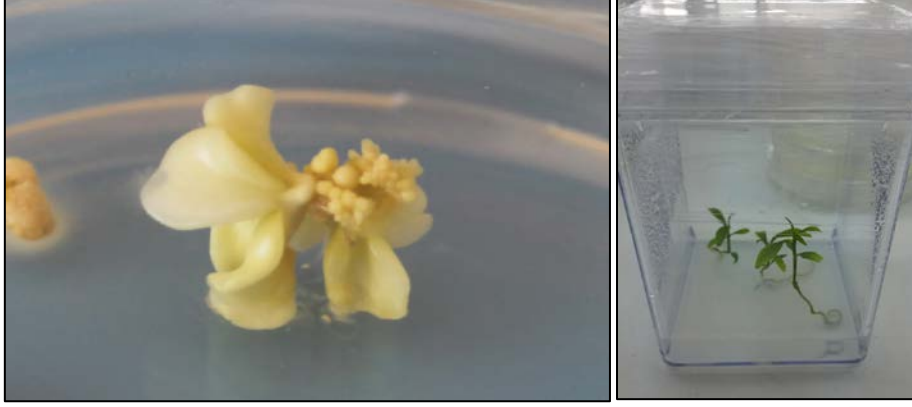
Elde edilen mikro-kalluslar elektro füzyon işlemini takip eden 30. gün sonunda 25 ml modifiye edilmiş MT besin ortamını içeren petri kaplarında kültüre alınmıştır.

Bir ay süresinde bu ortamda kalan mikro-kalluslardan embriyojenik kallusların gelişimi Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonlarında gözlemlenmiştir. Kleopatra mandarini + Rubidoux üç yapraklı kombinasyonundan ise hücre kolonileri ve mikro kalluslardan embriyojenik kallus gelişimi elde edilememiştir. Embriyo gelişimini takiben embriyoların olgunlaşması amacıyla besin ortamı değiştirilmiş ve embriyolar 0.15 M galaktoz içeren MT besin ortamında olgunlaştırılmıştır (Şekil 4.79).



Şekil 4.79. MT besin ortamında mikro kalluslardan embriyojenik kallusların ve embriyoların oluşumu (üst satır) ile heterokaryonlardan elde edilmiş gelişmekte olan olgunlaştırılmış embriyolar (alt satır)

Bir ay süreyle olgunlaştırma ortamında tutulan embriyolarda çimlenmeyi sağlamak amacıyla ortam değişikliği yapılmıştır. Embriyoların çimlendirme ortamına aktarılmasından yaklaşık 20 gün sonra yani füzyondan yaklaşık 80 gün sonra ilk embriyo çimlenmesi gerçekleşmiştir. Çimlenen bitkicikler, bitki gelişimi ve sürgün oluşumunu sağlamak amacıyla MT/2 + 0.1 M sorbitol + 0.1 M galaktoz + 0.3% gelrite ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyonu tamamlanan bitkicikler 7.5 g/L agar ile katılaştırılmış herhangi bir bitki büyüme düzenleyici içermeyen 45 ml MT/2 besin ortamı içeren magentalara aktarılmıştır (Şekil 4.80).



Şekil 4.80. Heterokaryonlardan elde edilen somatik embriyoların çimlenmesi ve gelişim gösteren embriyolardan elde edilen bitkiciklerden genel görüntüler

Somatik melezleme çalışmaları süresince Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı kombinasyonundan 1 adet ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonundan 3 adet olmak üzere toplam 4 adet bitki elde edilmiştir.

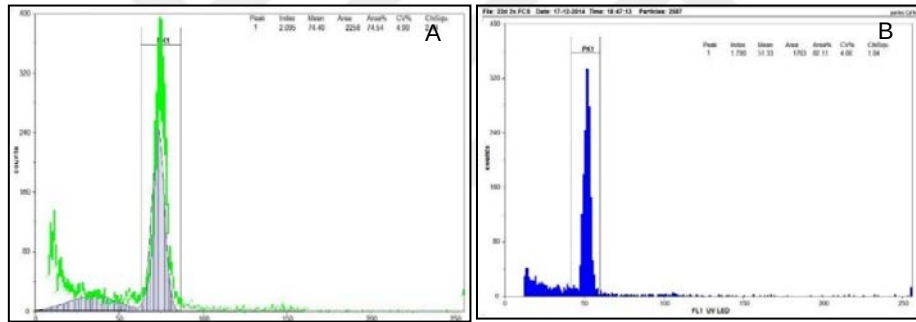
4.4.5. Füzyon Ürünlerinde Flow sitometri yoluyla Ploidi Analizi

Elektro füzyon sonrasında kültüre alınan protoplastlar kallustan gelen embriyojenik yapıdaki protoplast, kallus + yaprak mezofil protoplastlarının füzyonu (heterokaryon) ve yaprak mezofil protoplastları olmak üzere 3 şekilde olabilmektedir. Bu 3 yapı arasında, yaprak mezofil hücrenin rejenere olabilme ihtimali daha düşüktür. Ancak heterokaryonlarla birlikte füzyona uğramamış kallus kaynaklı yüksek totipotensi kabiliyetine sahip protoplastların da rejenere olması söz konusudur. O nedenle elektrofüzyon sonrası elde edilen bitkilerde tez çalışmasının ‘Materyal ve Metod’ bölümünde açıklandığı gibi flow sitometri analizi yapılarak ploidi seviyeleri belirlenmiştir.

Somatik melezleme çalışmalarından elde edilen 1 adet Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı somatik melezi ve 3 adet Yerli mandarin + Carrizo sitranjı somatik melezinde flow sitometri yoluyla ploidi analizi için ikişer yaprak örneği alınmıştır. Toplamda 4 adet yaprak örneğinde flow sitometri cihazında okuma

yapılmıştır. Örnek okumalarına geçilmeden önce melezlerin ebeveynlerinden alınan diploid yaprak örneklerinde okumalar yapılarak elde edilen piklerin 365 nm dalga boyundaki pik noktaları belirlenmiştir.

Flow sitometri yoluyla ploidi analizi sonucunda her bir yaprak örneği triploid referans bitkiden elde edilen pik noktasının altında nükleer DNA içeriği piki oluşturmuş ve bitkiciklerden alınan yaprak örneklerinin diploid olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.81). Flow sitometri analizi sonuçlarına göre elde edilen 4 bitkiciğin diploid olduğu belirlenmiştir. Bitkiciklerin ovül kültürü yoluyla elde edilen embriyogenik kalluslarından izole edilen protoplast hücrelerinden füzyona uğramayanlarının indirek rejenerasyonu sonucu geliştiği, yani allotetraploid somatik melez olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.81. Somatik melezleme çalışmalarından elde edilen bitkiciklerin nükleer DNA içeriği. A: 3x ploidi seviyesinde referans bitki, B: embriyogenik kaynaklı protoplast hücrelerinden rejenerasyon alan diploid bitkicikler

Geleneksel ıslah yöntemleriyle turunçgil anaç ıslah programlarında kullanılan genotiplerde görülen biyolojik faktörler anaç popülasyonlarının oluşturulması ve seleksiyonu sınırlamakta ve anaç geliştirmede sürdürülebilirliği azaltmaktadır. Turunçgil anaç ıslah programlarındaki başarı geleneksel yöntemlerin biyoteknolojik yöntemlerle desteklenmesine bağlıdır (Grosser ve Gmitter 1990).

Polyiloidi, bitkilerin evrimini yönlendiren ve ıslah bakımından büyük avantajlar sağlayan bir kavramdır. Turunçgil ıslah programlarında kullanılan protoplast füzyonu ile allotetraploid somatik melezlerin geliştirilmesi yaygın olarak

kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, iki farklı ebeveynin tüm genomunun birleştirilerek bir genotipte toplanmasına ve böylece ebeveyn heterozigotluğundan bağımsız olarak, tamamlayıcı baskın karakterlerin bir bireyde ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte bu yöntem ıslah programlarında kullanılan ebeveynlerin üreme biyolojisinin getirdiği bir takım kısıtlamaların önüne geçilmesi bakımından da önem taşımaktadır (Ruiz ve ark, 2018).

Turunçgil protoplastlarından bitki rejenerasyonu 1970'li yılların başında Kochba ve arkadaşlarının 1972 yılında Yafa portakal çeşidinde ovüllerin kültüre alınması sonucu embriyojenik yapıda olan kallusların elde edilmesiyle başlamıştır (Kochba ve ark, 1972; Grosser ve Gmitter 1990). Elde edilen embriyojenik kallusların totipotansi kabiliyetini kullanarak bu yapılardan protoplast hücreleri elde edilmiş ve elde edilen protoplastlardan önce kallus oluşumu daha sonra somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu sağlanmıştır.

Turunçgillerde protoplastlardan bitki elde edilmesi turunçgillerde protoplast füzyonu yoluyla somatik melezleme çalışmalarının başlamasına olanak sağlamıştır. Turunçgillerde ilk başarılı somatik melezleme ise *Citrus* cinsinin (Tovita portakalı) embriyojenik protoplastlarıyla *P. trifoliata* arasında gerçekleştirilmiş ve bu kombinasyon üzerinde çalışılarak allotetraploid somatik melez bitkiler elde edilmiştir (Ohgawara ve ark, 1985). Ayrıca bu yöntem cinsler arası uyumsuzluk görülen bireyler arasında denenmiş ve *Citrus* cinsi içerisinde yer alan Hamlin portakalının embriyojenik kalluslarından izole edilen protoplastlar ve *Severinia disticha* türünün embriyojenik kalluslarından izole edilen protoplastlar füzyona uğratarak bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Daha sonra çok sayıda türler arası ve cinsler arası melezler elde edilmiştir. Bu çalışmalar ile gametik kısırlıkların üstesinden gelinmesi ve uyumsuz genotiplerin melezlenebilmesinin olanaklı hale getirildiği bildirilmiştir (Grosser ve ark, 1988). Bu gelişmeleri takip eden yıllarda yeni çeşit ve anaçların geliştirilmesine yönelik başta Florida Üniversitesi olmak üzere A.B.D., Fransa, İspanya ve Çin'de çok sayıda ülkede turunçgillerde cinsler arası ve türler arası somatik melezleme çalışmaları yürütülerek pek çok sayıda

somatik melez genotipler elde edilmiştir (Grosser ve Gmitter, 1990; Louzada ve ark., 1993; Ollitrault ve ark., 1994; Chen ve ark., 2004; Mourao Filho ve ark., 2008; Dambier ve ark., 2011; Ruiz ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasıyla birlikte ülkemiz Akdeniz bölgesi koşullarına iyi adapte olabilen yeni turunçgil anaçlarının geliştirilmesi hedefiyle yola çıkılmış, turunçgil yetiştiriciliğinde anaç olarak kullanılan ya da anaç olabilme özelliğine sahip genotipler belirlenerek klasik melezlemelerle birlikte somatik melezleme çalışmaları yürütülmüştür. Ülkemizde günümüze kadar turunçgillerde yürütülen protoplast füzyonu yoluyla somatik melezleme çalışmaları oldukça sınırlı kalmıştır. Koc ve ark (1999), protoplast füzyonu ile limonda uçkurutan hastalığına dayanıklı bireyler elde etme olanaklarını araştırmışlar ve allotetraploid limon genotipleri elde etmişlerdir. Ayrıca Yeşiloğlu ve ark (2015), yürüttükleri proje kapsamında turunca alternatif yeni anaçlarının geliştirilmesine yönelik klasik melezleme çalışmalarıyla birlikte somatik melezleme yöntemiyle allotetraploid bireyler elde etme olanaklarını araştırmışlardır.

Bu tez çalışmasında ise turunçgil yetiştiriciliğinde anaç olarak kullanımı önem arz eden bireylerde somatik melezleme çalışmaları yürütülerek protoplastlardan bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Grosser ve Gmitter (1990), turunçgillerde protoplast füzyonu işleminden sonra hücrelerin bulunduğu besin süspansiyonunda ebeveyn hücreleri, aynı bireye ait füzyona uğramış protoplast hücreleri ve ayrı bireylere ait füzyona uğramış heterokaryonların bulunduğunu, dolayısıyla her üç olasılığın da rejenere olabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar füzyondan hemen sonra başlayan rejenerasyon aşamalarında herhangi bir seçim yapılamadığından dolayı, elde edilen bitkilerin morfolojik ve moleküler yöntemlerle karakterize edilmesinin gerekliliğini vurgulamışlardır.

Ollitrault ve ark (1996) ise füzyon ürünlerinin *in vitro* aşamada flow sitometriyle ploidi analizi ve kodominant izozim analizleriyle somatik melezlerin tespit edilmesinin mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen somatik melezleme çalışmalarından elde edilen bitkilerde *in vitro* aşamasında alınan yaprak örneklerinde flow sitometri yoluyla ploidi analizi yapılarak, bireylerin diploid olduğu yani embriyojenik kalluslardan elde edilen protoplastların rejenere olduğu belirlenmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, dünya pazarlarında yer bulabilecek verimli, yüksek kaliteli, özellikle çekirdeksiz ve orta-geç dönemde olgunlaşan yeni mandarin çeşitlerinin geliştirilebilmesine yönelik akut gama ışını uygulamasıyla mutant mandarin popülasyonu oluşturulmuştur. Ayrıca, ploidi ıslahı programında çekirdeksiz, ihracata uygun yeni mandarin ve portakal çeşitlerinin geliştirilebilmesine yönelik olarak kimyasal mutagen uygulamalarıyla tetraploid ebeveynler elde edilmiştir.

Öte yandan, ülkemiz ekolojik koşullarına uygun turunca alternatif yeni anaçların geliştirilmesine yönelik popülasyonların oluşturulması amacıyla klasik ve somatik melezleme çalışmaları yürütülmüştür.

2014-2018 yılları arasında yürütülen tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen araştırmalardan elde edilen sonuçlar aşağıdaki maddeler halinde özetlenerek ele alınmıştır.

- 1) Yeni mandarin çeşitlerinin mutasyon ıslahı yoluyla geliştirilmesine yönelik olarak Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerine gama ışını uygulamaları yapılmıştır. Hernandina çeşidinde uygulama sonrası canlılık oranı %55.17, Ortanique tangor çeşidinde ise canlılık oranının %60.34 olduğu saptanmıştır. Çalışmada gözlemlenen % canlılık oranları ⁶⁰Co kaynağı kullanılarak 50 gray akut gama ışın uygulamasının, çalışmada yer alan mandarin çeşitlerinde letal 50 dozu olarak kullanılabileceğini göstermiştir.
- 2) Gama ışını uygulamaları sonucu Hernandina çeşidinden 363 adet, Ortanique çeşidinden 852 adet olmak üzere toplam 1251 adet fidan araziye dikilerek mandarin mutant popülasyonu oluşturulmuştur.
- 3) Tez çalışması süresi içerisinde araziye dikilen 363 adet Hernandina M₁V₃ bireyinden 89 tanesinin, 852 adet Ortanique M₁V₃ bireyinden ise 68 tanesinin 10 adedin üzerinde meyve verdiği gözlemlenmiştir. Bu bireylerde ilk yıl

meyve örnekleri alınarak bireyler arasında pomolojik analizler yapılmıştır. Pomolojik analizlerde Hernandina mutantlarında 20 adet, Ortanique mutantlarında ise 19 adet değişken incelenmiştir.

- 4) Pomolojik analizlerden elde edilen bulgulara tanımlayıcı istatistik ve dağılımı analizleri uygulanarak ışın uygulamasının bireylerin meyve karakterlerine etkisi ortaya konulmuştur. Yapılan analizler sonucunda özellikle meyve iriliği, meyve başına düşen tohum sayısı ve SÇKM/Asit oranı değişkenleri bakımından yüksek varyasyon olduğu tespit edilmiştir.
- 5) Hernandina popülasyonunda değerlendirilen mutantlar içerisinde H1019, H1031, H1033 ve H1077 kodlu bireylerin ortalama tohum sayıları sırasıyla 0.5, 0.17, 0.86 ve 0.75 adet olarak belirlenmiştir. Ortanique M₁V₃ popülasyonu içerisinde ilk yıl gözlemi yapılarak değerlendirilen bireyler içerisinde 2-88 ve 5-70 kodlu bireylerin ortalama tohum sayısı “0.60”, 1-24 ve 5.90 kodlu bireylerinin ortalama tohum sayısının “1” olduğu belirlenmiştir.
- 6) Aşı gözü kalemlerine yapılan kolhisin uygulaması sonucunda W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden toplam 1350 aşı gözünden sırasıyla 80, 58 ve 123 olmak üzere 261 adet fidan elde edilmiş ve ortalama canlılık oranı %19.33 olarak belirlenmiştir. Bu denemede Klemantin 22D mandarinine ait bir adet tetraploid birey, çeşidin aşı gözü kaleminin 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir. Ayrıca Moro kan portakalına yapılan uygulamadan 3 adet, W.Murcott çeşidinde ise 1 adet mixoploid birey elde edilmiştir.
- 7) Sürgünlere kolhisin uygulaması denemesinde ise W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden toplam 1350 aşı gözünden sırasıyla 151, 133 ve 181 olmak üzere 465 adet sürgün elde edilmiş ve ortalama canlılık oranı %34.44 olarak belirlenmiştir. Flowsitometri analizleri sonucunda 6 saat süreyle %0.6 dozunda kolhisin uygulanmasından Klemantin 22D mandarininden bir adet tetraploid (4x) bitki edilmiştir. Ayrıca Klemantin 22D mandarini sürgünlerine 6 saat süreyle %0.2 dozunda yapılan kolhisin uygulaması sonucunda iki adet

mixoploid ($2x+4x$) bitki elde edilmiştir. W.Murcott mandarininden alınan yaprak örneklerinde bir adet tetraploid ($4x$) ve bir adet mixoploid ($2x+4x$) bitki belirlenmiştir. Moro kan portakalından alınan yaprak örneklerinde ise bir adet tetraploid ($4x$) ve bir adet mixoploid ($2x+4x$) bitki tespit edilmiştir.

- 8) Melezlemelerde yer alan baba ebeveynlere ait genotiplerden elde edilen çiçek tozlarına uygulanan TTC testinde canlılık düzeyleri Pomeroy üç yapraklı, Swingle sitrumelo, Carrizo sitranjı ve Rubidoux üç yapraklı genotiplerinde sırasıyla %77.41, %72.97, %67.67 ve %67.17 olarak belirlenmiştir.
- 9) Melezleme çalışmalarında en yüksek meyve tutma oranı %18.57 ile Sunki mandarini x Rubidoux üç yapraklı kombinasyonundan, en düşük ise Yuzu x Pomeroy üç yaprak melezleme kombinasyonundan elde edilmiştir. Melezleme çalışmaları sonucundan en yüksek tohum sayısı Volkameriana x Swingle sitrumelo kombinasyonundan en düşük tohum sayısı ise Yuzu x Pomeroy kombinasyonundan elde edilmiştir. Çalışmada meyve başına düşen en yüksek tohum sayısı ise Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı kombinasyonda saptanmıştır.
- 10) Klasik melezlemeler sonucunda elde edilen tohumların çimlendirilmesinin ardından Çin turuncu x Rubidoux kombinasyonundan 251 adet, Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 182 adet, Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 17 adet, Sunki mandarini x Rubidoux kombinasyonundan 68 adet, Volkameriana x Swingle sitrumelo kombinasyonundan 196 adet ve Yuzu x Pomeroy üç yapraklı melezleme kombinasyonundan 22 adet olmak üzere toplam 736 adet bitki elde edilmiştir.
- 11) Bu anaç popülasyonundan zigotik kökenli bireylerin tespiti morfolojik ve moleküler olarak yapılmıştır. Çin turuncu x Rubidoux kombinasyonundan 78 adet, Gou Tou turuncu x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 36 adet, Kleopatra mandarini x Yerli üç yapraklı kombinasyonundan 1 adet ve Sunki mandarini x Rubidoux melezleme kombinasyonundan 65 adet bitkinin melez olduğu morfolojik olarak belirlenmiştir.

- 12) Ayrıca Volkameriana x Swingle sitrumelo kombinasyonundan elde edilen toplam 196 bitkiden 19 bitkinin üç yapraklılık özelliği gösteren zigotik kökenli olduğu morfolojik olarak tespit edilmiştir. Geriye kalan 177 bitkinin zigotik (melez) veya nuseller embriyodan geliştiğini belirlemek için 5 adet SSR primer çifti kullanılmış ve 74 adet melez bitki nuseller olanlardan başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Böylece çalışmada ele alınan kombinasyonlarda gerçekleştirilen melezlemelerden toplam 736 bitkiden 273 adet melez bitki morfolojik ve moleküler olarak tespit edilmiş bulunmaktadır.
- 13) Tez çalışmasında klasik melezlemelerle anaç popülasyonlarının oluşturulmasının yanında ayrıca protoplast füzyonu yoluyla Kleopatra mandarinini + Rubidoux üç yapraklı, Sunki mandarinini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı somatik melezlemeler yapılmıştır. Somatik melezleme yöntemiyle anaç popülasyonlarının oluşturulması kapsamında seçilen kombinasyonlarda protoplast kaynağı olarak embriyogenik kallusları kullanılacak genotiplerden kallus elde etmek amacıyla ovül kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Somatik hibridizasyon çalışmalarında yer alan Yerli mandarin, Kleopatra mandarinini ve Sunki mandarinine ait embriyogenik kallusları elde etmek amacıyla üç farklı besin ortamında yürütülen ovül kültürü çalışmasında en yüksek kallus oluşumu oranı tam çiçeklenmeden 6 ve 8 hafta sonra sırasıyla %70.17 ve %60.00 olarak Kleopatra mandarininde gözlemlenmiştir.
- 14) Elde edilen kallus hatlarında yapılan gözlemler sonucunda embriyogenik kallus oluşumu incelenmiş, kültüre alınan Yerli mandarin ovüllerinden sadece M1 ortamında %8 oranında embriyogenik kallus geliştiği, Kleopatra mandarininde M3 ortamında %2 oranında ve Sunki mandarininde M1 ortamında %3 oranında embriyogenik kallus eldesi sağlanmıştır. Embriyogenik kalluslar alt kültürlerde çoğaltılarak somatik melezleme çalışmalarında protoplast kaynağı olarak kullanılmıştır.
- 15) Çalışmada 3 farklı genotipten en yüksek miktarda protoplast izolasyonunun sağlanması amacıyla farklı izolasyon koşulları araştırılmıştır. Tüm genotipler

izolasyon koşulları bakımından incelendiğinde, 1.5 ml enzim solusyonu + 2.5 ml BH3 koşullarında yapılan enzimatik sindirme ve izolasyonda embriyojenik kalluslarda diğer uygulamalara göre daha fazla sayıda protoplast elde edildiği gözlemlenmiş olup, her üç farklı koşulda da en yüksek protoplast verimi Yerli mandarininden elde edilmiştir.

- 16) Çalışmada benzer şekilde Carrizo sitranjı, Benecke üç yapraklı ve Rubidoux üç yapraklı genotiplerinin yapraklarından farklı izolasyon koşullarında protoplast eldesi araştırılmıştır. Tüm genotipler için en yüksek protoplast miktarı 3.0 ml enzim solusyonu + 10 ml BH3 koşulunda sağlanmıştır. Çalışmada Carrizo sitranjından her üç uygulamada da Benecke ve Rubidoux üç yapraklıya oranla daha yüksek miktarda protoplast elde edilmiştir.
- 17) Mikro-kalluslardan embriyojenik kallusların gelişimi Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonlarında gözlemlenmiştir. Kleopatra mandarini + Rubidoux üç yapraklı kombinasyonundan ise hücre kolonileri ve mikro kalluslardan embriyojenik kallus gelişimi elde edilememiştir.
- 18) Füzyondan yaklaşık 80 gün sonra ilk embriyo çimlenmesi gerçekleşmiştir. Protoplast füzyonu sonrası mikro-kallus ve somatik embriyolardan Sunki mandarini + Benecke üç yapraklı kombinasyonundan 1 adet ve Yerli mandarin + Carrizo sitranjı kombinasyonundan 3 adet olmak üzere toplam 4 adet bitkicik rejenere edilmiştir.
- 19) Ancak heterokaryonlarla (kallus + yaprak mezofil protoplastlarının füzyonu) birlikte füzyona uğramamış kallus kaynaklı protoplastların da rejenere olması söz konusu olduğu için flow sitometri analizi yapılarak ploidi seviyeleri belirlenmiştir. Flow sitometri analizi sonuçlarına göre elde edilen bitkiciklerin diploid Sunki ve Yerli mandarinlerinin ovül kültürü yoluyla elde edilen embriyojenik kalluslarından izole edilen protoplast hücrelerinin füzyona uğramadan rejenerasyonu sonucu geliştiği, yani somatik melez olmadığı belirlenmiştir.

Yukarıda maddeler halinde listenmiş olan sonuçlarda da belirtildiği üzere bu tez çalışmasında yeni turunçgil çeşit ve anaçlarının geliştirilmesi amacıyla seçilen genotiplerde klasik ve biyoteknolojik ıslah yöntemleri uygulanarak oldukça önemli bitkisel materyaller elde edilmiştir. Bilindiği gibi özellikle meyvecilikte ıslah çalışmaları uzun soluklu çalışmalar olup büyük özveri, emek ve sabır gerektiren çalışmalardır. Bu tez çalışması kapsamında Hernandina ve Ortanique mandarin çeşitlerinden gama ışın uygulaması yoluyla önemli miktarda M_1V_3 aşamasında fidan elde edilerek bahçe kurulmuştur. Çalışma kapsamında popülasyonu oluşturan bireylerden az bir kısmı değerlendirilmiş olup, popülasyonda incelen bireylerin meyve özellikleri içerisinde varyasyon gözlemlenmiş ve özellikle tohum sayısı bakımından ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu bulguların ilk yıl değerleri olduğu göz önünde bulundurularak, her bir birey en az 3 yıl süreyle pomolojik, morfolojik ve fenolojik olarak izlenmeli ve mutant bireyler belirlenerek bu bireyler içerisinde üstün özellik gösteren tipler seçilmeli ve tescil edilmelidir.

Tez çalışmasında Klemantin 22D mandarini, W.Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotiplerinden tetraploid bireyler geliştirilmiştir. Bilindiği gibi turunçgillerde triploidi ile çekirdeksizlik elde etmek mümkündür. Tez çalışması kapsamında geliştirilen tetraploid bitkilerden elde edilecek çiçek ve çiçek tozları kullanılarak kontrollü melezlemeleri içeren ıslah programları kurgulanmalıdır. Böylece turunçgillerde özellikle ihracat pazarlarında önemli bir kalite kriteri olan çekirdeksizlik elde edilebilir.

Dünyada ve ülkemizde kullanılan turunçgil anaçlarını incelediğimizde, anaçların genelinde poliembriyoniye eğilimin yüksek olduğu görülmektedir. Turunçgillerde sıklıkla görülen poliembriyoni durumu, zigotik kökenli embriyonun çimlenmesinde ve dolayısıyla zigotik birey yani melez elde edilmesinde güçlüklerle neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında önemli turunçgil anaçlarında melezleme çalışmaları yürütülmüş ve 273 melezden oluşan bir popülasyon elde edilmiştir. Bu önemli genetik materyali oluşturan her bir melez vejetatif olarak çoğaltılarak

özellikle Akdeniz bölgesinde görülen kireç kaynaklı demir klorozu, *Phytophthora* ve CTV virüs hastalığı gibi farklı abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı tarama çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

Bu tez kapsamında yeni turunçgil anaçları geliştirmek amacıyla klasik melezlemeler yanı sıra dünyada son yıllarda turunçgil çeşit ve anaç ıslah programlarında kullanımı hız kazanan, ancak ülkemizde halen çok sınırlı kullanımı olan somatik melezleme yöntemi ile de çalışılmıştır. Somatik melezleme, belirlenen her iki ebeveyne ait istenilen özelliklerin herhangi bir kayba uğramaksızın bir melez bireye aktarılması bakımından oldukça ümitvar ve stratejik bir yaklaşımdır. Çalışmada üstün anaç özellikleri taşıyan genotiplerden başarılı bir şekilde embriyojenik kallus hatları elde edilmiştir. Ayrıca farklı enzim ve besin ortamı kombinasyonları kullanılarak somatik melezleme çalışmalarına konu olabilecek önemli nitelikteki turunçgil genotiplerinden verimli bir şekilde protoplastlar izole edilmiştir. Elde edilen protoplast miktarı üzerine enzimlerin miktarı, sıvı besin ortamının miktarı, donör bitki materyali ve ozmotik şartlar gibi birden fazla faktörün etki yaptığı saptanmıştır. Çalışmada farklı turunçgil anaçları için etkin protoplast izolasyon koşullarının belirlenmesi, bu genotiplerin kullanılarak yapılacak somatik melezleme çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

Bununla birlikte, çalışmada yer alan bireylerden izole edilen protoplastların füzyonu gerçekleştirilerek bitki rejenerasyon sağlanmıştır. Ancak rejenere olan bitkiler heterokaryonlar yerine donör bitkiden izole edilen protoplast hücresinin rejenere olduğu flow sitometri yoluyla ploidi analizi sonucu tespit edilmiştir. Protoplast füzyonu sonrası heterokaryonların rejenerasyon şansını artırmaya yönelik daha fazla sayıda füzyon işlemi tekrarlanmalıdır. Ayrıca farklı melezleme kombinasyonları üzerinde çalışmak ve somatik melezlemelerin süreklilik ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla benzer ya da farklı genotiplerden embriyojenik kallus hatları oluşturulmalıdır.



KAYNAKLAR

- Ahloowalia, S., 2000. Officially Released Mutant Varieties-The FAO/IAEA Database. Mutation Breeding Review, 12:1-83.
- Aka-Kaçar, Y., Yeşiloğlu, T., Yıldırım, B., Şimşek, Ö., İncesu, M., Kamiloğlu, M., ve Tuzcu, Ö., 2009. Bazı Turunçgil Anaçlarının SSR Markırları ile Moleküler Tanımlanması. Alatarım, 3:15-22.
- Alev, A., 1990. Değişik Turunçgil Anaçlarının Interdonato, Kütdiken ve İtalyan Memeli Limon Çeşitlerinin Meyve Verim ve Kalitesi Üzerine Etkileri. Ç.Ü., F.B.E., Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Balcalı-Adana. s: 121s.
- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., and Navarro, L., 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes, Plant Cell Rep., 28(12):1837-1846.
- Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J.A., and Navarro, L., 2010. 'Garbí' mandarin: A new late-maturing triploid hybrid. HortScience 45:139-141.
- Asins, M.J., Herrero, R., Pina, J.A., Carbonell, E.A., and Navarro, L., 1996. Genetic relationships in *Citrus* and related genera. Proc. Int. Soc. Citriculture VIII. Congr. 248-253.
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Cote, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguillar, M.E., and Grapin, A., 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. 'Grande Naine' (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 20:482-488
- Babaoğlu, M., Özcan, S. 2001. Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme, Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniv. s:89-136.
- Bahçecioğlu, H.R., Özsan, B., Bülbül, B., ve Öncel, E. 1960. Melezleme Yolu ile Hibrit Elde Edilmesi. Turunçgiller Araştırma Enstitüsü (Rapor). Antalya. içinde: Anonim. 1983. Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü Araştırma Özetleri (1926-1982). Cilt 1. T.O.B., Z.İ.G.M., Araştırma Daire Başkanlığı, Yayın No: 6. Ankara. S: 5.

- Baines, R.C., Miyakawa, T., Cameron, J.W., and Small, R.H., 1969. Infectivity of two biotypes of the citrus nematode on citrus and some other hosts. *Journal of Nematology*, 1(2):150-9.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., and Federici, C.T., 2006. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs), *Theor Appl Genet*, 112(8):1519-1531.
- Barrett, H.C., 1974. Colchicine-induced polyploidy in citrus. *Botanical Gazette*, 135(1):29-41.
- Bashir, M.A., 1994. Growth and morphological studies of citrus colchiploids. M.Sc (Hons). Agri. Thesis Dept. of Hort. Univ.of Agri.,Faisalabad
- Biçen, B., 2008. Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Eksplant Kaynağı ve Besi Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 74 sayfa, Adana.
- Bitters, W.P., 1961. Valencia orange on different rootstocks. *The Orange It's Biochemistry and Physiology*. Ed.: W. B. Sinclair, Univ. Calif., Div. Agr. Sci, Riverside, p:56-95.
- Bowman, K.D., Rouse, R.E., 2006. US-812 Citrus Rootstock. *HortScience*, 41(3): 832-836.
- Cai, X., Fu, J., Chen, C., and Guo, W., 2009. Cybrid/hybrid plants regenerated from somatic fusions between male sterile Satsuma mandarin and seedy tangelos *Scientia Horticulturae*, 122(2):323-327.
- Calixto, M.C., Filho, F.A., Mendes, B.M.J., and Vieria, M.L.C., 2004. Somatic hybridisation between *C. sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. *Pesq.agropec. bras., Brasiliva*, 39:721-724.
- Cameron, J.W. and Frost, N.B., 1968. Genetics, Breeding and nucellar embryony. In: W.Reuther, L.D.Batchelor and H.J.Webber (Eds.). *The Citrus Industry*, Vol:II, Chapter 5:325-379.Univ.Calif.Press, Berkeley.

- Cameron, J.W., and Burnett, R.H., 1978. Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid citrus hybrids. HortSci., 13: 167–9
- Candemir, D., 2006. Gama Işını Uygulanarak Elde Edilmiş Olan Robinson, Nova ve Klemantin Mandarin Tipleri ile Henderson Altıntop Tiplerinde Meyve Verimi, Meyve Kalitesi ve Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 150 sayfa, Adana.
- Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing, D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridisation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69:2292-2294.
- Caruso, M., Russo, R., Caruso, A.G., Romano, F., Cirrone, G., Gattolin, S., Rossini, L., Cuttone, G., and Russo, G., 2016. Citrus Breeding Activities at Crea, Italy. International Citrus Congress 2016, Abstract Book, s: 101.
- Castle, W.S., 1987. Citrus Rootstocks .Rootstocks for fruit crops, (Rom, Roy C. ed. Carlson, Robert F. ed.) New York, US: Willey Interscience, 361-399.
- Castle, W.S., and Gmitter, FG., 1999. Rootstock and Scion Selection in: Timmer, L.W. and Duncan L.W. (eds.) Citrus Health Manegement. The American Phytopathologycal Society. Minnesota pp.21-34.
- Chamani, E., Tahami, S.K., Zare, N., Zakaria, R.A, Mohebodini, M., and Joyce, D., 2012. Effect of Different Cellulase and Pectinase Enzyme Treatments on Protoplast Isolation and Viability in *Lilium ledebeourii* Bioss. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 40(2):123-128.
- Chen, C.L., Guo, W.W., Yi, H.L., and Deng, X.X., 2004. Cytogenetic Analysis of Two Interspecific Citrus Allotetraploid Somatic Hybrids and Their Diploid Fusion Parents. Plant Breeding, 123 (4): 332 -337.
- Chetto, O., Dambier, D., Fadli, A., Sttitou, M., Benkirane, R., and Benyahia, H., 2016. Friable embryogenic callus induction in five citrus genotypes. International Journal of Innovation and Applied Studies, 17(1): 236-244.
- Cooper, W.C., Reece, P.C., and Furr, J.R., 1962. Citrus Breeding in Florida-Past, Present and Future. Florida State Horticultural Society. 1:5-13.

- Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Kacar, Y. A., Froelicher, Y., Belfalah, Z., and Ollitrault, P., 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports*, 30(5), 883-900.
- Davies, F.S., and Albrigo, L.G. 1994. *Citrus; Crop Production Science in Horticulture*. Wallingford, U.K.:CAB International.
- Din, M., Ibrahim M., and Khan, A.S., 2001. Effect of traditional and hybrid rootstock on leaf mineral composition and reproductive characteristics of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 3(4): 491-493.
- Donini, B., 1992. Mutagenesis applied for the Improvement of Vegetatively Propagated Plants. IAEA. Joint FAO/IAEA Programme IAEA Laboratories-Serbersdorf, Austria Plant Breeding Unit. Deng, 2000
- Doyle, J.J., and Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Esen, A., and Soost, R.K., 1971. Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use. *J Hered* 62: 329–333.
- Esen, A. and Soost, R.K., 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo:endosperm ploidy ratio in Citrus. In: Carpena, O. (ed.) *Proceedings of the Congresso Mundial de Citricultura*. 1973. International Society of Citriculture, Vol. 2, pp. 53–63.
- Esen, A., Soost, R.K., and Geraci, G., 1978. Seed set, size and development after 4x-2x and 4x-4x crosses in citrus. *Euphytica*, 27:283-293.
- Eser, D., Sağel, Z., Tutluer, M., Peşkircioğlu, H., Atilla, A.S., and Adak, M.S., 1991. The effect of Gama radiation doses on some characters in M generation of large seeded type green lentil Pul 11 cultivar. *Turkish Journal of Nuclear Sciences*, 18(2):5-15.
- Eti, S., 1990. Çiçek tozu miktarını belirlemede kullanılan pratik bir yöntem. *Çukurova Üni. Ziraat Fak. Der.* 5(4):49-58.

- Eti, S., Kılavuz, M., ve Kaşka, N., 1990. Robinson mandarininde kendileme ve yabancı tozlama ile meyve tutumu ve meyve kalitesi arasındaki ilişkiler. Bahçe, 18(1-2):62-68.
- Fang, D., Federici, and Q., Roose, M.L., 1998. A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Genetics, 150:883-890.
- FAO, 2018. Agricultural Statistical Database. <http://www.fao.org>
- FAO/IAEA, 2018. [https://mvd.iaea.org/#!/Search?page=1&size=15&sortby=Name&sort=ASC&Criteria\[0\]\[field\]=FreeText&Criteria\[0\]\[val\]=citrus](https://mvd.iaea.org/#!/Search?page=1&size=15&sortby=Name&sort=ASC&Criteria[0][field]=FreeText&Criteria[0][val]=citrus)
- Federici, C.T., Kupper, R.S., and Roose, M.L., 'Bitters', 'Carpenter' and 'Furr' Trifoliolate Hybrids: Three New Citrus Rootstocks. 2009. Erişim: <https://plantbiology.ucr.edu/faculty/new%20citrus%20rootstocks%202009.pdf>. 2015-07-12.
- Ferguson, L., Sacovich, N., and Roose, M., 1990. California citrus rootstocks. Univ. Calif. Pub, 21477.
- Ferguson, J.J., and Chaparro, J., 2005. Dwarfing and Freeze Hardiness Potential of Trifoliolate Orange Rootstocks. <http://edis.ifas.ufl.edu/HS221>
- Fisher, D., 1997. History of The International Atomic Energy Agency-The First Fourty Years, ISBN 92-0-102397-9.: 550 . Division of Publications IAEA, Viena, Austria.
- Forner, J.B., Forner-Giner, M.A., and Alcaide, A., 2003. Forner-alcaide 5 and forner-alcaide 13: Two new citrus rootstocks released in Spain. Hortscience, 38(4):629-630.
- Froelicher, Y., Bouffin, J., Dambier, D., and Ollitrault, P., 2012. Triploid seedless mandarin breeding in France. The XII International Citrus Congress. Abstracts Book: 37.

- Froelicher, Y., Pouillet, T., Evrard, J.C., Ahmed, D., Durand, M., Luro, F., Curk, F., Bloquel, E., Pailly, O., Dambier, D., Bruyere, S., Morillon, R., and Ollitrault, P., 2016. The French Breeding Program. International Citrus Congress 2016, Abstract Book, s: 105.
- Froneman, I., Breedt, J., Koekemoer, H.J., and Van Rensburg, P.J.J., 1996. Producing Seedless Citrus Cultivars with Gama Irradiation. Proc. Int. Citriculture, 159-163.
- Frost, H.B., and Soost, R.K., 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In The Citrus Industry, Vol. II. W. Reuther, L. D. Batchelor, and H. J. Webber (eds.), Univ. of Calif.
- Genç, İ., 1988. Bitki Islahı. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Yayını., No:73, S:96.
- Georgiou, A., 2009. Evaluation of rootstocks for the Cyprus local lemon variety “Lapithiotiki”. Sci. Hortic. 123: 184-187.
- Geraci, G., Esen, A., and Soost, R.K., 1975. Triploid progenies from $2x \times 2x$ crosses of Citrus cultivars. Journal of Heredity 66, 177–178
- Gmitter, F.G., Grosser, J.W., Moore, G.A., 1992. Citrus. In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops. F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds.) CAB International, Wallngford, UK. pp. 335 – 369.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., and Chandler, J.L. 1988a. “Intergeneric Somatic Hybrid Plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus tirifoliata* cv. Flaying dragon”, Plant Cell Rpt. 7, 5-8.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G. and Chandler, J.L., 1988b. “Intergeneric Somatic Hybrid Plants from Sexually Incompatible Woody Species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*”, Theor.Appl.Gen., 75:397-401.
- Grosser, J.W., and Gmitter, F.G., 1990. Somatic Hybridization of Citrus with Wild Relatives for Germplasm Enhancement and Cultivar Development. Hortiscience. 25: 147-151.

- Grosser, J.W., F.G. Gmitter, Jr., F. Sesto, X.X. Deng, and J.L. Chandler. 1992. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:169–174.
- Grosser, J.W., Louzada, E.S., Gmitter, F.G., and Chandler, J.L., 1994. Somatic Hybridization of Complementary Citrus Rootstocks: Five New Hybrids. *Hortscience*, 29(7):812-813.
- Grosser, J.W., Gmitter Jr., F.G., and Castle, W.S., 1995. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: Progress report. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 108, 140–143.
- Grosser, J.W., Mourao-Fo, F.A.A., Gmitter, F.G., Louzada, E.S., Jiang, J., Baergen, K., Ouiros, A., Cabasson, C., Schell, J.L., and Chandler, J.L., 1996. Allotetraploid hybrids between Citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor Appl Genet* 92:577-582.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Castle, W.S. and Chandler, J.L., 1998. “Somatic Hybridization: A New Approach to Citrus Rootstock”. *Fruits*, 53, 331 – 334.
- Grosser, J.W., Ollitrault, P., and Olivares-Fuster, O., 2000. Somatic Hybridization in Citrus: An Effective Tool to Facilitate Variety Improvement. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 36:434-449.
- Grosser, J.W., Chandler, J.L., and Duncan, L.W. 2007. Production of Mandarin + Pummelo Somatic Hybrid Citrus Rootstocks with Potential for Improved Tolerance/Resistance to Sting Nematode. 113(1):33-36.
- Grosser, J.W., and Gmitter F.G., Jr., 2011. “Protoplast Fusion for Production of Tetraploids and Triploids: Applications for Scion and Rootstock Breeding in Citrus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:343–357. DOI 10.1007/s11240-010-9823-4.

- Grosser, J.W., Barthe, G.A., Castle, B., Gmitter, F., and Lee, O., 2015. The Development of Improved Tetraploid Citrus Rootstocks to Facilitate Advanced Production Systems and Sustainable Citriculture in Florida. *Acta Horticulturae*, 1065:319-327.
- Grosser, J.W., and Gmitter, F.G., 2016. New Sweet Oranges for Processing and Fresh Market. International Citrus Congress 2016, Abstract Book, s:167.
- Gu, X.F., Yang A.F., Meng, H., and Zhang, J.R., 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Reports*, 24(11):671-678.
- Guerra, D., Wittmann, M.T.S., Schwarz, S., Dutra de Souza, P.V., and de Campos, S., 2013. Reproductive characteristics of citrus rootstocks grown under greenhouse and field environments. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13:186-193.
- Guo, W.W., Cheng, Y.J., Chen, C.L., and Deng, X.X. 2006. "Molecular Analysis Revealed Autotetraploid, Diploid and Tetraploid Cybrid Plants Regenerated from an Interspecific Somatic Fusion in *Citrus*". *Scientia Horticulturae*, 108:162-166.
- Guo, W.W., Wu, R.C., Cheng Y.J., and Deng, X.X. 2007. Production and Molecular Characterization of Citrus Intergenetic Somatic Hybrids Between Red Tangerine and Citrange. *Plant Breeding*, 126(1):72-77.
- Gupta, P.K., and Varshney, R.K. 2000. The Development and Use of Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Plant Breeding with the Emphasis on Bread Wheat. *Euphytica*, 113:163-185.
- Gülşen, O., Roose, M.L., 2001. Lemons: Diversity and Relationships with Selected Citrus Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:309-317.

- Handaji, N., Benyahia, H., Arsalane, N., Mouhib, M., Ibriz, M., Srairi, I., Chahidi, B., Bourachde, Y., 2012. Optimal Dose of Gama Irradiation for Mutation Induction in Mandarins. International Citrus Congress 2012, Abstract Book, s: 53.
- Handaji, N., Arsalane, N., Aderdour, T., Essalhi, M., Label, K., Yacoubi, R., Mahmoudi, K., Benyahia, H., 2016. Effect Of Gama Ray Irradiation On Fruit Quality Variability of Marisol Clementine. International Citrus Congress 2016, Abstract Book, s: 102.
- Hatipoğlu, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ders kitapları Yayın No: A – 58
- Hearn, C.J., 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. Journal of the American Society for Horticulture Sci. 109:270-273.
- Hensz, R.A., 1971. ‘Star Ruby’, a new deep-red fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. Journal of the Rio Grande Valley Horticulture Society, 25:54-58.
- Hızal, A.Y., 2012. Türkiye Turunçgiller (Narenciye) Bibliyografyası. T.C. GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara. s.216.
- Hosein, I., 1969. Citrus Rootstocks in the Caribbean. Citrus Res. Univ. West Indies Bulletin. St. Augustine, Trinidad and Tobago. 15: 1 – 5.
- Huang, J., Wen, S., Zhang, Y., Zhong, Q., Yang, L., Chen, L. 2017. Abnormal megagametogenesis results in seedlessness of a polyembryonic ‘Meiguicheng’ orange (*Citrus sinensis*) mutant created with gama-rays. 217: 73-83.
- İncesu, M., 2004. Türkiye’de Selekte Edilen Bazı Satsuma ve Klemantin Mandarin Tiplerinin Verim ve Meyve Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s: 144.

- İncesu, M., 2011. Anaç ve Anaç Özelliği Olan Bazı Turunçgil Genotiplerinde Demir (Fe) Klorozuna Dayanıklılığın Fizyolojik ve Genetik Yönden İncelenmesi. Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 267s, Adana.
- Jaskani, M.J., Kwon, S.W., Koh, G.C., Huh, Y.C., and Ko, B.R., 2004. Induction and characterization of tetraploid watermelon. J. Kor. Soc. Hortic. Sci. 45(2):60-65.
- Jaskani, M.J., I.A. Khan and M.M. Khan., 2005. Fruit set, seed development and embryo germination in interploid crosses of citrus. Scientia Horticulturae, 107:51-57
- Kafa, G., Seday, U., and Polatöz, S., 2012. Effect of budwood irradiation on seed number of clementine, 'Nova' and 'Robinson' mandarins. International Citrus Congress 2012, Abstract Book, s: 54.
- Kaneyoshi, J., Kanou, T., Kuwata, Y., Hirao, A., Nakatani, S., and Kobayashi, S., 1997. Breeding of triploid citrus cultivars I. Production of triploids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) X tetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) crosses. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 66(1):9-14.
- Khalil S.A., Sattar, A., Zamir, R., 2011. Development of sparse-seeded mutant kinnow (*Citrus reticulata* Blanco) through budwood irradiation. Afric. Journal of Biotechnology, 10(65):14562-14565.
- Khan, M.M., Khan, I.A. and Mughal, A.H., 1992. Growth and morphological comparison of diploid and tetraploid strains of Kinnow mandarin. Proc.Int.Soc. Citriculture. pp.151.
- Khan, I.A., and Kender, W.J., 2007. Citrus breeding: introduction and objectives (I.A. Khan editör). Citrus genetics, breeding and biotechnology, Wallingfor, Oxfordshire, s. 1-8.
- Kobayashi, S., and Ohgawara, T., 1988. Production of Somatic Hybrid Plants through Protoplast Fusion in Citrus, Jour. Agr. Rev. Quart. 22:181-188.

- Kochba, J., Spiegel-Roy, P., and Safran, H., 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. *Planta*, 106:237-245.
- Koç, N. K., Kayım, M., Çınar, A., ve Küsek, M., 1999. Protoplast Fuzyonu (Somatik Hibridizasyon) ile Limonda Uçkurutan Hastalığına (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) Dayanıklı Bitkiler Elde Etme Olanaklarının Araştırılması, *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23 Ek Sayı 1, 157-168.
- Koksal, N., Yetisir, H., Sari, N., and Abak, K., 2002. Comparison of Different in vivo Methods for Chromosome Duplication in Muskmelon (*Cucumis melo*). *Acta Hort.* 588: 293-298.
- Koltunow, A.M., 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Pl Cell*, 5: 1425–1437.
- Latado, R.R., Neto, A.T., Figueira, A., 2012. In vivo and in vitro mutation breeding of Citrus. Induced mutagenesis in crop plants. *Bioem Biodiv Bioavail.* 6:40-45.
- Lawrance, F.P., and Bridges, D., 1974. Rootstocks for Citrus in Florida. Florida Cooperative Extension Service, Ins. Of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. P.13.
- Lee, D., Park, J., Moon, Y., An, H., Yun, S., Hyun, J., Choi, H., and Kang, S., 2008. Tetraploid induction in miscellaneous citrus using colchicine. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 26(2):154-159.
- Li, X., Xie, R., Lu, Z., and Zhou, Z., 2010. The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 135(4):341–350.
- Louzada, E.S., Grosser, J.W., and Gmitter, F.G., 1993. Intergeneric Somatic Hybridization of Sexually Incompatible Parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*, *Plant Cell Reports*, 12(12):687-690.

- Louzada, E., Del Rio, H.S., Setamou, M., Watson, J.W. and Swietlik, D. M., 2008. Evaluation of citrus rootstocks for the high pH, calcareous soils of South Texas. *Euphytica*, 164:13-18.
- Luro, F., Maddy, F., Jacquemond, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Rist, D., and Ollitrault, P., 2004. Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Acta Horticulturae* 663:841-847.
- Luro, F.L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2008. Transferability of the EST-SSRs Developed on Nules Clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus Species and their Effectiveness for Genetic Mapping. *BMC Genomics*, 9:287.
- Ruiz, M., Pensabene, G., Quinones, A., Garcia-Lor, A., Morillon, R., Ollitrault, P., Primo-Millo, E., Navarro, N., and Aleza, P., 2018. Molecular characterization and stress tolerance evaluation of new allotetraploid somatic hybrids between Carrizo citrange and *Citrus macrophylla* W. rootstocks. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.00901.
- Martiz, J., and Montanola, M.J., 2012. Citrus Breeding Program in Chile. International Citrus Congress 2012, Abstract Book, s: 38.
- Micke, A., Donini, B., and Maluszynski, M., 1987. Induced mutations for crop improvement -a review. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 4:259-275.
- Micke, A.,B. Donini., M., and Maluszynski., M., 1990 Induced Mutations for crop Improvement, Mutation breeding Review.Joint FAO/IAEA Division of nuclear techniques in food and Agriculture.Vienna ISSN 1011-2618, 7:1-41.
- Miller, J.E., Martiz, J.G.J., Froneman, I.J., and Koekemoer, P.J.J., 2003. Potential citrus cultivars in south Africa's scion and rootstock development pipeline. *Proc. Intl. Soc. Citriculture* 62–65.

- Mohan-Jain, S., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S., 2000. Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement in induced mutation in fruit trees p:409-410.
- Montanola, M., Galaz, A., Gambardella, M., and Mártiz, J., 2015. New Low Seeded Mandarin (*Citrus reticulata*) and Lemon (*C. limon*) Selections Obtained by Gamma Irradiation. *Acta Horticulturae* 1065: 543-548.
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andres, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P., and Morillon, R., 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology*, 37:674-685.
- Mourão Filho, F.A.A., Pio, R., Mendes, B.M.J., Azevedo, F.A., Schinor, E.H., Entelmann, F.A., Alves, A.S.R., and Cantuarias-Aviles, T., 2008. Evaluation of Citrus Somatic hybrids for Tolerance to *Phytophthora nicotiana* and Citrus Tristeza Virus. *Scientia Horticulturae*, 115:301-308.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15(3):473-497.
- Murashige, T., and Toker, D.P.H., 1969. Growth Factor Requirement of Citrus Tissue Culture. In: 1. International Citrus Symposium, Riverside. Proceedings. Riverside: University of California, s.1155-1169.
- Nagata, T., and Takeda, H., 1984. Isolation and culture of protoplast tobacco, 328-337 p. In: Vasil L (Ed.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*, Academic Press, New York - London.
- Navarro, L., Juárez, J.A., Pina, J., Ballester, J.F., and Arregui, J.M., 1988. The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) after eleven years. In: Proc. 10th Conf. IOCV, 400-406. IOCV, Riverside, CA.

- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., and Pina, J.A., 2002. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from $2n \times 2n$ and $2n \times 4n$ crosses by embryo rescue and flow cytometry. p.541-544. In: Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Plant Biotechnology 2002 and Beyond. Orlando, Florida, USA.
- Navarro, L., Aleza P., Cuenca J., Juárez J., Pina J.A., Ortega C., Navarro A., and Ortega, V., 2012. The triploid mandarin breeding program in Spain. The XII International Citrus Congress. Abstracts Book:37.
- Navarro, L., 2015. The Spanish Citrus Industry. *Acta Hortic.* 1065:41-48.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., and Tribulato, E., 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100:1155-1166.
- Nicotra, A., 2001. Mandarin-like Hybrids of Recent interest for Fresh Consumption. Problems and Ways of Control. *Proc. China/FAO citrus symposium*, Beijing, pp.15-24.
- Nimmakayala, P., Tomason, R.Y., Jeong, J., Ponniah, K.S., Karunathilake, A., Levi, A., Perumal, R., and Reddy, K.U. 2009. Genetic Reticulation and Interrelationships Among Citrullus Species as Revealed by Joint Analysis of Shared AFLPs and Species-Specific SSR Alleles. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization*, 1-10.
- Nito, N., Ling, J.T., Iwamasa, M., and Katayama, Y., 1989. Effect of gama irradiation on growth and embriyogenesis of citrus callus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 58 (2) : 283-287.
- Nito, N., and Akihama, T., 1990. Prospect of Citrus and Related Genera for Disease Resistant Rootstocks. In: *Proceeding IV Asia-Pasific Conference on Citrus Rehabilitation*, February, 1990, Chiang Mai, Thailande, Hongkong, Chine, B. Aubert ed., UNDP-FAO. Regional Project RAS/86/022, p.39-47.

- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimiya, H., and Ishii, S., 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor. Appl. Genet. 71: 1–4.
- Oiyama, I., Okuday, N., and Takarahara, T., 1981. Ploidy levels of seedlings obtained from $2x \times 4x$ crosses in citrus. In: Proceedings of the Fourth International Citrus Congress. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, pp. 32–34.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Cabasson, C., Teisson, C., and Luro, F., 1994. Protoplast Fusion in Citrus. Fruit. Vol 49: 5-6.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono S., and Luro, F., 1996. Somatic hybridisation in Citrus: some new hybrid and alloplasmic plants. In: Proceedings of the Eighth International Citrus Congress. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa, 2:907-912.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Froelicher, Y., Bakry, F., and Bernard, A., 1998. Rootstock Breeding Strategies for the Mediterranean Citrus Industry; the Somatic Hybridization Potential. Fruits. 53:335-344.
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D., Seker, M., 2000. Rootstock Breeding by Somatic Hybridization for the Mediterranean Citrus Industry. Acta Horticulturæ, 535:157-162.
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D., and Seker, M. 2006. Rootstock Breeding by Somatic Hybridisation For the Mediterranean Citrus Industry. Acta Horticulturæ 535.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., and Froelicher, Y., 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. In: Plant Breed Rev 30: 323–352
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C.T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault, F., Berard, A., Chauveau, A., Cuenca, J., Costantino, G., Kacar, Y., Mu, L., Garcia-Lor, A., Froelicher, Y., and Aleza, P., 2012. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. BMC Genomics.13:593.

- Oustric, J., Morillon, R., Ollitrault, P., Herbette, S., Luro, F., Froelicher, Y., Tur, I., Dambier, D., Giannettini, J., Berti, L. and Santini, J., 2018. Somatic hybridization between diploid Poncirus and Citrus improves natural chilling and light stress tolerances compared with equivalent doubled-diploid genotypes. *Trees*, 32(3): 883-895.
- Özbek, S. 1971. Bağ-Bahçe Bitkileri Islahı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 419, Ankara, 386s.
- Özcan, M., ve Ulubelde, M., 1984. Turunçgil Anaçları. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Proje ve Uygulama Genel Müdürlüğü. Ege Bölgesi Zirai Araş. Ens. Yayınları, No: 50, 37 s. Menemen.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., ve Sancak, C., 2001. Somatik embriyogenesis, Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniv. s:71- 88.
- Özsan, M., ve Bahçecioğlu, H.R., 1970. Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Turunçgil Tür ve Çeşitlerinin Değişik Ekolojik Şartlar Altında Gösterdikleri Özellikler Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK-TOAG Yayın No: 10. TÜBİTAK Matbaası, Ankara, 111 s.
- Özsan, M., Ö. Tuzcu, Ş.A., Akteke, H.B., İnci, K., Çelikel, E., Özdemir, İ. ve Çimen, 1986. Turunçgillerde Aşı Gözü Seleksiyon Sertifikasyonu ve Çeşit Geliştirme. *Derim*, 3 (4): 147-156.
- Pasquali, G., and Biricolti, S., 2004. In vitro culture of ovules with nucelli and embryos of Citrus. *Advances in Horticultural Science*, 18(1):11-14.
- Pensabene-Bellavia, G., Ruiz, M., Aleza, P., Olivares-Fuster, O., Ollitrault, P., and Navarro, L., 2015. Chromosome Instability in ‘Carrizo’ Citrange + Citrus macrophylla Somatic Hybrids. *Acta Horticulturae*, 1065: 677-685.
- Pestana, M., Varennes, A., Abadia, J., and Faria, E.A. 2005. Differential Tolerance to Iron Deficiency of Rootstocks Grown in Nutrient Solution. *Scientia*, 104(1):25-36.

- Pio, R., Filho, F., Mendes, B., Entelmann, F., and Alves, A., 2006. Propagation of citrus somatic hybrids with potential for utilization as rootstocks. *Fruits*, 61(1):1-7
- Qi, J., Liu, Z., Huang, L., Chen, H., Liu, J., and Dai, Z., 2008. Effect of ^{60}Co Ray Treatment on Seedless Mutation in Budwood of Jincheng Orange. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:146-148.
- Rajasekharan, P.E., Ganeshan, S., and Thamizharasu, V., 1995. Expression of trifoliate leaf character in *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata* hybrids through cryostored pollen. *Journal of Horticultural Science*, 70(3):485-490.
- Reforgiato-Recupero, G., Russo, G., and Recupero, S., 2005. New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. *Hortscience*, 40(3):516-520.
- Reuther, W., Webber, H.J., and Batchelor, L.D., 1967. *The Citrus Industry*. University of California Division of Agricultural Sciences, 1:431-539.
- Roose, M.L., and Williams, T.E., 2006. Tango Mandarin: A new seedless mid-late season irradiated selection of W. Murcott (Afourer) mandarin developed by the University of California Citrus Breeding.
- Ruiz, M., Pensabene-Bellavia, G., Morillon, R., Ollitrault, P., Primo-Millo, E., Navarro, L.I., and Aleza, P., 2018. Molecular characterization and stress tolerance evaluation of new allotetraploid somatic hybrids between Carrizo citrange and *Citrus macrophylla* W. rootstocks. (baskıda). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00901/abstract> (Erişim: 15/01/2108)
- Russo, F., Donini, B., and Sarrantinno, A., 1981. Mutagenesis applied for Citrus Improvement. *Proc.Int.Soc.Citriculture* :1 p:68-70.
- Russo, G., 2004. Comparison of “Comune” Clementine With two Spontaneous Mutations: ‘Grosso Puglia’ and ‘Puglia’. *Abst. Book of Xth International Citrus Congress, Agadir, Morocco, 15-20 February 2004, Abst. No:P161*.

- Sakovich, N.J., 1986. Lemon Rootstocks for Southern California. Proc. Int. Soc. Nurserymen II. Congress. Riverside, California, 238-243.
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P., and Morillon, R., 2008. Tetraploidi citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. C.R. Biologies, 331:703-710.
- Saravat, N.M., 2006. Effect of Colchicine on Seed Germination, Seedling Development and Chromosome Doubling in Lemon. http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2171/10/294876_ab.pdf. Erişim tarihi: 14.01.2018.
- Saunt, J., 2000. Citrus Varieties of the World. Sinclair International Limited, Norwich, England. 156
- Saxena, P.K., Gill, R., and Rashid, A., 1987. Optimal conditions for plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). Scientia Horticulturae. 31(3):185-194.
- Scarano, M.T., Tusa, N., Abbate, L., Lucretti, S., Nardi, L., and Ferrante, S., 2005. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. Plant Sci. 164(6):1009-1017.
- Shu, Q.Y., Forster, B.P., and Nakagawa, H., 2012. Principles and Applications of Plant Mutation Breeding, (ed: Shu, Q.Y., B.P., Forster, H. Nakagawa) Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Wagramer Strasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria. s: 301-326.
- Soares, Filho, W.S., Medrado, A.C.M., Cunha, M.A.P., Cunha-Sobrinho, A.P., and Passos, O.S., 2002. Frequency of citrus hybrids from controlled crossings: seed germination in seedbeds versus in vitro embryo cultivation. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37:981-988.
- Soost, R.K., and Cameron, J.W., 1980. 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. HortScience 15:667-669.

- Soost, R.K., and Cameron, J.W., 1985. 'Melogold', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 20: 1134-1135.
- Spiegel-Roy, P., and Kochba, J., 1973. Mutation breeding in citrus .In Induced mutations in vegetatively Propagated Plants.Proc. IAEA Panel, Vienna.p:91-103
- Starrantino, A. and Recupero, G.R., 1981. Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females $\times$ 4x males. In: Proceedings of the Fourth International Citrus congress. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, 1:31-32.
- Staub, J.E, Serquen, F.C., and Gupta, M., 1996. Genetic Markers, Map Construction and Their Application in Plant Breeding. HortScience, 31: 729- 741.
- Şen, İ. 2010. Bazı Turunçgil Anaçlarında Eksplant Kaynağı ve Büyüme Düzenleyicilerin Embriyogenik Kallus Eldesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana. s.89.
- Şeniz, V., 1990. Bahçe Bitkilerinin Islahı. Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Ders Notları No:13., S:275.
- Taehyun, H., Jinyeong, K., Youngchul, P., and Jonghoon, K., 2016. The Study of Tetraploid Production in C. Unshiu Sangdojosaeng and C. Hybrid Sagakashi 34 Gou By Colchicine Treatment. International Citrus Congress 2016, Abstract Book, s: 100.
- Tan, ML., Song, JK., and Deng, XX., 2007. Production of two mandarin x trifoliate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. Euphtica 157(1-2):155-160
- Tang, X.L., Li, Z.Q., Wu, S.Y., Peng, C.J., Zeng, S.R. and Yi, G.J., 1993. Breeding of seedless Hongjiangcheng by repeated budwood irradiation. China-Citrus, 22(4):18-19.

- Tuna, M. 2014. 2. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Çalıştayı. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 16-17 Ocak 2014, Tekirdağ.
- Tuzcu, Ö., 1978. Turunçgillerde Anaç ve Sorunları. Çağdaş Tarım Tekniği, 3:31-35.
- Tuzcu Ö, ve Göksedef, O., 1983. Bazı önemli turunçgil anaçları ve Citrus cinsine giren türler ile Citropsis gilletiana Swing. ve Aeglopsis chevalieri Swing.'nin kış dinlenme döneminde *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian'a dayanıklılıkları üzerinde araştırmalar. Doğa Bilim Dergisi, 7 (1): 79-89.
- Tuzcu, Ö., Kaplankıran, M., ve Yeşiloğlu, T. 1988. Turunçgillerde Radyasyon Uygulaması ile Yeni Çeşitlerin Islahı. Ç.Ü. Araştırma Fonu 1. Bilim Kongresi (Ziraat-Fen-Mühendislik-İdari Bilimler). 28-30 Kasım 1988, Adana, 1:25-34.
- Tuzcu, Ö., Şeker, M., Ollitrault, P., and Aubert, B., 1997. The Opportunities to Use Citrus Species and Relatives for New Rootstocks Breeding. Proceedings 5th World Congress of the International Society of Citrus Nurserymen, 213–218, Montpellier, France.
- UCR, 2018. University of California Riverside Citrus Variety Collection. <http://www.citrusvariety.ucr.edu/>
- Usman, M., Fatima, B., Gillani, K.A., Khan, M.S., and Khan, M.M., 2008. Exploitation of potential target tissues to develop polyploids in citrus. Pakistan Journal of Botany, 40(4):1755-1766.
- Uzun, A., Gülşen, O., Kafa, G., and Seday, U., 2008. 'Alata', 'Gulsen', and 'Uzun' Seedless Lemons and 'Eylul' Early-maturing Lemon. Hortscience, 43:1920-1921.
- Uzun, A., 2009. Turunçgillerde Genetik Çeşitliliğin SRAP Markırları ile Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Doktora Tezi, 369 sayfa, Adana.

- Vardi, A., and Spiegel-Roy, P., 1988. A new approach to selection for seedlessness, p. 131–134. In: Proc. 6th Intl. Citrus Congr. Intl. Soc. Citriculture. Tel Aviv, Israel.
- Varol, İ., 2007. Bazı Turunçgil Türlerinde Embriyogenik Kallusların in Vitro Muhafazası ve Genetik Kararlılıklarının RAPD Markırları ile Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 80 sayfa, Adana.
- Viloria, Z., Grosser, J.W., and Bracho, B., 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploidy hybridization Plant Cell Tissue and Organ Culture 82 (2):159-167.
- Wakana, A., Hanada, N., Park, S., Fukudome, I., and Kajiwar, K., 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. J Fac Agric Kyushu Univ, 50(1):93–102
- Williams, T.E., and Roose, M.L., 2004. Shasta Gold Mandarin Hybrid (TDE2), Tahoe Gold Mandarin Hybrid (TDE3) and Yosemite Gold Mandarin Hybrid (TDE4) : Three New Mid and Late Season Triploid Seedless Mandarin Hybrids From California. Abst. Book of Xth International Citrus Congress, Agadir, Morocco, 15-20 February 2004, Abst. No:P156.
- Williams, T.E., and Roose, M.L., 2008a. Tango-A New, Very Low-Seeded, Late Season Irradiated Selection of W. Murcott Mandarin from the University of California Riverside. Proceedings of the International Society of Citriculture. Volume 1: 202.
- Williams, T.E., and Roose, M.L., 2008b. Daisy SL, Fairchild SL and Kinnow SL- Three New, Very Low-Seeded, Mid Season Irradiated Selection of W. Murcott Mandarin from the University of California Riverside. Proceedings of the International Society of Citriculture. Volume 1: 203.

- Williams, T.E., 2012. Experiences in the development, release and commercialization of new irradiated citrus varieties from the citrus breeding program at the University of California Riverside. International Citrus Congress 2012, Abstract Book, s: 38.
- Williams, T.E., 2013. http://www.citrusvariety.ucr.edu/documents/recently_released.pdf. Erişim tarihi: 14.01.2018.
- Wright, G.C., 1998. Results of scion and rootstock trials for citrus in Arizona, 1997. 1998 Citrus Research Report. College of Agriculture Series P-113.
- Yahata, M., Kurogi, H., Kunitake, H., Nagano, K., Yabuya, T., Yamashita, K., and Komatsu, H., 2005. Evaluation of Reproductive Functions in a Haploid Pummelo by Crossing with Several Diploid Citrus Cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 74(4):281-288.
- Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W., and Li, G.R., 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae, 124(1):95-101.
- Yeşiloğlu, T., Aka Kaçar, Y., Yılmaz, B., İncesu, M., Canıhoş, E., Yurtmen, M., 2015. 111O657, Klasik ve Somatik Melezleme Yöntemleri Kullanılarak Turunca Alternatif Yeni Turunęgil Anaçların Geliştirilmesi.
- Yeşiloğlu, T., 2017. Turunęgil Anaçlarının Tarihçesi ve Yeni Anaçların Geliştirilmesi. Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi. 22:12-14.
- Yıldırım B., 1996. Değişik turunęgil anaçlarının Washington navel, valencia, moro ve yafa portakal çeşitlerinin meyve verim ve kalitesi üzerine etkileri. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 193 sayfa, Adana.

- Yıldırım, B., 2003. Değişik Anaçlar Üzerine Aşılı Washington Navel Portakalında Verimlilik ile Karbonhidrat Düzeyleri Arasındaki İlişkiler. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Doktora Tezi, 416 sayfa, Adana.
- Yıldız, E., Kaplankıran, M., Demirkese, T.H, Uzun, A., and Toplu, C., 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41(2):478-484.
- Zhou, Y.B., Peng, D.X., Zhou, Z.X., Zhang, J.Y. and Dai, Z.G., 1995. Studies on the mutagenic effect of an electron beam on citrus budwood. China-Citrus, 24(1):7-10.



ÖZGEÇMİŞ

12/06/1986 tarihinde İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 2004 yılında başladığı Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü’nden 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl Bahçe Bitkileri Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’ne Araştırma görevlisi olarak atandı. 2009-2011 yılları arasında ‘Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda gördüğü Yüksek Lisans eğitiminde ‘Farklı Turunçgil Anaçları Üzerine Aşılı Navelina Göbekli Portakalının Demir (Fe) Klorozuna Toleransının Fizyolojik Yönden İncelenmesi’ isimli tez çalışmasını tamamladı ve 2011 yılında doktora eğitimine başladı. Halen Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.



EKLER



EK.1. Hernandina M₁ V₃ bitkilerinde ölçümle değerlendirilen pomolojik özelliklere ait bulgular

Kod	Meyve Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk Kalınlığı (mm)	Dilim sayısı (adet)	Çekirdek sayısı (adet)	Orta eksen çapı (mm)	SÇKM (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare Miktarı (%)
H1001	60.67	45.09	50.95	1.13	2.46	12.00	2.00	11.28	9.50	1.35	7.05	31.87
H1002	72.89	52.08	54.84	1.05	2.92	9.44	6.67	9.69	12.90	1.03	12.49	40.55
H1003	89.43	55.60	59.46	1.07	3.84	10.57	5.57	13.29	11.10	0.73	15.16	36.10
H1004	70.50	50.56	53.84	1.06	3.23	9.80	5.00	9.05	12.40	1.13	10.96	41.49
H1005	87.00	54.24	56.84	1.05	3.50	10.12	6.25	11.33	12.60	1.12	11.23	43.97
H1006	80.33	50.46	56.85	1.13	3.12	10.60	6.83	10.63	12.00	1.00	11.96	36.93
H1007	62.67	53.49	58.20	1.09	3.13	9.60	4.33	9.86	11.60	1.05	11.08	40.96
H1008	87.71	56.14	55.36	0.99	3.21	9.80	3.14	11.28	12.10	0.97	12.52	43.00
H1009	78.00	52.34	55.47	1.06	3.64	9.60	7.40	9.30	11.30	1.01	11.20	41.54
H1010	95.50	56.48	58.89	1.04	2.88	10.00	8.00	10.31	12.90	1.10	11.78	38.74
H1011	154.00	68.18	69.14	1.01	4.38	8.00	7.00	10.42	11.30	0.81	13.93	28.57
H1012	86.00	52.79	56.23	1.07	2.23	9.60	4.38	8.51	12.30	1.05	11.75	43.90
H1013	71.20	51.01	54.11	1.06	2.82	9.70	2.10	9.81	12.70	1.12	11.35	46.35
H1014	94.80	52.36	61.35	1.17	3.28	8.00	7.00	11.73	12.30	0.84	14.72	37.97
H1015	56.44	46.03	49.42	1.07	3.01	9.60	4.22	8.78	11.70	1.09	10.74	40.94
H1016	61.14	47.62	49.83	1.05	2.64	9.00	3.71	9.90	10.70	0.91	11.72	45.33

EK-1.1.Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	Orta eksen- çapı(mm)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
H1017	40.00	41.04	44.84	1.09	2.46	9.20	5.00	8.95	10.90	1.96	5.56	35.00
H1018	58.00	48.76	50.81	1.04	3.94	11.00	4.00	4.37	11.30	1.04	10.84	17.24
H1019	52.00	43.51	48.06	1.10	3.64	10.12	0.50	9.52	9.70	1.42	6.85	41.35
H1020	40.15	40.21	44.54	1.11	3.31	10.00	1.85	6.37	11.00	1.66	6.61	44.83
H1021	100.67	57.49	59.89	1.04	3.79	10.30	6.00	11.63	13.70	0.97	14.15	31.13
H1022	61.20	48.18	49.88	1.04	3.64	10.00	3.80	7.61	12.50	0.89	14.08	29.41
H1023	76.57	52.74	56.01	1.06	3.50	10.10	7.14	10.09	12.10	0.86	14.15	28.73
H1024	48.00	42.51	44.68	1.05	2.46	9.00	3.00	7.18	10.00	1.14	8.75	33.33
H1025	55.56	45.76	49.48	1.08	3.07	10.33	5.22	8.72	12.10	1.28	9.47	43.60
H1026	48.67	42.16	45.03	1.07	2.50	9.60	3.17	6.71	15.40	1.44	10.67	39.04
H1027	61.27	46.43	49.48	1.07	2.95	9.20	3.73	7.59	11.60	0.93	12.42	41.84
H1028	70.25	49.43	53.27	1.08	3.57	10.10	5.00	8.59	11.40	0.96	11.93	38.43
H1029	94.00	45.61	57.43	1.26	2.69	9.50	1.25	8.24	12.00	0.87	13.76	42.02
H1030	44.17	41.64	45.81	1.10	2.66	11.83	4.17	7.71	11.90	1.51	7.87	40.00
H1031	47.67	42.31	46.12	1.09	2.32	10.60	0.17	8.32	11.90	1.35	8.79	40.56
H1032	80.00	46.22	56.99	1.23	2.62	12.00	4.00	10.40	11.00	0.99	11.10	37.50

EK-1.1.Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	Orta eksen- çapı (mm)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
H1033	51.71	45.07	47.70	1.06	2.26	10.57	0.86	6.01	13.60	1.33	10.20	37.02
H1034	43.00	41.28	45.26	1.10	2.49	10.00	5.00	4.76	11.20	1.53	7.31	32.56
H1035	53.80	46.68	49.57	1.06	2.99	10.90	3.70	9.59	11.60	1.40	8.31	34.94
H1036	75.00	52.47	48.44	0.92	3.37	11.00	5.00	12.87	12.10	0.98	12.30	40.44
H1037	47.27	42.99	47.02	1.09	3.32	10.36	3.45	9.82	11.70	1.60	7.32	39.23
H1038	44.00	42.43	44.49	1.05	8.49	10.40	3.71	7.43	11.90	1.17	10.18	35.06
H1039	92.80	56.01	57.77	1.03	4.08	11.20	2.60	8.50	11.70	1.03	11.33	45.69
H1040	60.00	47.51	50.52	1.06	3.75	10.20	2.75	8.14	12.20	1.35	9.05	39.17
H1041	49.60	43.82	47.87	1.09	3.20	10.40	4.00	8.16	12.40	1.16	10.66	35.48
H1042	42.57	41.94	45.32	1.08	2.73	10.42	2.57	7.11	12.50	1.37	9.11	45.97
H1043	84.00	54.62	56.80	1.04	3.73	10.00	3.00	9.27	11.10	1.19	9.32	28.57
H1044	82.00	51.06	55.80	1.09	3.30	11.00	1.75	7.24	11.60	1.31	8.83	35.37
H1046	76.67	53.07	54.86	1.03	3.86	9.60	2.67	8.02	11.90	1.04	11.49	35.65
H1047	59.20	48.23	49.82	1.03	2.88	9.20	1.00	7.70	12.70	1.44	8.84	36.49
H1048	55.60	44.60	48.46	1.09	2.78	10.60	3.60	10.31	11.00	1.20	9.18	29.50
H1049	51.83	44.81	46.99	1.05	2.21	9.60	1.58	9.92	12.40	1.25	9.93	39.55

EK-1. Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	Orta eksen- çapı (mm)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
H1051	88.00	61.42	55.89	0.91	3.14	9.50	3.00	7.70	10.40	1.08	9.67	35.23
H1052	82.40	52.33	56.92	1.09	3.06	9.80	3.40	10.47	11.60	1.10	10.55	40.29
H1053	78.40	52.33	55.73	1.06	2.84	10.00	3.00	9.91	12.00	0.86	13.96	40.31
H1054	66.00	50.21	52.93	1.05	3.56	10.16	4.83	9.01	12.60	1.37	9.20	36.36
H1055	56.67	44.14	49.45	1.12	2.73	10.11	4.33	12.20	12.40	1.11	11.18	39.61
H1056	55.33	45.87	48.60	1.06	2.73	10.30	3.33	8.26	11.60	1.09	10.63	32.53
H1057	54.20	40.17	49.28	1.23	3.06	10.30	1.10	10.09	12.80	1.12	11.41	40.96
H1058	50.29	43.05	47.53	1.10	3.03	9.71	1.29	6.26	12.90	1.20	10.74	33.52
H1059	66.40	50.33	52.03	1.03	2.96	10.20	5.80	10.44	12.80	1.07	12.01	38.55
H1060	44.50	42.31	45.33	1.07	1.89	10.25	2.00	7.41	13.30	1.42	9.35	38.20
H1061	59.50	46.79	49.40	1.06	2.38	9.00	1.50	8.85	12.50	1.22	10.26	39.50
H1062	73.20	51.53	54.01	1.05	3.09	9.40	3.80	9.58	12.50	1.04	12.00	43.72
H1063	48.67	44.47	44.72	1.01	3.12	9.00	8.00	4.30	12.20	1.04	11.76	28.77
H1065	58.00	49.35	49.63	1.01	2.61	10.00	1.50	6.49	11.60	1.08	10.70	25.86
H1067	41.00	38.66	44.82	1.16	2.97	11.50	1.00	7.17	11.20	0.96	11.67	31.71
H1068	64.00	47.49	51.64	1.09	2.98	11.00	6.00	6.60	10.90	1.05	10.41	31.25

EK-1. Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı- (adet)	Orta eksen- çapı (mm)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı- (%)
H1069	40.00	41.66	43.63	1.05	2.08	9.00	9.00	5.46	9.80	1.39	7.04	15.00
H1070	68.67	49.37	52.89	1.07	3.29	10.30	2.33	8.40	12.50	0.94	13.24	32.04
H1071	56.00	43.88	48.87	1.11	2.56	11.00	5.00	5.97	12.30	1.18	10.45	35.71
H1072	65.00	52.63	51.44	0.98	3.34	9.50	6.00	7.49	10.50	1.04	10.14	26.15
H1073	75.00	50.96	54.88	1.08	2.55	9.70	5.50	8.55	13.30	0.92	14.43	37.33
H1074	45.67	44.51	44.98	1.01	2.59	9.00	1.83	7.00	13.50	1.09	12.36	28.47
H1075	62.00	49.08	49.90	1.02	2.89	9.50	2.25	6.92	13.30	1.30	10.26	33.87
H1076	70.00	51.59	49.87	0.97	2.24	10.00	2.00	8.12	10.70	0.92	11.66	25.71
H1077	54.00	45.78	47.71	1.04	2.63	10.00	0.75	9.59	14.60	1.24	11.78	31.48
H1078	45.00	42.40	44.72	1.05	1.88	8.50	1.00	2.97	11.23	1.64	6.84	40.00
H1079	50.00	43.49	47.96	1.10	2.75	11.00	6.00	4.89	9.80	0.91	10.77	12.00
H1080	76.00	51.62	53.91	1.04	2.05	10.00	3.80	9.36	13.30	0.90	14.84	41.05
H1081	57.20	45.97	49.89	1.09	2.43	10.40	1.80	9.79	12.40	1.19	10.40	44.06
H1084	61.00	47.85	50.78	1.06	3.21	11.00	5.25	7.78	11.60	1.22	9.50	36.89
H1085	53.67	46.20	49.51	1.07	2.92	9.50	4.00	7.94	11.80	1.27	9.32	32.30
H1086	58.67	45.95	49.40	1.08	2.52	10.60	4.00	8.27	11.70	1.16	10.07	42.80

EK-1. Devamı

Kod	Meyve Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk Kalınlığı (mm)	Dilim sayısı (adet)	Çekirdek sayısı (adet)	Orta eksen çapı (mm)	SÇKM (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare Miktarı (%)
H1087	48.75	43.94	47.44	1.08	3.05	9.80	1.63	11.05	10.00	1.38	7.25	34.87
H1088	96.00	55.35	58.56	1.06	2.78	12.00	6.00	8.33	10.70	1.01	10.57	20.83
H1089	46.00	41.62	46.13	1.11	2.60	10.50	3.79	8.48	13.40	1.36	9.83	37.27
H1090	72.67	50.25	55.33	1.10	3.24	11.00	9.00	11.36	12.00	1.11	10.82	30.28
H1091	64.50	48.55	51.81	1.07	3.10	10.50	3.25	9.03	11.40	1.19	9.61	32.56
H1092	84.00	55.38	59.04	1.07	4.66	11.00	11.00	12.76	10.70	0.83	12.96	23.81
H1093	84.00	55.63	56.48	1.02	3.87	10.00	2.00	11.15	11.40	0.94	12.11	19.05
H1094	87.33	49.45	58.75	1.19	3.87	10.60	4.67	11.01	12.00	0.95	12.64	31.30
Hernandina	80.00	50.42	55.42	1.09	3.15	10.60	7.65	10.55	10.00	0.80	12.50	40.00

EK 2. Hernandina M₁ V₃ bitkilerinde gözlemledeğerlendirilen pomolojik özelliklere ait bulgular

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve et rengi	Meyve suyu rengi	Meyve et tekstürü	Kabuğun ete bağlılığı
H1001	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1002	4.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1003	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1004	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1005	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1006	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1007	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1008	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1009	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1010	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1011	3.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
H1012	4.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1013	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1014	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1015	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1016	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1017	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00

EK-2. Devamı

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve et rengi	Meyve et suyu rengi	Meyve et tekstürü.	Kabuğun ete bağlılığı
H1018	2.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1019	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	2.00
H1020	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1021	4.00	3.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	1.00
H1022	4.00	3.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1023	3.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1024	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1025	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1026	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1027	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1028	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	2.00
H1029	4.00	3.00	4.00	7.00	4.00	4.00	1.00	1.00
H1030	3.00	3.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1031	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1032	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
H1033	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1034	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00

EK-2. Devamı

Kod	Meyve dış- görünüŖü	Meyve Ŗekli	Meyve- kabuk- yapısı	Meyve kabuk- rengi	Meyve et- rengi	Meyve- suyu rengi	Meyve et- tekstürü.	Kabuğun ete- bağlılığı
H1035	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1036	4.00	3.00	4.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1037	4.00	3.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1038	3.00	3.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1039	3.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1040	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1041	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	2.00
H1042	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1043	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	2.00
H1044	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1046	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	2.00
H1047	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1048	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1049	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1050	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1051	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1052	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00

EK-2: Devamı

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve et rengi	Meyve suyu rengi	Meyve et tekstürü.	Kabuğun ete bağlılığı
H1053	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1054	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1055	4.00	2.00	4.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1056	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1057	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1058	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1059	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1060	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1061	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1062	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1063	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1065	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1067	2.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1068	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1069	3.00	2.00	4.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1070	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	1.00	1.00
H1071	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00

EK-2. Devamı

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve et rengi	Meyve suyu rengi	Meyve et tekstürü.	Kabuğun ete bağlılığı
H1072	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	1.00
H1073	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1074	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1075	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1076	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1077	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1078	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1079	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1080	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1081	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	1.00
H1084	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1085	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1086	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
H1087	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1088	3.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
H1089	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1090	3.00	2.00	3.00	6.00	4.00	4.00	1.00	2.00

EK-2. Devamı

Kod	Meyve-dış- görünüŖü	Meyve-Ŗekli	Meyve- kabuk- yapısı	Meyve-kabuk- rengi	Meyve-et- rengi	Meyve- suyu rengi	Meyve-et- tekstürü.	Kabuğun ete- bağlılığı
H1091	3.00	2.00	3.00	7.00	4.00	4.00	2.00	2.00
H1092	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
H1093	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00
H1094	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	1.00
Hernandina	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	1.00

EK-3. Ortanique M₁ V₃ bitkilerinde ölçümle değerlendirilen pomolojik özelliklere ait bulgular

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
1-21	160.80	63.12	69.94	1.11	4.52	10.00	3.00	9.10	1.31	6.93	49.00
1-24	164.67	58.37	71.61	1.23	4.15	10.00	1.00	8.80	1.29	6.84	55.06
1-33	161.00	61.44	69.92	1.14	4.60	10.95	3.30	9.60	1.33	7.24	49.81
1-71	114.80	48.45	63.38	1.31	3.16	10.60	5.00	11.30	1.58	7.17	58.89
2-17	163.33	62.32	68.83	1.10	3.85	11.00	5.67	9.60	1.61	5.96	48.57
2-47	196.80	63.75	75.63	1.19	3.14	10.80	7.80	10.30	1.12	9.20	55.08
2-62	233.00	68.77	80.08	1.16	4.54	10.80	13.10	9.90	1.46	6.80	50.64
2-66	190.67	66.02	74.05	1.12	4.41	10.33	8.33	9.80	1.36	7.20	46.50
2-82	108.00	61.77	61.45	0.99	3.90	8.00	5.00	9.30	1.55	6.02	42.59
2-84	214.00	64.02	77.57	1.21	3.41	10.00	4.50	10.70	1.17	9.16	50.00
2-87	226.00	66.05	78.94	1.20	4.40	11.00	3.50	9.20	1.33	6.91	48.23
2-88	251.00	70.01	81.31	1.16	4.74	9.50	1.00	10.20	1.23	8.31	44.62
3-35	221.60	66.23	79.58	1.20	4.30	11.40	10.00	8.70	1.10	7.88	46.03
3-38	217.00	64.11	76.78	1.20	4.07	9.50	10.50	10.20	1.39	7.32	46.54
3-40	184.40	63.34	73.86	1.17	4.40	11.00	10.20	10.00	1.45	6.89	52.06
3-42	176.20	61.22	73.91	1.21	4.33	10.60	4.90	10.50	1.33	7.87	52.55

EK 3. Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
3-43	162.00	63.03	69.26	1.10	4.12	9.00	8.00	11.90	1.53	7.80	53.09
3-44	146.00	57.76	67.74	1.17	4.05	10.67	4.67	9.20	1.14	8.05	48.40
3-47	233.60	68.24	81.01	1.19	4.65	10.90	9.70	9.80	1.40	7.02	52.31
3-53	166.22	61.04	70.93	1.16	4.08	10.89	7.44	10.40	1.51	6.88	53.74
3-57	90.00	53.39	56.72	1.06	3.52	9.33	4.50	11.90	1.62	7.35	43.33
3-58	169.40	61.62	71.34	1.16	3.55	10.20	4.90	10.40	1.38	7.52	55.73
3-59	201.33	63.31	76.02	1.20	4.24	11.00	8.33	10.20	1.49	6.86	52.32
3-60	99.60	57.52	58.88	1.02	3.79	9.50	3.50	11.50	1.38	8.34	50.40
3-61	200.00	64.77	78.00	1.20	4.60	10.00	2.00	9.20	1.52	6.04	48.00
3-69	155.50	61.63	68.72	1.12	3.87	11.25	5.75	9.10	1.29	7.07	51.13
3-73	227.40	69.24	80.38	1.16	4.90	10.90	10.70	9.70	1.42	6.85	53.39
3-75	196.00	64.73	76.73	1.19	4.11	10.90	6.10	10.00	1.23	8.15	53.88
3-78	164.60	61.17	72.04	1.18	4.76	10.30	6.90	9.50	1.31	7.25	50.06
3-84	131.00	49.41	66.98	1.36	2.76	11.50	5.50	11.50	1.41	8.14	52.67
3-89	171.25	63.04	72.70	1.15	4.69	9.63	4.88	9.70	1.40	6.92	49.93
4-63	164.00	63.47	70.59	1.11	3.89	11.00	7.50	10.00	1.45	6.88	52.44

EK 3.:Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
4-80	209.80	66.98	77.04	1.15	4.24	10.80	5.90	10.50	1.18	8.88	55.77
5-16	178.60	63.88	73.49	1.15	4.21	11.10	2.40	9.90	1.28	7.73	54.87
5-25	161.43	61.67	71.10	1.15	4.83	11.00	5.14	10.10	1.26	8.02	51.50
5-26	214.00	70.20	76.29	1.09	5.06	11.00	5.50	8.90	1.16	7.65	42.99
5-35	217.00	67.48	77.78	1.15	4.74	11.50	10.00	9.10	1.38	6.57	43.78
5-37	244.00	72.80	81.44	1.12	4.73	11.33	11.00	9.90	1.09	9.09	50.00
5-43	190.00	61.96	75.81	1.22	4.09	11.00	3.50	9.90	1.41	7.04	51.32
5-45	184.80	62.54	73.47	1.17	3.52	11.00	5.00	10.10	1.27	7.96	56.71
5-49	198.40	65.24	76.39	1.17	4.42	11.00	8.50	11.20	1.50	7.47	53.33
5-52	111.60	51.91	61.21	1.18	3.40	10.00	6.00	11.30	1.50	7.54	56.99
5-53	176.00	61.55	72.47	1.18	4.08	10.67	5.00	8.90	1.34	6.64	57.20
5-54	215.40	66.52	78.51	1.18	4.59	10.20	7.00	9.70	1.26	7.69	53.76
5-60	226.40	68.71	78.79	1.15	4.46	11.20	10.30	10.00	1.34	7.47	51.86
5-62	192.20	63.20	74.32	1.18	4.43	10.50	5.40	9.40	1.25	7.50	50.36
5-64	165.75	62.61	71.88	1.15	5.36	10.63	6.38	9.50	1.19	7.99	47.96
5-66	218.00	66.15	76.74	1.16	3.90	11.00	3.00	9.90	1.50	6.62	50.46

EK 3.:Devamı

Kod	Meyve- Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk- Kalınlığı (mm)	Dilim- sayısı (adet)	Çekirdek- sayısı (adet)	SÇKM- (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare- Miktarı (%)
5-69	161.56	62.18	70.80	1.14	4.92	11.11	3.33	10.10	1.40	7.20	52.82
5-70	116.80	52.54	63.32	1.21	4.13	11.60	0.60	10.20	1.39	7.35	50.68
5-71	185.40	64.17	73.87	1.15	5.29	11.00	5.50	9.90	1.24	7.97	48.33
5-74	154.00	59.04	69.16	1.17	4.45	12.00	5.00	10.60	1.47	7.19	54.55
5-75	190.00	64.59	74.79	1.16	4.23	10.50	6.50	9.90	1.18	8.38	47.89
5-76	167.20	59.79	71.74	1.20	4.08	10.80	6.90	10.90	1.51	7.21	53.11
5-77	174.25	66.15	72.95	1.10	4.54	10.38	6.88	9.80	1.35	7.28	50.50
5-78	167.67	63.03	71.11	1.13	4.66	11.00	4.83	9.50	1.40	6.81	52.29
5-80	174.00	60.32	73.31	1.22	3.81	10.80	1.80	12.00	1.43	8.41	54.71
5-82	148.00	58.25	68.10	1.17	3.87	11.30	3.20	10.80	1.55	6.96	55.81
5-83	179.27	61.68	73.97	1.20	4.46	11.18	5.45	10.40	1.42	7.32	51.12
5-84	191.40	63.75	76.39	1.20	5.26	11.20	7.00	10.20	1.46	6.97	50.89
5-88	144.67	56.02	66.88	1.19	4.38	10.67	1.67	10.00	1.49	6.73	47.93
5-90	124.50	52.23	64.43	1.23	4.47	11.25	1.00	10.70	1.53	6.99	52.21
6-25	287.60	72.20	84.79	1.17	5.47	10.80	1.80	8.70	1.10	7.93	52.57
6-81	184.20	61.18	75.40	1.23	4.46	10.70	8.90	11.70	1.41	8.32	52.66

EK 3. Devamı

Kod	Meyve Ağırlığı (g)	Uzunluk (mm)	Genişlik (mm)	İndeks	Kabuk Kalınlığı (mm)	Dilim sayısı (adet)	Çekirdek sayısı (adet)	SÇKM (%)	Asitlik (%)	SÇKM/Asitlik	Usare Miktarı (%)
7-2	121.71	52.25	63.69	1.22	3.47	10.00	5.86	11.80	1.53	7.70	54.46
7-3	240.25	68.83	80.68	1.17	5.15	11.00	8.38	9.90	1.38	7.18	51.30
7-36	230.00	66.01	78.69	1.19	4.67	11.00	9.50	9.50	1.25	7.61	50.43
7-7	128.50	53.68	64.36	1.20	3.55	11.00	1.50	12.00	1.35	8.87	57.59
Ortanique	194.73	60.70	76.56	1.26	4.27	11.20	10.70	10.40	1.24	8.39	49.86

EK-4. Ortanique-M₁V₃ bitkilerinde gözlemle değerlendirilen pomolojik özelliklere ait bulgular

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve rengi	Meyve et suyu rengi	Meyve et tekstürü	Kabuğun ete bağlılığı
1-21	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
1-24	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
1-33	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
1-71	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
2-17	2.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
2-47	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
2-62	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
2-66	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
2-82	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
2-84	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
2-87	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
2-88	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-35	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-38	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-40	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-42	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00

EK-4. Devamı

Kod	Meyve- dış- görünüŧü	Meyve- ŧekli	Meyve- kabuk- yapısı	Meyve- kabuk- rengi	Meyve-et- rengi	Meyve- suyu- rengi	Meyve-et- tekstürü	Kabuğun- ete- bağlılığı
3-43	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-44	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
3-47	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-53	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
3-57	3.00	2.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-58	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-59	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-60	3.00	2.00	2.00	7.00	4.00	4.00	2.00	3.00
3-61	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-69	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-73	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-75	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-78	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
3-84	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
3-89	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
4-63	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00

EK 4. Devamı

Kod	Meyve dış görünüşü	Meyve şekli	Meyve kabuk yapısı	Meyve kabuk rengi	Meyve et rengi	Meyve suyu rengi	Meyve et tekstürü	Kabuğun ete bağlılığı
4-80	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-16	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-25	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-26	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-35	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-37	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-43	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-45	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-49	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-52	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-53	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-54	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-60	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-62	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	4.00
5-64	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-66	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00

EK-4.:Devamı

Kod	Meyve- dış- görünüüü	Meyve- şekli	Meyve- kabuk- yapısı	Meyve- kabuk- rengi	Meyve-et- rengi	Meyve- su- rengi	Meyve-et- tekstürü	Kabuğun- ete- bağlılığı
5-69	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-70	4.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-71	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-74	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-75	3.00	1.00	3.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-76	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-77	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-78	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-80	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-82	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-83	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
5-84	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-88	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
5-90	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
6-25	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00
6-81	3.00	1.00	3.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
7-2	3.00	1.00	2.00	6.00	4.00	4.00	3.00	3.00

EK 4. Devamı

Kod	Meyve· dış· görünüü	Meyve· şekli	Meyve· kabuk· yapısı	Meyve· kabuk· rengi	Meyve·et· rengi	Meyve· suyu· rengi	Meyve·et· tekstürü	Kabuğun· ete· bağlılığı
7-3	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
7-36	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00
7-7	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	3.00	3.00
Ortanique	3.00	1.00	2.00	7.00	4.00	4.00	1.00	3.00