

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM

DALI

EKONOMİK OLARAK ÖNEMLİ CİTRUS  
TÜRLERİNDEN ŞEKER PORTAKALININ (*Citrus  
sinensis* (L.) OSBECK) MİKROÇOĞALTIM SONRASI  
OLUŞAN VARYASYONLARININ ISSR MARKER  
SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVİNÇ GÜLDAĞ

TEMMUZ/2021

MUĞLA

S. GÜLDAĞ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ MUĞLA 2021

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM**  
**DALI**

**EKONOMİK OLARAK ÖNEMLİ CİTRUS**  
**TÜRLERİNDEN ŞEKER PORTAKALININ (*Citrus***  
***sinensis* (L.) OSBECK) MİKROÇOĞALTIM SONRASI**  
**OLUŞAN VARYASYONLARININ ISSR MARKER**  
**SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEVİNÇ GÜLDAĞ**

**TEMMUZ/2021**

**MUĞLA**

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

## TEZ ONAYI

Sevinç Gldağ tarafından hazırlanan **EKONOMİK OLARAK ÖNEMLİ CİTRUS TÜRLERİNDEN ŞEKER PORTAKALININ (*Citrus sinensis* (L.) OSBECK) MİKROÇOĞALTIM SONRASI OLUŞAN VARYASYONLARININ ISSR MARKER SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ** başlıklı tezin 01.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

### TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ (**Jüri Başkanı**) İmza  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Gebze Teknik Üniversitesi, Gebze, Kocaeli

Doç. Dr. Ergun KAYA (**Danışman**) İmza  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Ayşegül YILDIZ (ye) İmza  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

### ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Ramazan GP (**Bölüm Başkanı / Anabilim Dalı Başkanı**) İmza  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Ergun Kaya İmza  
Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 01.07.2021

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Sevinç GÜLDAĞ

01.07.2021

## ÖZET

# EKONOMİK OLARAK ÖNEMLİ CİTRUS TÜRLERİNDEN ŞEKER PORTAKALININ (*Citrus sinensis* (L.) OSBECK) MİKROÇOĞALTIM SONRASI OLUŞAN VARYASYONLARININ ISSR MARKER SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Sevinç GÜLDAĞ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr Ergun KAYA

Temmuz 2021, 81 sayfa

Geçmişten günümüze başta besin kaynağı olarak kullanılmasının yanında içerdiği yoğun C vitamini başta olmak üzere, niasin, diyet lif, pektin, folik asit, kalsiyum, magnezyum, potasyum gibi gıda bileşenleri ile önem taşıyan ve yaygın kullanıma sahip tıbbi aromatik bitkilerden birisi de turunçgillerdir. Meyvelerinden gıda olarak yararlanılan turunçgillerin parfümeri alanında ise aromatik özellikte yağların elde edilmesinde kabuk, yaprak, çiçek gibi kısımları kullanılabilir. Ülkemizde Turunçgil yetiştirme oranı oldukça fazladır ve ekonomik önemi de büyüktür. Bu nedenle turunçgiller insanlar için oldukça değerlidir ve ayrıca bu bitkinin korunması ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasının önlenmesi gereklidir. Kendi doğal ortamına kıyasla laboratuvar ortamında mikroçoğaltım yöntemiyle çok daha kısa sürede ve çok daha fazla sayıda bitkicik oluşturmak mümkün olmaktadır. Ancak mikroçoğaltım sırasında bitkinin geliştiği besin ortamı içeriği ya da diğer ortam koşulları bitkide birtakım varyasyonlara neden olabilmekte ve bu durum bitkinin bazı özelliklerinin kaybolmasına ve hatta ekonomik değerinin düşmesine neden olabilmektedir. Geliştirilen besin ortamı veya alt kültürleme aşamalarının herhangi birinde genetik kararlılıkta bir varyasyon olmuyorsa uygulanan yöntem başarılıdır ve böylece genetik olarak kararlı çok daha hızlı ve kolay bitki üretimi ve geliştirilmesi mümkün olabilmektedir. Mevcut tez çalışmasında yaygın turunçgil türlerinden şeker portakalına (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ait tohumların sterilizasyon basamaklarının ardından *in vitro* koşullarda bir yıl boyunca dört haftalık alt kültürleme işlemleri yoluyla klonal çoğaltım yapılmıştır. Daha sonrasında elde edilen klonlar arasındaki genetik kararlılık moleküler markör tekniklerinden ISSR primerleri kullanılarak belirlenmiş olup, bitkinin girmiş olduğu stres koşulları sonucunda genetik yapısında birtakım bozulmalar kayıplar meydana gelip gelmediği incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Turunçgil, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Mikroçoğaltım, ISSR

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ECONOMICALLY IMPORTANT CITRUS SPECIES OF SWEET ORANGE (*Citrus sinensis* (L.) OSBECK) AFTER MICROPROPAGATION BY ISSR MARKER SYSTEMS

Sevinç GÜLDAĞ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergun KAYA

July 2021, 81 paper

Citrus fruits are one of the medicinal aromatic plants that are important and widely used with food components such as niacin, dietary fiber, pectin, folic acid, calcium, magnesium, potassium, especially the intense vitamin C it contains, besides being used as a food source from the past to the present. In the field of perfumery of citrus fruits, whose fruits are used as food, parts such as shell, leaf and flower can be used to obtain aromatic oils. Citrus cultivation rate is quite high in our country and its economic importance is also great. Therefore, citrus fruits are very valuable for humans. For this reason, it is necessary to protect this plant and prevent it from extinction. Compared to its natural environment, it is possible to create much more plantlets in a much shorter time with the micropropagation method in the laboratory environment. However, during micropropagation, the content of the nutrient medium in which the plant develops or other environmental conditions may cause some variations in the plant, and this may cause the loss of some characteristics of the plant and even a decrease in its economic value. The applied method is successful if there is no variation in genetic stability in any of the developed medium or subculturing stages. Thus, it is possible to produce and develop genetically stable plants much faster and easier. In the present thesis study, seeds of sugar orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), one of the common citrus species, were taken *in vitro* after sterilization steps and micropropagated as a result of monthly sub-culturing processes for a year. Afterwards, the genetic stability among the obtained clones was determined by using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), one of the molecular marker techniques, and it was investigated whether there were some degradation in the genetic structure of the plant as a result of the stress conditions.

**Keywords:** Citrus, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Micropropagation, ISSR

*bilime değer veren herkese,*



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterici olan, her konuda desteğini esirgemeyen başta değerli danışman hocam Doç. Dr. Ergun Kaya'ya teşekkür ederim.

Tez savunmamda jüri üyeliği yapan, tezimin iyileştirilmesi ve eksiklerimin giderilmesinde bana yol gösteren hocalarım sayın Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi ve Doç. Dr. Ayşegül Yıldız'a teşekkür ederim. Ayrıca, üzerimde emekleri olan ve hiçbir desteğini esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Nurdan Saraç, Doç. Dr. Reşat Ünal, Dr. Öğretim Üyesi Filiz Altan ve Doç. Dr. Ersin Doğaç hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım da bana destek olan ekip arkadaşlarım Bilge Öztürk, Damla Ekin Özkaya, Onur Çelik, Selin Galatalı, Sevil Yeniocak, Taner Mercan, tezimi düzenlemede büyük katkı sağlayan çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Hilal Büşra Tokgöz, Efe Berk Bozkurt, Nazlı Pinar, Ecem Yüksektepe, Ahmet Korkut, Ömer Yüzer'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi manevi her zaman arkamda olan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen canım aileme ve her ne kadar birbirimizden uzak şehirlerde olsak da varlıkları bana güç veren kardeşten öte dostlarım Zeynep Deniz Kavak, Serenay Çelik ve S. Çağla Durmaz' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Hakkında Bilgiler.....	1
1.1.1. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck'in taksonomisi.....	1
1.1.2. <i>Citrus</i> cinsinin filogenisi.....	4
1.1.3. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck türünün morfolojik özellikleri.....	5
1.1.4. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck'in genetik özellikleri .....	8
1.1.5. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck'in yaşam döngüsü.....	8
1.1.6. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck'in yetiştirme koşulları .....	9
1.1.7. Dünyada ve Türkiye'de portakal yetiştiriciliği .....	9
1.1.8. Muğla ili ve portakal üretimindeki payı .....	10
1.1.9. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck'in kullanım alanları ve tıbbi faydaları.....	12
1.2. Bitki Islahı ve Genetik Kararlılık.....	13
1.2.1. Mikroçoğaltım tekniği .....	14
1.2.2. Somaklonal varyasyonlar.....	15
1.3. Genetik Kararlılık Tespitinde Kullanılan Markör (Belirteç) Sistemleri.....	16
1.3.1. Morfolojik markörler .....	16
1.3.2. Biyokimyasal markörler.....	16
1.3.2. DNA markörleri.....	16
1.1.1.1 Hibridizasyona dayalı belirteçler .....	18
1.1.1.2 PCR'a dayalı belirteçler .....	18

2. MATERYAL VE METOT .....	21
2.1. Mikroçoğaltım Uygulamaları .....	21
2.1.1. Bitki materyalinin eldesi.....	21
2.1.2. Bitki materyalinin sterilizasyonu ve <i>in vitro</i> ortama alınması.....	21
2.1.3. Sürgün çoğaltma aşaması.....	25
2.2. Mikroçoğaltımı Gerçekleştirilen Şeker Portakalı ( <i>Citrus Sinensis</i> (L.) Osbeck) Bitkilerinde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi .....	25
2.2.1. Genomik DNA ekstraksiyonu.....	26
2.2.2. Spektrofotometrik analizler .....	28
2.2.3. ISSR PCR ve jel elektroforezi analizleri .....	28
2.2.4. Elektroforez aşaması.....	30
2.2.4.1. Agaroz jel hazırlanışı .....	30
2.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi .....	30
2.3. Doğadan Alınıp <i>in vitro</i> Ortamda Çoğaltılan Bitkilerin İklimlendirme Yöntemi ile Tekrar Doğaya Adaptasyonu.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1. ISSR Primeri Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonrasında Elde Edilen Örneklere Ait Jel Elektroforezi Sonuçları.....	34
3.2. Doğadan Alınıp <i>in vitro</i> Ortamda Çoğaltılan Bitkilerin İklimlendirme Yöntemi ile Tekrar Doğaya Adaptasyonu.....	57
4. SONUÇ VE TARTIŞMA .....	58
KAYNAKÇA.....	62
ÖZGEÇMİŞ .....	72

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Swingle tarafından oluşturulan <i>Citrus</i> sınıflandırması (Swingle 1943) ..	1
Çizelge 1.2. Şeker portakalının taksonomisinin Swingle ve Tanaka sistemlerine göre karşılaştırılması (Luro vd., 2017).....	2
Çizelge 1.3. Şeker portakalının Swingle sınıflandırmasına göre sistematikteki yeri (Mendilcioğlu 1996).....	3
Çizelge 1.4. Portakal üreticisi ülkeler ve üretim miktarları (ton) ve üretim alanları (FAO, 2018).....	10
Çizelge 1.5. Türkiye’de illere göre portakal üretimi (Tan, 2014).....	11
Çizelge 1.6. PCR temelli moleküler tekniklerin karşılaştırılması (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu 2012). .....	20
Çizelge 2.1. Bitki materyalinin yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasal maddeler	22
Çizelge 2.2. Bitki materyalinin mikro çoğaltımı sırasında kullanılan kimyasal maddeler.....	23
Çizelge 2.3. Besin ortamlarında kullanılan maddeler ve miktarları.....	24
Çizelge 2.4. MS besi ortamının içeriği .....	24
Çizelge 2.5. DNA ekstraksiyonu için kullanılan CTAB solüsyonunun hazırlanması	27
Çizelge 2.6. CTAB solüsyon bileşenlerinin hazırlanması .....	27
Çizelge 2.7. DNA izolasyonu için kullanılan bileşenlerin uygulamadan önceki karışım oranları .....	27
Çizelge 2.8. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolü (Williams vd., 1990; Martins-Lopes vd., 2009).....	28
Çizelge 2.9. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri (Kalendar vd., 2011; Smýkal vd., 2011) .....	29

Çizelge 2.10. Martin-Lopez ve arkadaşları (Martins-Lopes vd., 2009) tarafından geliştirilmiş ISSR primerlerden proje çalışması için seçilen primerler ve dizileri. ...	29
Çizelge 2.11. 1 litre 50 X TAE solüsyon buffer hazırlanışı.....	30
Çizelge 3.1. İzole edilen DNA örneklerinin miktar tayini için gerçekleştirilen ..... spektrofotometrik analiz sonuçları.....	33
Çizelge 3.2. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları .....	37
Çizelge 3.3. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 5 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları .....	39
Çizelge 3.4. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları .....	41
Çizelge 3.5. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 10 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	43
Çizelge 3.6. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 825 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	45
Çizelge 3.7. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	47
Çizelge 3.8. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 864 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	49
Çizelge 3.9. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 873 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	51
Çizelge 3.10. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR 3A53 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	53
Çizelge 3.11. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> bireyinin ISSR-ED4 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları.....	55
Çizelge 3.12. Bant okumaları sonucunda primerler tarafından saptanan lokus sayısı	56
Çizelge 3.13. 3 <i>Citrus sinensis</i> bireyinin hesaplanan ortalama genetik kararlılık değerleri.....	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Turunçgillerin kökeni ve evcilleştirilmesi (Fiorentino vd., 2014).....	4
Şekil 1.2. Şeker portakalı ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) ağaçlarının genel görünümü	5
Şekil 1.3. Şeker portakalı ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) bitkisinin meyve ve yapraklarının genel görünümü .....	6
Şekil 1.4. Şeker portakalı ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) bitkisinin (a) çiçeklerinin (Web 1) ve tohumlarının (b) ve görünümü .....	6
Şekil 1.6. Farklı yapıları gösteren tipik bir ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) meyvesinin şematik bir kesiti .....	7
Şekil 1.7. Turunçgil meyveleri için dünyanın başlıca üretim bölgeleri turuncuyla gösterilmektedir (Liu vd., 2012) .....	9
Şekil 1.7. Türkiye’de portakal üretimi yapılan iller ve yüzdelik oranları (Oral ve Akpınar, 2017; Ertek vd., 2020).....	11
Şekil 2.1. Şeker portakalı ( <i>Citrus Sinensis</i> (L.) Osbeck) tohumlarının ön sterilizasyon aşamaları .....	22
Şekil 2.2. Şeker portakalı ( <i>Citrus Sinensis</i> (L.) Osbeck) tohumlarının steril kabinde %70’lik EtOH , %10’luk H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi ve %10’luk ticari ağartıcı ile muamalesi...	23
Şekil 2.3. İklimlendirme Odası .....	25
Şekil 2.4. Thermo Fisher Scientific 1 kb DNA Ladder.....	31
Şekil 3.1. 12 ay boyunca çoğaltılan citrus sinensis klonları .....	35
Şekil 3.2. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	36
Şekil 3.3. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 5 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	38
Şekil 3.4. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	40

Şekil 3.5. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 10 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	42
Şekil 3.6. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 825 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	44
Şekil 3.7. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	46
Şekil 3.8. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 864 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	48
Şekil 3.9. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 873 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	50
Şekil 3.10. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSR 3A53 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	52
Şekil 3.11. Üç farklı <i>Citrus sinensis</i> klonunun ISSRE.D.4 primeri ile gerçekleştirilen tarama sonuçları .....	54
Şekil 3.12. Doğadan alınıp <i>in vitro</i> ortamda çoğaltılan bitkilerin iklimlendirme yöntemi ile tekrar doğaya aktarımı .....	57

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
Mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
Bp	Baz Çifti
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EtOH	Etanol
ISSR	Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler
LN Sıvı	Azot
OD	Optik Densite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SSR	Basit Dizi Tekrarları
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Hakkında Bilgiler

Turunçgiller, tüm dünyada insan diyetlerine katkıda bulunan başlıca meyve mahsullerinden biridir. Oldukça geniş ekim alanlarına sahip olmaları nedeniyle, ticari öneme sahip turunçgillerin en bilinen örnekleri portakal, limon, misket limonu, greyfurt ve mandalınadır (Ramana vd., 1981). Şeker portakalı (*C. sinensis* [L.] Osbeck) ise dünya çapında toplam üretim ve piyasa değeri açısından çeşitli narenciye türleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Swingle ve Reece 1967; Luro vd., 2017).

### 1.1.1. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck'in taksonomisi

*Citrus* cinsinin taksonomisi, yakın zamana kadar tartışmalı ve karmaşık olmuştur. Turunçgillere ait yaygın iki sistem bulunmaktadır: 16 türü dikkate alan Swingle (Swingle 1943) sınıflandırması (Çizelge 1.1) ve 156 türü tanımlayan Tanaka sınıflandırmasıdır. (Tanaka 1961; Luro vd., 2017).

Çizelge 1.1. Swingle tarafından oluşturulan *Citrus* sınıflandırması (Swingle 1943)

Swingle Sistematigi (1943)		
ALT ŞUBE	Latince Adı	Yaygın Adı
<b><i>Citrus alt türü</i></b>	<i>C. aurantifolia</i>	Lime
	<i>C. aurantium</i>	Sour orange
	<i>C. indica</i>	Indian wild orange
	<i>C. limon</i>	Lemon
	<i>C. maxima</i>	Pummelo
	<i>C. medica</i>	Citron
	<i>C. paradisi</i>	Grapefruit
	<i>C. reticulata</i>	Mandarin
	<i>C. sinensis</i>	Sweet orange
	<i>C. tachibana</i>	Tachibana orange
<b><i>Papeda alt türü</i></b>	<i>C. latipes</i>	Khasi papeda
	<i>C. hystrix</i>	Kaffir lime
	<i>C. micrantha</i>	Small fruited papeda
	<i>C. celebica</i>	-
	<i>C. ichangensis</i>	Ichang papeda
	<i>C. macroptera</i>	Melanesian papeda

Portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), Mandalina (*Citrus reticulata* Blanco), limon (*Citrus limon* (L) Burm.), greycitrus (*Citrus paradisi* Macf.), misket limonu (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) ve pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) gibi başlıca bahçe yetiştiriciliği yapılan turunçgil gruplarının her biri Swingle sistematğinde türler olarak kabul edilir (Swingle 1943; Luro vd., 2017).

Swingle, tatlı portakal (*Citrus sinensis*) için yalnızca bir tür tanımlıyorken, Tanaka bu narenciye grubu için 12 tür tanımlamıştır (Çizelge 1.2.). Bu tartışmalı durum, geniş bir morfolojik çeşitliliğin, turunçgil cinsi içinde ve cinsler arasındaki genel cinsiyetler arası uyumluluğun ve birçok kültür bitkisinin kısmi (apomiksinin) birleşiminden kaynaklanmaktadır. Narenciye apomiksi, zigotik embriyoların yanı sıra somatik (çekirdekli) embriyoların gelişimi ile karakterizedir. Çimlenme ve büyüme için rekabet, klonal üremenin desteklenmesinden çok çekirdek embriyolarından fidelerin gelişimi için daha uygundur. Bu nedenle, benzer fenotiplere sahip ağaç popülasyonları üreten fide yayılmasıyla karmaşık genetik yapıları sabitler ve büyütür, sonuç olarak taksonomistler tarafından yeni türler olarak kabul edilir (Federici vd., 1998).

Çizelge 1.2. Şeker portakalının taksonomisinin Swingle ve Tanaka sistemlerine göre karşılaştırılması (Luro vd., 2017)

Swingle (1943)	Tanaka (1961)
<i>C. sinensis</i>	<i>C. sinensis</i> Osbeck
<i>C. sinensis</i>	<i>C. tankan</i> Tanaka
<i>C. sinensis</i>	<i>C. temple</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. oblonga</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. funadoko</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. iyo</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. sinograndis</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. luteo-turgida</i> Tanaka
<i>C. sinensis</i>	<i>C. ujukitsu</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. tamurana</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. aurea</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. shunkokan</i> Hort. ex Tan.

Şeker portakalının (*C. sinensis* [L.] Osbeck) Swingle sınıflandırmasına göre sistematikteki yeri Çizelge 1.3.'te gösterilmektedir (Mendilcioğlu 1996).

Çizelge 1.3. Şeker portakalının Swingle sınıflandırmasına göre sistematikteki yeri (Mendilcioğlu 1996)

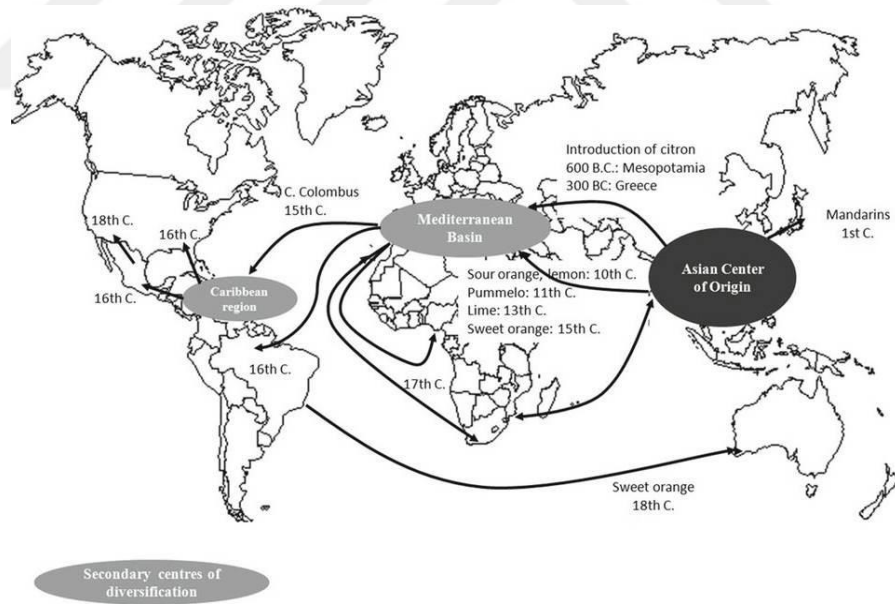
<b>Alem</b>	<i>Plantae</i>
<b>Takım</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Familya</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Cins</b>	<i>Citrus</i>
<b>Tür</b>	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osbeck

Yaygın olarak kullanılan iki taksonomik sisteme göre yapılan ve ağaçların, bazı morfolojik, çok az sayıda da kimyasal özellikleri baz alınarak şekillendirilen bu sistemlere göre 16 (Swingle ve Reece 1967) veya 162 (Tanaka 1977) tane turunçgil türü bulunmaktadır. Ancak turunçgillere ait 48 tür ve akrabalarıyla yaptıkları sayısal taksonomi methodu sonucu Barret ve Rhodes (1976) gerçek tür sayısının sadece 3 olduğunu diğer turunçgil türlerinin de bu 3 türün ikili veya üçlü melezlenmesi sonucunda ortaya çıkabileceği fikrini ortaya atmıştır. Moleküler markörler (Federici vd., 1998; Şeker 1999; Nicolosi vd., 2000; Gulsen ve Roose 2001; Barkley vd., 2006; Pang vd., 2007; Uzun vd., 2009) ve biyokimyasal belirteçler (De-qiu vd., 1993; Herrero vd., 1996) kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sayesinde bu tez desteklenmiştir.

Turunçgil taksonomisi, filogenileri ve çeşitliliği üzerine yapılan genetik çalışmalardan elde edilen yeni bilgiler sayesinde gelişmektedir. Mabberley, üç türü ve dört hibrit grubu tanıyan yeni bir yenilebilir narenciye sınıflandırması önermiştir. Bununla birlikte, son genetik araştırmalar, bu üç sınıflandırmanın bile, narenciyenin filogenik tarihine tamamen uygun olmadığını göstermiştir (Mabberley 1997).

### 1.1.2. *Citrus* cinsinin filogenisi

Turunçgil meyvesinin kökeni, tartışmalı ve ilginç efsanelerle dolu bir tarihle özdeşleşmektedir. Orijin merkezinin genellikle geniş olduğu kabul edilmekle birlikte, güney Çin, kuzeydoğu Hindistan, Hint-Çin yarımadası ve Burma da dahil olmak üzere, asıl köken aldığı ilk çıkış yeri hala tartışmalıdır. Bu orijin merkezi, farklı kaynaklara göre güney Çin ve kuzeydoğu Hindistan'ın dağlık bölgesinden (Tolkowsky 1938) kuzeydoğu Hindistan ve Burma'ya (Tanaka 1954) veya Çin'in Yunnan eyaletine (Gmitter ve Hu 1990) kadar değişmektedir. Turunçgil türleri birkaç bin yıl önce Güneydoğu Asya'da evcilleştirilmiş ve sonrasında tüm dünyaya yayılmıştır (Şekil 1.1.). Citron, ekşi portakal, limon, misket limonu ve pomela İspanya'dan onuncu ve on birinci yüzyıl kitaplarında anlatılır. İlk şeker portakalı (*C. sinensis* [L.] Osbeck) türleri, on beşinci yüzyılın başında Avrupa'da yetiştirilmiştir, muhtemelen Cenevizliler tarafından tanıtılmış olup, ancak Portekizliler on altıncı yüzyılın başlarında daha seçkin türleri tanıtana kadar yayılmamışlardı (Fiorentino vd., 2014).



Şekil 1.1. Turunçgillerin kökeni ve evcilleştirilmesi (Fiorentino vd., 2014)

### 1.1.3. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck türünün morfolojik özellikleri

Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), hem taze meyve hem de işlenmiş meyve suyu olarak kullanılan narenciye üretiminin % 75'inden sorumlu olan, 4 mevsim yaprak dökmeyen temel meyve bitkisidir (Rick ve Simmonds 1976; Spiegel-Roy ve Goldschmidt 1996; Pedrosa vd., 2000). Portakal ağacının yüksekliği çok eski örnekler 15 m'ye ulaşmış olsa da genellikle yaklaşık 9–10 m arasındadır (Şekil 1.2.). Düzensiz olarak dizilmiş 4-10 cm uzunluğundaki yapraklar, kenar boşlukları ile oval şekillidir. Ağaçların ince pürüzsüz ve gri-kahverengi ile yeşilimsi kabukları vardır. Çoğu tür tek gövdelidir ve sert ağaçlardan oluşur. Gölge genişlikleri, türlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Webber vd., 1989).



Şekil 1.2. Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ağaçlarının genel görünümü

Meyveler farklı formlara (örneğin; yuvarlak, oval veya uzun) ve 3,8 ila 14,5 cm çapında çeşitli boyutlara sahip olabilirken genellikle Şekil 1.3.'te görüldüğü gibi turuncu renkte olup boyut, ve meyve suyu kalitesi bakımından da küçük farklılıklar gösterebilirler (Ranganna vd., 1983; Liu vd., 2012). Yaprakları pürüzsüz, oval, 5-15cm x 2-8cm, koyu yeşil ve parlaktır (Şekil1.3.) ve genellikle meyveye benzer kendine özgü bir kokuya sahiptir (Valiente ve Albrigo 2004).



**Şekil 1.3. Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) bitkisinin meyve ve yapraklarının genel görünümü**

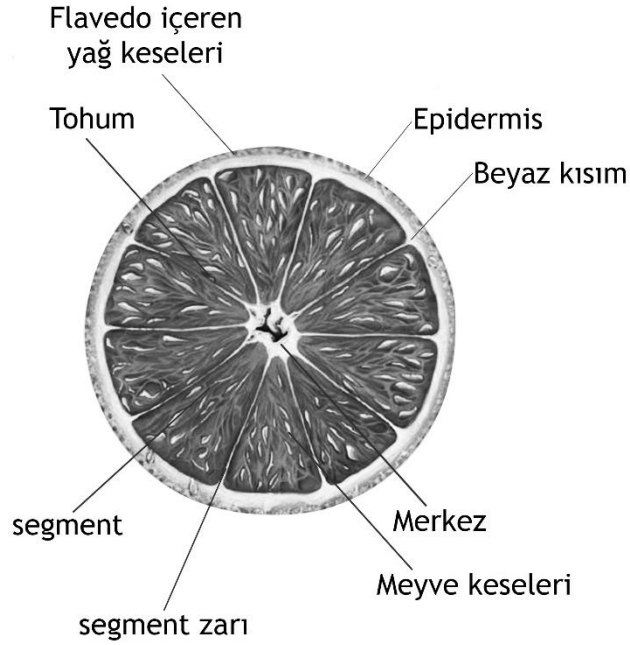
Çiçekler hoş kokulu, küçük, mumlu yeşilimsi beyaz (Şekil 1.4. (a)), tohumlar yeşilimsi ila soluk beyazımsı, basık ve köşeli ve genellikle poli embriyonik (Şekil 1.4. (b)) (Valiente ve Albrigo 2004).



**Şekil 1.4. Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) bitkisinin (a) çiçeklerinin (Web 1) ve tohumlarının (b) ve görünümü**

Turunçgil meyveleri genellikle bir epidermis (kösele benzeri ve mumsu bir katman), flavedo (aromatik yağlar üreten renk ve yağ torbaları içeren bir subepidermal katman), albedo (flavonun kaynağı, flavedonun altında süngerimsi bir tabaka) adı verilen katmanlar içerir ve bu katmanlar boyunca uzanan vasküler demetler olarak adlandırılan ince ipliklerden oluşan bir ağ bulundurur (Şekil 1.6.).

İç dokunun, genellikle hizalanmış ve meyvenin yumuşak orta çekirdeğinin etrafında yer alan ve septum adı verilen ince bir bölüm zarıyla sarılmış bölümleri vardır (Liu vd., 2012).



Şekil 1.6. Farklı yapıları gösteren tipik bir (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) meyvesinin şematik bir kesiti

Çoğu çeşitte meyve suyu ve tohum içeren küçük ve yoğun şekilde paketlenmiş keseler, segmentleri doldurur ve meyve suyunda bulunan sitrik asit, diğer asitler, yağlar ve şekerlerin bir karışımı ile birlikte karakteristik lezzeti verir (Ranganna vd., 1983; Davies ve Albrigo 1992). Toplam şeker miktarındaki artış, asitlik ve askorbik asit içeriğinde azalma, kabuk renginde değişiklik ve meyve boyutunda artış, olgunlaşarak gelişmeye ve olgunlaşmaya işaret etmektedir. Turunçgiller, hasattan edildikten sonra, bileşimde önemli bir değişiklik olmaksızın tüketilmeye ve işlenmeye hazırdır (Harding 1947; Bain 1958; Ramana vd., 1981).

#### **1.1.4. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck'in genetik özellikleri**

Turunçgil türlerinde günümüzde kültür çalışmaları yapılan çeşitlerin hemen hemen hepsi diploid kromozom yapısına sahip olup  $2n=18$  kromozoma sahiptir ancak buna ek olarak bitki ıslah metotları kullanılarak  $3n$  (triplod) yapıda turunçgillerin üretilmesi ki bu sayede çekirdeksiz meyvelerin üretimi söz konusudur (Kaneyoshi vd., 1997). Turunçgillerde toplam genom uzunluğu yaklaşık 1700 cM (Santimorgan: yaklaşık 1000 kilobaz'a eşdeğerdir) olarak belirlenmiştir (Jarrell vd., 1992).

Turunçgil genomlarına ilişkin son incelemeler göz önünde bulundurulduğunda nispeten küçük bir genom boyutuna sahip *Citrus sinensis* (haploid genomu için 372 Mb) odunsu meyve ağacı genomu için ilginç bir modeldir (Gulsen ve Roose 2001; Talon ve Gmitter 2008).

#### **1.1.5. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck'in yaşam döngüsü**

Portakal ağaçları yaprak dökmeyen dört mevsim yeşil kalabilen bitkilerdir. Türkiye'de kasım ayı başlarında başlayıp mayıs ayının yarısına kadar devam eden portakal hasatı, nadir durumlarda üreticiler tarafından pazar ihtiyacını daha uzun süre karşılamak amacıyla haziran sonuna kadar meyveleri ağaçta bırakmak suretiyle devam etmektedir (Can ve Durul, 2019).

### 1.1.6. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck'in yetiştirme koşulları

Turunçgil cinsi (Rutaceae familyası), dünya çapında en çok yetiştirilen meyve mahsullerinden biri olarak kabul edilmektedir Doğal türlerin sayısının belirsiz olması ve geniş ekim alanları nedeniyle ticari öneme sahip turunçgillerin en bilinen örnekleri portakal, limon, misket limonu, greyluft ve mandalınadır Turunçgiller 140 'tan fazla ülkede yetiştirilmesine rağmen ürünlerin çoğu ekvator çevresinde 35° güney ve 35° kuzey paralelleri arasındaki tropikal ve subtropikal alanlarda (Şekil 1.7.), kuzey yarımküredeki yetiştiriciliğin ve üretimin yoğun olduğu başlıca bölgelerde gerçekleşir (Ramana vd., 1981; Liu vd., 2012).



Şekil 1.7. Turunçgil meyveleri için dünyanın başlıca üretim bölgeleri turuncuyla gösterilmektedir (Liu vd., 2012)

### 1.1.7. Dünyada ve Türkiye'de portakal yetiştiriciliği

Turunçgillerin yıllık küresel üretimi, son birkaç on yılda güçlü ve hızlı bir büyümeye tanık olmuştur. 1960'ların sonlarında yaklaşık 30 milyon metrik tondan (FAO 1967), 2000 ile 2004 yılları arasında bu miktar tahmini olarak 105 milyon metrik tonun üzerindedir ki buna dünya çapındaki narenciye üretiminin yarısından fazlasını oluşturan portakallar katkıda bulunmuştur (Liu vd., 2012).

Dünya çapında 2019 yılı itibariyle toplam turunçgil üretimi 152.448.800 ton iken bu üretimin %49'unu portakalların oluşturduğu görülmektedir. Türkiye'de elde edilen 2018 verilerine göre 4.902.050 tonluk turunçgil üretiminin 1.900.000 tonluk kısmını portakal meyvesi oluşturmaktadır. Bu üretim miktarı ile ülkemiz dünyada portakal üretimi gerçekleştiren ülkeler arasında 10. sırada yer almaktadır. Örneğin Çizelge 1.4.'te gösterildiği gibi 2018 yılında dünyada üretimi gerçekleştirilen 75,4 milyon ton portakalın yaklaşık %2.5 gibi bir payı Türkiye'de gerçekleştirilmektedir (FAO, 2015).

**Çizelge 1.4. Portakal üreticisi ülkeler ve üretim miktarları (ton) ve üretim alanları (FAO, 2018)**

Ülkeler	2014	2015	2016	2017	2018	Al.(Ha)
Brezilya	16.928.457	16.953.015	16.980.379	17.492.882	16.713.534	589.139
Çin	7.964.133	8.191.678	8.414.043	8.550.882	9.246.305	509.760
Hindistan	7.317.610	7.710.000	7.581.000	7.647.000	8.367.000	613.000
ABD	6.139.826	5.763.340	5.522.940	4.615.760	4.833.480	206.349
Meksika	4.533.428	4.515.520	4.603.253	4.629.758	4.737.990	326.689
İspanya	3.494.471	2.935.370	3.673.915	3.357.163	3.639.853	139.626
Endonezya	1.926.560	1.856.174	2.138.474	2.295.325	2.510.442	68.335
<b>Türkiye</b>	<b>1.779.675</b>	<b>1.816.798</b>	<b>1.850.000</b>	<b>1.950.000</b>	<b>1.900.000</b>	<b>50.806</b>
<b>DÜNYA</b>	<b>72.214.543</b>	<b>72.331.331</b>	<b>72.771.146</b>	<b>73.468.675</b>	<b>75.413.374</b>	<b>4.469.719</b>

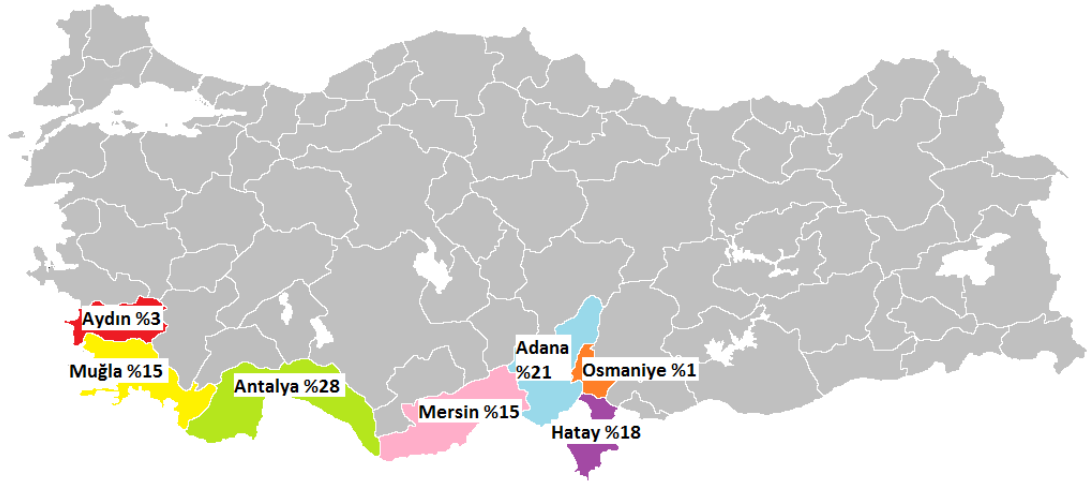
### 1.1.8. Muğla ili ve portakal üretimindeki payı

Ülkemizde toplam turunçgil üretimi yaklaşık olarak 3.800.000 tondur. Türkiye turunçgil üretiminin yaklaşık %47'si portakal, %28'i mandalina, %19'u limon, %6'sı greyfurt ve %0.07'si turunçtur (TÜİK 2016; Yıldıztekin ve Kuzu, 2019). Muğla ili, ılıman iklimi ve 1124 kilometrelik sahil şeridi sayesinde önemli bir tarım potansiyeline ve neredeyse tüm tarım ürünlerinin yetiştirilmesine olanak sağlayacak koşullara sahip bir ilimizdir. Turunçgiller ise Muğla'da üretim miktarı bakımından en yaygın meyve mahsulüdür. (Anonim, 2004; Yıldıztekin ve Kuzu, 2019). Çizelge 1.5.'te Türkiye'de illere göre portakal üretimine dair detaylar gösterilmektedir. Muğla iline ait önemli pay da kırmızı renk ile vurgulanmıştır (TÜİK 2019).

Çizelge 1.5. Türkiye’de illere göre portakal üretimi (TÜİK 2019)

İller	Alan		Üretim	
	Dekar	Payı (%)	Ton	Payı (%)
<b>Adana</b>	390.011	30,6	955.903	26,0
<b>Mersin</b>	275.467	21,6	835.514	22,7
<b>Hatay</b>	205.835	16,2	643.533	17,5
<b>Antalya</b>	159.729	12,5	619.317	16,8
<b>Muğla</b>	105.682	8,3	310.900	8,4
<b>Toplam</b>	1.273.426		3.681.158	

Şekil.1.7.’de de gösterildiği gibi Türkiye’de 2017 yılında portakal üretimi büyük çoğunlukla sırasıyla Antalya (%28), Adana (%21), Hatay (%18), Muğla (%15) ve Mersin’de (%15) yapılmaktadır (Oral ve Akpınar, 2017; Ertek vd., 2020).



Şekil 1.7. Türkiye’de portakal üretimi yapılan iller ve yüzdelik oranları (Oral ve Akpınar, 2017; Ertek vd., 2020)

### 1.1.9. *Citrus sinensis* (L.) osbeck'in kullanım alanları ve tıbbi faydaları

Tarihinin ve kökeninin gizemleri çözülmemiş olsa da turunçgil meyvesi (Rutaceae familyasındaki Turunçgil cinsi) dünya çapında yüksek talepli meyve mahsulleri arasında önemli bir yere sahiptir. II. Dünya Savaşı'ndan sonra dondurulmuş konsantre portakal suyu işleme teknolojisinin hızlı gelişimi de dahil olmak üzere narenciye endüstrisinin büyümesi, uluslararası ticaretle birlikte büyük ölçüde genişlemiştir ve 10-20 yılda narenciye ve turunçgil ürünlerinin tüketiminde istikrarlı bir artış olmuştur (Liu vd., 2012)

Farklı aroması ve lezzetli tadı ile karakterize edilen turunçgiller, önemli bir gıda kaynağı olarak kabul görmüş olup, günlük beslenmemizin bir parçası haline gelmiş durumdadır. Enerji ve besin kaynağı olmanın yanı sıra sağlık açısından da önemli roller oynamaktadır. Düşük protein ve çok az yağ içeriği ile turunçgiller esas olarak sukroz, glikoz ve fruktoz gibi karbonhidratları sağlamaktadır (Liu vd., 2012).

Taze turunçgiller, aynı zamanda, gastrointestinal hastalıkların önlenmesi ve dolaşımdaki kolesterolün düşürülmesi ile ilişkili iyi bir diyet lifi kaynağıdır. Meyveler en bol besin maddesi olan C vitamininin yanı sıra B vitaminleri (tiamin, piridoksin, niasin, riboflavin, pantotenik asit ve folat) kaynağıdır ve karotenoidler, flavonoidler ve limonoidler gibi fitokimyasallara katkıda bulunur. Bu biyolojik bileşenler, antioksidan özellikleri, A vitaminine dönüştürülme yetenekleri (örneğin,  $\beta$ -kriptoksantin) ve çeşitli kronik hastalıklardan korunmaları nedeniyle insan sağlığının iyileştirilmesinde hayati öneme sahiptir (Liu vd., 2012).

Turunçgillerin içeriğindeki C vitamini sahip olduğu diğer besin değerlerinin ötesindedir (Nagy 1980). Meyveler, sağlığı ve normal büyümeyi sürdürmek için gerekli olan basit şekerler ve diyet lifi gibi makro besinleri bol miktarda bulundururken folat, tiamin, niasin, B<sub>6</sub> vitamini, riboflavin, pantotenik asit, potasyum, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve bakır dahil olmak üzere birçok mikro besin kaynaklarını da içermektedir (Rouseff ve Nagy 1994; Economos ve Clay 1999).

Turunçgil meyveleri enerji yoğunluğu bakımından düşüktür ve sodyum ve kolesterol içermez. Ek olarak, limonoidler, flavonoidler ve karotenoidler dahil olmak üzere doğal olarak oluşan çeşitli fitokimyasalların anlaşılması halen aktif olarak araştırılmaktadır. Son epidemiyolojik çalışmalar ve diğer araştırmalar, bu biyoaktif bileşiklerin çok

çeşitli fizyolojik etkilere sahip olduğunu ve turunçgil meyve tüketimi ile kardiyovasküler hastalık, kanser, nörolojik bozukluklar, katarakt, osteoporoz ve maküler dejenerasyon gibi kronik hastalıkların önlenmesi arasındaki ilişkilere katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Liu vd., 2012). Örneğin, akciğer kanseri riskinin azalması, günde 1 portakal veya portakal suyu porsiyonundaki artışla ilişkilendirilirken, diğer meyve veya sebzeler için başka bir ilişki bulunamamıştır (Feskanich vd., 2000). Bazı epidemiyolojik çalışmalar, artan narenciye tüketimiyle birlikte belirli kanserlerin riskinin % 40 ila % 50 oranında azaldığını bildirmektedir. Önceki bulgular ayrıca turunçgillerin olası kalp koruyucu etkilerini de ortaya koymaktadır (Baghurst 2003). Bir çalışmada, taze portakal suyunun diyetle alınması lipoprotein oksidasyonunu azaltmıştır (Harats vd., 1998). Ayrı bir denemede, sağlıklı deneklerde 4 haftalık yüksek sebze ve turunçgil meyve tüketiminden sonra plazma folat artmış ve plazma homosistein konsantrasyonu azalmıştır (Brouwer vd., 1999b) Hiperkolesterolemik deneklerde yapılan küçük bir klinik çalışmadan elde edilen bulgular, 4 haftalık bir süre boyunca günlük portakal suyu tüketiminin (750 mL) bir sonucu olarak plazma lipit profillerinin iyileştiğini de göstermiştir (Kurowska vd., 2000). Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, narenciye tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörlerine karşı olası koruyucu faydalarını göstermiştir (Hertog vd., 1993; Joshipura vd., 2001; Knekt vd., 2002).

## 1.2. Bitki Islahı ve Genetik Kararlılık

Mikroorganizmalardan arındırılmış steril koşullar ve besi yeri ortamında hücrelerin, dokuların, organların veya tüm bitkinin kültürlenmesi işlemine *in vitro* çoğaltım adı verilir. Söz konusu bu ortam, ekonomik olarak değerli ve doğada çimlenmesi, yetişmesi zaman alan, tıbbi aromatik, az bulunan, endemik veya nesli tehdit altında olan bitki türleri için maksimum koruma, büyüme ve klonal çoğaltım için optimum şartları sağlamaktadır (Thorpe 2007; Ergun vd., 2018)

### 1.2.1. Mikroçoğaltım tekniği

Bitki doku kùltürü çalışmaları arasındaki *in vitro* teknikler arasında en çok başvurulan ve en yüksek oranda fayda sağlanan teknik mikroçoğaltım yöntemidir. Bitkinin; tohum, embriyo, kök, gövde, sürgün gibi bir bitkiyi tam olarak oluşturma potansiyeline sahip kısımları alınarak steril koşullarda yapay besiyeri ortamı içerisinde, kalıtsal olarak birbirine benzer çok sayıda bitkiyi hızlı bir şekilde çoğaltmayı amaçlayan bitki doku kùltürü tekniği **mikropropagasyon** ya da **mikroçoğaltım** olarak adlandırılmaktadır (Hayashi ve Kozai 1987; Kozai 1991; Ziv 1992; Zobayed vd., 1999; Seon vd., 2000).

1900'lü yılların başında ilk defa orkide bitkisinin tohumlarında denenmiş ve olumlu sonuçların alınması ile çalışmaların devamı getirilmiştir. Çoğaltılmak istenen bitki materyalinin klonal olarak kısa süre içerisinde çoğaltılmasını sağlayan vejetatif çoğaltma prensibidir. Klasik çoğaltma tekniklerine kıyasla daha maliyetli bir teknik olduğundan çalışılan bitki türüyle ilişkili olarak kısıtlı bir kullanımı vardır. Öncelikle üretimi amaçlanan bitkiler genellikle yetiştirilmesi zor, ekonomik değerü yüksek ya da hızlı bir şekilde gelişemeyen (muz, kivi, çilek, süs bitkileri vb.) bitkileridir. Günümüzde mikroçoğaltım tekniği, kısıtlı süre zarfında çok daha fazla sayıda bitki üretimini laboratuvar şartlarında gerçekleştirmeye, bu üretimin bir yıl boyunca devam ettirilmesine olanak tanıyan hastalıklardan arı bitkicikler oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (George ve Sherrington 1984).

Tarla bitkilerinden peyzaj ve ormancılığa pek çok alanda kullanılan bu teknik genellikle gelişimini tamamladıktan sonra toprağa aktarımın gerçekleşmesi şeklinde devam etmektedir adlandırılmaktadır (Hayashi ve Kozai 1987; Kozai 1991; Ziv 1992; Zobayed vd., 1999; Seon vd., 2000).

Mikroçoğaltım teknikleri sınırlı sayıdaki halihazırda meyve bahçeleri üzerine uygulandığında hızla çoğaltım sağlanabilir. Bu sayede turunil kaynaklarının da çoğaltılması için hızlı ve uygun maliyetli *in vitro* protokoller bu açıdan ilgi görmektedir. Çünkü bu teknikle istenilen özellikte tek tip bitki materyali üretimi sağlanmış olur (Carimi ve De Pasquale 2003).

Turunil mikroçoğaltımı ile ilgili mevcut verilerin normalde sadece deneysel koşullara atıfta bulunulmuştur. *In vitro* narenciye büyümesi üzerinde genotip, kùltür

ortamı bileşimi, eksplant tipi ve yaşının güçlü bir etkiye sahiptir. Mikroçoğaltılmış turunçgil bitkileri alanındaki gelişmelere ilişkin araştırmalar yetersizdir.

Turunçgil dokusu kullanımının faydalarının kritik bir ekonomik analizi literatürde geleneksel çoğaltma sistemlerine karşı kültür mevcut değildir. *In vitro* köklenme sürecinin hesaba katıldığı tahmin edildiğinden toplam mikroçoğaltma maliyetinin yaklaşık %35 ila %75'i için (Preece ve Sutter, 1991), hem köklendirme hem de iklimlendirme için tek bir eşzamanlı adım kullanan sistemler tercih edilmelidir. Bu, böylece mikro çoğaltma maliyetlerini önemli ölçüde azaltacaktır (Carimi ve De Pasquale 2003).

### 1.2.2. Somaklonal varyasyonlar

Her ne kadar bitki ıslah teknikleri, çeşitli bitki türlerinin *in vitro* kolanal çoğaltımı açısından oldukça yararlı uygulamalar olsa da, *in vitro* klonlar bazen bir takım **somaklonal varyasyonlar** gösterebilir. Üstün niteliklere ve değerli özelliklere sahip genotiplerin mikro çoğaltımı *in vitro* olarak yetiştirilen klonlar arasında yüksek derecede genetik stabiliteye gereksinim duymaktadır. Ekonomik açıdan değerli tıbbi ve aromatik bitki türlerinin klonlanması esnasında ortaya çıkabilen ve somaklonal varyasyonlar olarak adlandırılan genetik değişimler klonal çoğaltım ilkesi ile çelişmesi bakımından istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle mikro çoğaltımı gerçekleştirilen bitki türlerinin genetik stabilitesinin veya değişkenliğinin belirlenmesi oldukça önem arz eder (Ozudogru vd., 2011; Kaya ve Souza 2017). Mikroçoğaltım yoluyla bitki çoğaltma kısa sürede çok sayıda bitkicik üretme potansiyeli de dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir. Bununla birlikte mikroçoğaltımın en başta ortaya çıkan bitkilerin genetik kararsızlığı olmak üzere çeşitli dezavantajları vardır. Turunçgillerde somaklonal varyasyonun ekonomik etkisi uzun yaşam döngülerine sahip oldukları için yüksek olabilir. Birçok turunçgil türü toprağa nakledildikten 2-3 yıl sonra meyve verir ve meyvelerin morfolojik özellikleri üzerindeki somaklonal varyasyonun araştırılması uzun zaman alır ve oldukça maliyetli hale gelir (Carimi ve De Pasquale 2003).

### **1.3. Genetik Kararlılık Tespitinde Kullanılan Markör (Belirteç) Sistemleri**

Bitkiler arasındaki genetik çeşitliliği ya da kararlılığı ortaya koymak amacıyla kullanılan çeşitli marker (belirteç) sistemleri bulunmaktadır. Bunlar temelde morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve DNA markörleri olmak üzere üç farklı çeşite ayrılarak incelenir (Törün 2013).

#### **1.3.1. Morfolojik markörler**

Fiziksel özellikler göz önünde bulundurularak oluşturulan ve uygulanan markör sistemleridir. Herhangi bir popülasyondaki bireylerin ya da toplulukların diğerlerinden farklı olan özellikleri belirteç olarak kullanılmakta bu sayede genetik çeşitlilik ortaya konulabilmektedir. Tür içi ya da türler arası karşılaştırma olasılığı yüksek olduğundan diğer tekniklere kıyasla daha kısıtlıdır (Törün 2013).

#### **1.3.2. Biyokimyasal markörler**

Sekonder metabolitler, tohum depo proteinleri ve izozimlerden yararlanılarak gerçekleştirilen bu markör sistemleri popülasyon yapısını maliyetçe daha uygun bir şekilde ortaya koyar. Kullanılan biyokimyasal belirteç popülasyon türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin türler arası ayırma yaygın olarak kullanılan izozimler yakın akraba olan türler arasında çok kullanılmaz (Törün 2013).

#### **1.3.2. DNA markörleri**

Moleküler markörler olarak da bilinen DNA markörleri bir genomda herhangi bir gen bölgesini veya bu gen bölgesi ile ilişkili bir DNA parçası olduğundan bu şekilde adlandırılır. DNA markörlerinin yaygın kullanım alanları şöyle sıralanabilir:

- Gen haritalamaları
- Kültür bitkilerinin belirlenmesinde
- Genetik yakınlık uzaklık ilişkisinin ortaya konulmasında
- Genetik kararlılığın belirlenmesinde
- Tohumların saflık analizinde

- Organizmanın karşılaştığı stres sonrası genetik yapıda meydana gelen değişimlerin ortaya konmasında
- İslah teknikleri uygulanacağı zaman ebeveynlerin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yorgancılar vd., 2015).

Yukarıda belirtilen tüm bu alanlarda yaygın olarak kullanılmasının en temel nedeni diğer belirteç sistemlerine göre daha kesin ve hızlı sonuç vermeleridir (Genişel 2013). Bitkiler arasındaki genetik çeşitliliği ya da kararlılığı ortaya koymak amacıyla kullanılan çeşitli moleküler marker yöntemleri bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) teknikleri verilebilir. Bu tekniklerden SSR ve AFLP polimorfizm yönünden, RAPD ve ISSR maliyet yönünden, RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA teknikleri ise tekrarlanabilirlik yönünden oldukça avantajlı iken RAPD ve ISSR tekniklerinin radyoaktif madde gerektirmemesi ve sınırlı laboratuvar koşullarında da kolaylıkla kullanılabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu 2012).

Moleküler markörlerin kullanım alanına göre temelde birtakım özellikleri bulundurmaları gerekmektedir. Bu özellikler aşağıda belirtildiği gibi sıralanabilir:

- Farklı genotipleri belirleme ve polimorfizmi yüksek oranda ortaya koyabilmelidir.
- Gözlemlenebilirliği tüm doku çeşitlerinde olmalıdır.
- Genomda sıklıkla bulunmalıdır.
- Seçici özellik göstermelidirler.
- Tekrarlanabilir olmalıdırlar.
- Genomda dağılımları düzgün olmalıdır.
- Erişilebilir, maliyet bakımından uygun olmalıdırlar.
- Uygulandığı DNA materyeli ile verdiği sonuçlar her zaman aynı olmalıdır (Yorgancılar vd., 2015).

DNA belirteçleri hibridizasyona dayalı belirteçler ve PCR'a dayalı belirteçler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Genişel 2013).

#### *1.1.1.1 Hibridizasyona dayalı belirteçler*

**RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism), bu teknikte DNA'nın restriksiyon enzimleri vasıtasıyla kesilmesi sonucu oluşan parçaların elektroforetik yöntemlerle ayrılması ve ardından nitroselüloz bir membrana aktarılması esas alınır. İşaretleli problemler kullanılarak sonuç alınan bu yöntem kodominant ve polimorfizmi orta derecede de olsa ortaya çıkarması bakımından güvenilir olarak kabul edilmektedir (Törün 2013).

#### *1.1.1.2 PCR'a dayalı belirteçler*

**RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), dizi bilgisine ihtiyaç duyulmaması bakımından kolay, hızlı ve yaygın bir tekniktir. Kullanılan polimeraz enzimi 2000 bp 'den kısa uzunlukta daha aktif çalıştığından daha büyük uzunluklarda aktivitesi düşer. Çok miktarda DNA kullanımına gerek kalmaksızın, kısa primerler sayesinde genomda rastgele bölgeler çoğaltılarak hızlı sonuç almak mümkündür (Hilooğlu 2012).

**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), PCR temelli bu yöntemde nükleotid dizisi hakkında bilgi gerekmeksizin polimorfizm belirlenebilmektedir. Spesifik kesim enzimleri kullanılarak parçalara ayrılan DNA fragmentlerinin yine spesifik primerler ile PCR'da çoğaltılır. Poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünleri radyoaktif madde veya floresans boyama sayesinde ışığa verir ve polimorfizm ortaya konulur. Üç basamaktan oluşur: DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve oligonükleotidlerin bağlanması, kesilen parçaların PCR ile çoğaltımı ve fragmentlerin jel analizi (Vos vd., 1995; Mikkonen vd., 2005).

**SSR** (Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit), genomda bulunan mikrosatellit adı verilen uzunluğu 2 ile 6 arasında değişen tekrarlı nükleotid dizilimlerinin iki yanına bağlanan primerler ile PCR'da çoğaltılması prensibine dayanır. Agaroz jel veya poliakrilamid jelde yürütülerek parçaların büyüklüklerine göre ayrımı sağlanır.

**SRAP** (Sequence-Related Amplified Polymorphism- Dizi ile İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm) markörleridir, açık okuma bölgelerini (ORF) amplifiye etmeye dayanan PCR temelli markör sistemleridir. Yaklaşık 1 nükleotidden oluşan ileri ve yaklaşık 18 nükleotidden oluşan geri primerleri bulunur ve ileri primerler için CCGG, geri primerler için AATT dizisi gelerek dizi bu şekilde devam eder. Verimlilik seviyesi orta derecede olmasına rağmen basit, güvenilir ve otomasyonu yüksek olduğundan DNA parmak izi, gen işaretleme çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Li ve Quiros 2001; Filiz ve Koç 2011; Hilooğlu 2012).

### **ISSR (Inter Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler)**

Ökaryotik genomlarda bulunan 2 ile 6 arasında değişen ve tekrar eden nükleotid dizileri bulunmaktadır. Bu diziler mikrosatelit olarak da adlandırılmaktadırlar ve genomdaki rastgele dağılımları esas alınarak geliştirilen bu teknikte RAPD yöntemi ile benzer fakat RAPD'e göre tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti daha fazladır (Zietkiewicz vd., 1994; Gupta vd., 1994; Yorgancılar vd., 2015).

ISSR yöntemi diğer moleküler markör teknikleri gibi bir çok alanda kullanılırken sıklıkla kullanım alanları:

- Genetik kararlılığın/çeşitliliğin ortaya koyulması,
- filogenetik ağaçlandırma çalışmaları,
- DNA parmakizi uygulamaları,
- genom haritalamalar
- evrimsel kökenin incelenmesi/araştırılmasıdır.

ISSR tekniğinin oldukça yaygın kullanılmasını sağlayan özellikleri/avantajları şu sebeplerden dolayıdır:

- PCR ile uygulandığından az miktarda örnek ile de sonuç alınabilmektedir.
- Allel varyasyonları yüksek seviyededir.
- Kodominant özellik taşımaları sayesinde maliyetleri oldukça düşüktür.
- Tür içinde kullanılan primerlerin yakın akraba türlerde de amplifiye olduğu tespit edilmiştir.
- Uygulaması hızlıdır.

Yukarıda sıralanmış olan PCR temelli belirteçlerin polimorfizm, dominantlık, verimlilik, otomasyon ve maliyet karşılaştırmaları Çizelge 1.6.'da gösterilmiştir (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu 2012).

Çizelge1.6. PCR temelli moleküler tekniklerin karşılaştırılması (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu 2012).

Teknik	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
<b>RAPD</b>	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
<b>AFLP</b>	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
<b>SSR</b>	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
<b>ISSR</b>	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
<b>SRAP</b>	Yüksek	Kodominant	Orta	Orta/Yüksek	Düşük

*In vitro* kültür ile ilişkili önemli bir problem, bitki hücreleri, dokuları veya organlarının *in vitro* kültürünün doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkan, bir ebeveyn soyun alt kültürlenmesi sonucu elde edilen klonları arasında somaklonal varyasyonun ortaya çıkmasıdır (Larkin ve Scowcroft 1981; Gould 1986; Martins vd., 2004). Moleküler teknikler şu anda *in vitro* çoğaltılmış bitkilerin genetik uygunluğunun analizinde kullanılan güçlü ve değerli araçlardır ve birçok yayın ve incelemenin konusudur (Hilooğlu 2012).

**Bu çalışmanın amacı**, tohumdan *in vitro*'ya alınan şeker portakalının bir yıl boyunca düzenli olarak her ay gerçekleştirilen alt kültürleme işlemi ile mikroçoğaltımı sonucu oluşan klonlar arasındaki somaklonal varyasyon indüksiyonunu değerlendirmektir. Turunçgillerin uzun bir nesil döngüsüne sahip olması nedeniyle, olası varyasyonlar yalnızca geç gelişim aşamalarında hatta yavrularda tespit edilebilir. Sonuç olarak, somaklonal varyasyonun erken tespiti büyük önem taşıyan bir konu haline gelir. Bu çalışma için üç tohumdan geliştirilen her biri on iki ay boyunca alt kültürlenen toplam 36 klon seçildi ve basit tekrarlı diziler arası polimorfizm moleküler yöntemi (ISSR) ile test edildi.

## 2. MATERYAL VE METOT

Söz konusu tez çalışmasında gerçekleştirilen laboratuvar uygulamaları mikroçoğaltım uygulamaları ve mikroçoğaltımı gerçekleştirilen şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) bitkisinde genetik kararlılığın belirlenmesi olmak üzere iki temel aşamada gerçekleştirilmiştir.

### 2.1. Mikroçoğaltım Uygulamaları

Mikroçoğaltım uygulamaları; bitki materyalinin eldesi, bitki materyalinin sterilizasyonu ve *in vitro* ortama alınması sürgün çoğaltma aşaması olmak üzere 3 temel adımda gerçekleştirilmiştir.

#### 2.1.1. Bitki materyalinin eldesi

Mevcut tez çalışmasında kullanılan yaygın turuncgil türü olan Şeker Portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Muğla Büyükşehir Belediyesi Yerel Tohum Merkezi'nden elde edilmiştir.

#### 2.1.2. Bitki materyalinin sterilizasyonu ve *in vitro* ortama alınması

Yetiştirildiği doğal ortamdan direkt alındığı için toplanan bitki materyalleri üzerinde çok sayıda mikroorganizma bulundurmaktadır ve bu şekilde doğrudan kullanımı gerçekleştirilirse istenilen steril çoğaltım aşamalarına geçiş mümkün olmamaktadır. Bu nedenle kullanılacak olan bitki materyalinin dış kabuğundan başlanarak tohum yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak şeker portakalı bitkisinin dış kabukları bir fırça ve ticari ağartıcı içeren çamaşır suyu ile temizlenip durulandıktan sonra vakit kaybetmeden steril kabine alınmıştır (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1. Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) tohumlarının ön sterilizasyon aşamaları**

Yine çok fazla zaman kaybetmeksizin meyve kabukları el değmeden sterilizasyon araçları kullanılarak (penset, büstri vb. ) soyulmuş ve kabinden uzaklaştırılmıştır. Bitki materyalini *in vitro* koşullara aktarmak amacı ile uygulanan yüzey sterilizasyonu sırasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1. Bitki materyalinin yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasal maddeler**

Kimyasal adı	Firma adı	Katalog numarası
Etil alkol (%96)	Merck	1590102500
Hidrojen peroksit	Merck	1072092500
Ticari ağartıcı	Unilever	-

Kabukları soyulan portakallardan çıkarılan tohumlar kabin içerisinde aşağıda sırası verilen sterilizasyon basamaklarından geçirilmiştir:

- %70'lik EtOH çözeltisi ile 5 dakika,
- %10'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile 10 dakika,
- %10'luk ticari ağartıcı (NaOCl (Sodyum Hipoklorit) %4,28) ile 10 dakika

Yukarıda verilen sterilizasyon aşamalarının her birinden sonra sıradaki aşamaya geçmeden tohumlar steril edilmiş distile su ile durulanmıştır (Şekil 2.2.). Son durulama adımının ardından tohumlar steril filtre kağıdı üzerine alınarak kabin içerisinde bir süre kurumları sağlanmıştır.



**Şekil 2.2. Şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) tohumlarının steril kabinde %70'lik EtOH , %10'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ve %10'luk ticari ağartıcı ile muamlesi**

Elde edilen materyal *in vitro* çoğaltım yöntemleri ile çoğaltılarak çalışmada kullanılacak eksplant sağlanacaktır.

Kuruyan tohumlar daha öncesinde laboratuvarında optimizasyonu sağlanmış, pH değeri 5.8 olan ve 20 gL<sup>-1</sup> sükroz, 7 gL<sup>-1</sup> agar, 1 mgL<sup>-1</sup> BA içeren yarı-katı MS besiyeri (Murashige ve Skoog 1962) ortama alındıktan sonra, 27±2 °C sıcaklık, 16/8 saatlik fotoperiyot ve 50 µmol-1m-2s-1 beyaz gün ışığı floresan ile aydınlatılan ortam koşullarında çimlenmek üzere kültüre alınmıştır (Şekil 2.3.). Bitki materyalinde çıkarılan tohumları çimlendirilmesinde ve bitkiciklerin mikro çoğaltımı sırasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2'de, madde miktarları Çizelge 2.3.'te, ve MS besiyeri içeriği Çizelge 2.4.'te gösterilmektedir.

**Çizelge 2.2. Bitki materyalinin mikro çoğaltımı sırasında kullanılan kimyasal maddeler**

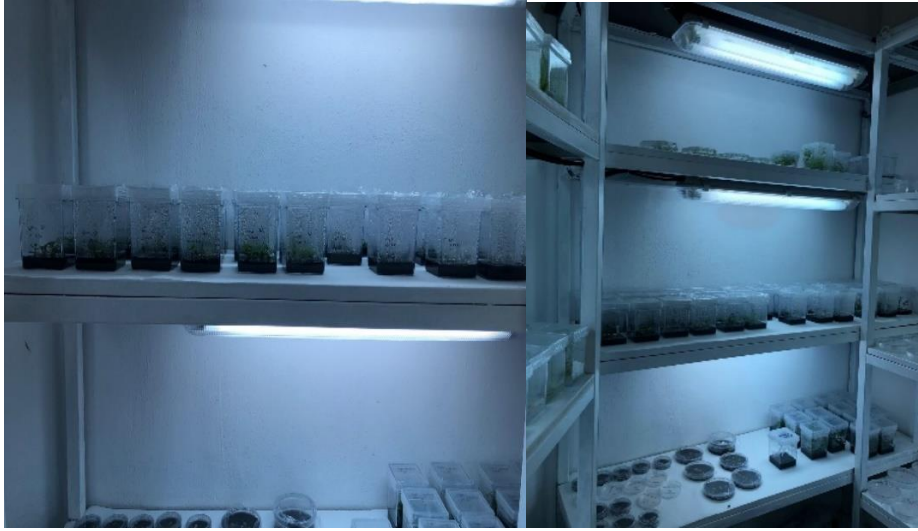
Kimyasal adı	Firma adı	Katalog numarası
<b>Murashige Skoog Medium</b>	Duchefa Biochimie	M0222.0050
<b>Sükroz</b>	Duchefa Biochemie	S0809.5000
<b>BA (Benzil Adenin)</b>	Duchefa Biochemie	B0904.0001
<b>Agar</b>	Sigma	A7921

**Çizelge 2.3. Besin ortamlarında kullanılan maddeler ve miktarları**

Kullanılan besin ortamları	Madde miktarı		
	MS	4,3 g/L	4,1 g/L
Sükroz	20 g/L		
BA (Benzil Adenin)	1 mg/L		
Agar	7 g/L		

**Çizelge 2.4. MS besi ortamının içeriği**

	Kimyasal Adı	Derişim (mg/L)	Derişim (µM)
MAKRO ELEMENTLER	CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25
	KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79
	MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61
MİKRO ELEMENTLER	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10
	FeNaEDTA	36,70	100,00
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,27
	KI	0,83	5,00
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,90	100,00
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91
VİTAMİMLER	Glisin	2,00	26,64
	myo-inositol	100,00	554,94
	Nikotinik Asit	5,00	40,62
	Pirodiksini HCl	0,50	2,43
	Tiamin HCl	0,10	0,30



**Şekil 2.3. İklimlendirme Odası**

### **2.1.3. Sürgün çoğaltma aşaması**

Çimlenen tohumlar yeterli uzunluğa geldiklerinde steril kabin içerisinde nodal segmentleri alınarak alt kültürle işleme uygulanmış ve mikroçoğaltımı bu şekilde gerçekleştirilen 30 günlük periyotlarla sağlanmıştır.

## **2.2. Mikroçoğaltımı Gerçekleştirilen Şeker Portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Bitkilerinde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi**

Mikroçoğaltımı gerçekleştirilen şeker portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)'nın genetik kararlılığını tespit etmek için gerçekleştirilen moleküler analizler sırasıyla; genomik DNA ekstraksiyonu, spektrofotometrik analizler, ISSR PCR ve jel elektroforezi analizleri, verilerin değerlendirilmesi şeklindedir.

### 2.2.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu Soltis Lab DNA ekstraksiyon protokolüne göre optimize edilerek aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle 1987; Cullings 1992). 30 günlük periyotlar halinde yapılan tüm alt kültür işlemleri esnasında ayrılmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiş her bir klona ait örnekler sterilize edilmiş havanlar içerisine alınmıştır. Örneklerin mekanik parçalanması amacı ile turunçgil örneğinin bulunduğu havan içerisine yaklaşık 5 ml kadar sıvı azot eklenmiştir. Örnekler hızlı bir biçimde ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler havandan spatül yardımı ile 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınmış ve 0,03 gram olacak şekilde tartılmıştır. Tartılan örneklerin üzerine 60 °C'de su banyosunda ısıtılmış 700 µl CTAB buffer eklenmiştir ve yaklaşık 10-20 saniye vortekslenmiştir. Vortekslenen örnekler 60°C'de bir saat su banyosu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir vorteksleme işlemi tekrarlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda eppendorf tüplere 500 µl 24:1 kloroform-izoamil alkol eklenmiş tüpler vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, tüplerin süpernatant kısmı alınmış (yaklaşık 300-350 µl) yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Yeni eppendorf tüplere alınan süpernatant miktarının 0,08 katı 7,5 M amonyum asetat ve 0,54 katı izopropanol eklenmiştir. Tüpler tüplükte yaklaşık iki dakika aşağı yukarı çevrilerek karıştırılmıştır. İnkübasyon için buzdolabında +4 °C'de 15-30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve tüpler pellet düşürülmeden yavaşça boşaltılmıştır. Tüplere 700 µl soğuk %70 soğuk etanol eklenmiş ve iki dakika elde karıştırılmıştır. Daha sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpler yavaşça boşaltılarak ters çevrilmiş ve 55 °C'de etüvde 1 saat kuruması beklenmiştir. Kurutulan örnekler 100 µl TE tamponda çözülmüştür. Üzerine 1 µl RNAaz eklenerek 1 saat etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere 400 µl 24:1 kloroform izoamil alkol eklenerek 10 dakika elle karıştırılmış ve oluşan fazlar gözlenmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak süpernatant yeni tüplere alınmıştır. Alınan miktarın iki katı kadar %96'lık soğuk etil alkol eklenerek tüpler yavaşça karıştırılmıştır. Tüpler inkübasyon için +4 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmış ve santrifüj sonrası pellet kaybedilmeden tüpler boşaltılmıştır. Tüplerin üzerine 700 µl %70'lik soğuk etil alkol eklenerek karıştırılmıştır. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek pellet düşürülmeden

süpernatant yavaşça boşaltılmıştır. Tüpler ters çevirilmiş ve 55 °C’de etüvde 1 saat kuruması beklenmiştir. Kuruyan örnekler 100 µl TE tamponda çözülerek 15 dakika 55 °C’de etüvde inkübe edilmiş daha sonra muhafaza edilmek üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır. DNA ekstraksiyonunda kullanılan CTAB solüsyonu Çizelge 2.1.’de ve Çizelge 2.2.’de belirtilen oranlarda bileşenler kullanılarak hazırlanmıştır, DNA izolasyonu için kullanılan bileşenlerin (PVP ve β- merkaptotanol) uygulamadan önceki karışım oranları ise Çizelge 2.3.’de verildiği gibidir.

**Çizelge 2.5. DNA ekstraksiyonu için kullanılan CTAB solüsyonunun hazırlanması**

<b>1 M Tris, Ph:8</b>	<b>100 ml</b>
<b>5 M NaCl</b>	280 ml
<b>0,5 M EDTA</b>	40 ml
<b>CTAB</b>	20 gram
<b>1 litreye tamamlanır</b>	

**Çizelge 2.6. CTAB solüsyon bileşenlerinin hazırlanması**

1 M Tris, Ph:8		5 M NaCl		0,5 M EDTA	
<b>Tris</b>	121,1 gram	<b>NaCl</b>	292,2 gram	<b>EDTA</b>	186,12 gram
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	700 ml	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	700 ml	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	750 ml
<b>700 ml’de çözülür ve 900 ml’ye tamamlanır.</b>		700 ml’de çözülür.		20 gram NaOH tabletleri eklenir.	
<b>Ph: 8’e ayarlanır.</b>				Ph: 8’e ayarlanır.	
<b>1 litreye tamamlanır.</b>		1 litreye tamamlanır.		1 litreye tamamlanır.	

**Çizelge 2.7. DNA izolasyonu için kullanılan bileşenlerin uygulamadan önceki karışım oranları**

CTAB	PVP	β- merkaptotanol
<b>0,5 ml</b>	0,02 gram	2,5 µl
<b>5 ml</b>	0,2 gram	25 µl
<b>20 ml</b>	0,8 gram	100

### 2.2.2. Spektrofotometrik analizler

İzolasyon sonucunda elde edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenip buna göre moleküler analizlerde kalıp DNA olarak kullanılmak üzere uygun derişimlerde sulandırılmıştır (Doyle ve Doyle 1987).

### 2.2.3. ISSR PCR ve jel elektroforezi analizleri

Genomik DNA'sı özütlenen Şeker Portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) bitkisine ait farklı bireyler, farklı 10 ISSR primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR döngüleri, kullanılacak primerlere bağlı olarak optimize edilmiştir (Çizelge 2.4.). PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri Çizelge 2.5.'te gösterildiği gibi olup toplam reaksiyon hacmi 25µl olarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir.

Çizelge 2.8. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolü (Williams vd., 1990; Martins-Lopes vd., 2009)

Basamak Adı	Sıcaklık (°C)	Süre (Dak.)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	3	1X
Denatürasyon	95	1	35X
Bağlanma	55	1	
Uzama	68	1	
Son Uzama	72	6	1X

**Çizelge 2.9. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri (Kalendar vd., 2011; Smýkal vd., 2011)**

Bileşen	Reaksiyon Derişimi
<b>10X PCR Tamponu</b>	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2,5 mM
<b>dNTP</b>	0,4 mM
<b>Primer</b>	1 µM (40 ng)
<b>Genomik DNA</b>	50 ng
<b>TaqPolimeraz</b>	2 unite
<b>Toplam Hacim</b>	25µl

**Çizelge 2.10. Martin-Lopez ve arkadaşları (Martins-Lopes vd., 2009) tarafından geliştirilmiş ISSR primerlerden proje çalışması için seçilen primerler ve dizileri.**

Primer İsmi	Dizi	Gen Bank Giriş No
<b>ISSR 1</b>	(AG)8T	UBC 807
<b>ISSR 5</b>	(AG)8G	UBC 809
<b>ISSR 7</b>	(GA)8T	UBC 810
<b>ISSR 10</b>	(GA)8C	UBC 811
<b>ISSR 825</b>	(CA)8A	UBC 817
<b>ISSR 826</b>	(TC)8C	UBC 823
<b>ISSR 864</b>	(AC)8C	UBC 826
<b>ISSR873</b>	(AG)8CTT	UBC 846
<b>ISSR 3A53</b>	(CA)8AGT	UBC 855
<b>ISSR E.D.4</b>	(GT)8CTA	UBC 856

## 2.2.4. Elektroforez aşaması

### 2.2.4.1. Agaroz jel hazırlanışı

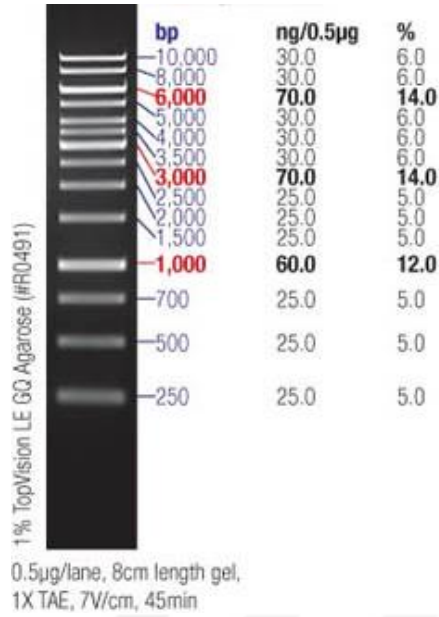
PCR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini öğrenmek amacıyla PCR ürünleri, SimpliAmp™ Thermal Cycler (Cat No. A24811) cihazıyla, %1,5'lik agaroz jelde, 100 V sabit akımda 180 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel %1'lik TAE Buffer ile hazırlanmıştır. 50X TAE buffer Çizelge 2.7.'de verilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.11. 1 litre 50 X TAE solüsyon buffer hazırlanışı

1 L, 50X TAE Buffer
242 g Tris base
57.1 g Glacial asetic acid
100 ml 0.5 M EDTA solution (pH 8.0)
800 ml ddH <sub>2</sub> O içerisinde çözdürülür
pH=8'e ayarlanır
H <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamla

### 2.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi ile yürütülen örnekler jel görüntüleme cihazı (Major Science, UVCI-1100) yardımıyla görüntülenmiştir. ISSR primerleri ile çoğaltılan DNA dizilerinin oluşturduğu bant profilleri incelenirken Şekil 2.4.'te gösterilen Thermo Fisher Scientific 1 kb DNA Ladder'i rehber olarak kullanılmış ve bant var ise "1", yok ise "0" rakamı verilerek kodlanmış, elde edilen veriler Microsoft® Office Excel programına işlenmiştir.



Şekil 2.4. Thermo Fisher Scientific 1 kb DNA Ladder

Microsoft® Office Excel programına işlenen verilerin POPGENE Version 1.32, GenAlex ver. 6.05 programları kullanılarak analiz işlemi gerçekleştirilmiştir (Yeh vd., 1999; Peakall ve Smouse 2006). Analiz sonuçları değerlendirilirken klonlar ve yapılan 1.-12. aylar arası varyasyonun değerlendirilmesinde bazı parametreler kullanılmıştır:

ISSR analizleri sonucunda genetik kararlılık veya farklılıkların belirlenmesinde, örnekler arasındaki benzerlikleri hesaplamak için jel görüntüleri, Sokal ve Sneath (1963) tarafından geliştirilen “Benzerlik Oranı” formülü kullanılarak analiz edilecektir (Sokal ve Sneath 1963).

Benzerlik Oranı = Homolog bantlar/ (Homolog bantlar +Homolog olmayan bantlar)

### 2.3. Doğadan Alınıp *in vitro* Ortamda Çoğaltılan Bitkilerin İklimlendirme Yöntemi ile Tekrar Doğaya Adaptasyonu

Tohum gelişimi birinci ay olmak üzere düzenli aralılarla alt kültürü yapılan *Citrus sinensis* örnekleri ile 12 aylık periyot tamamlandıktan sonra bitkilerin doğal ortama adaptasyonunu sağlamak için yapılan iklimlendirme işleminde kullanılacak toprak materyali (içeriği %70 torf ve %30 perlit olmak üzere) otoklav işlemi ile mikroorganizmalardan arındırılmıştır. Daha sonra besi yerinde köklenmiş olan bitkiler dikkatli bir şekilde zarar vermeden besiyerinden çıkarılır ve otoklavlanmış toprak içeren şeffaf plastik kutulara dikim yapıp ardından yapraklara zarar vermeyecek şekilde üstü başka bir şeffaf plastik kutu ile kapatılarak doğrudan çevre ile temas edip zarar görmesi engellenmiştir. Belirli aralıklarla bu şeffaf kutuya delikler açılarak yavaş yavaş doğaya adaptasyonu sağlanmıştır. Son olarak üstü tamamen açılarak doğal şartlara uyumu gözlenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analizler

DNA izolasyonunun ardından elde edilen örneklerin miktar tayini Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer from Thermo Fisher Scientific (51119300) spektrofotometre cihazıyla gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. İzole edilen DNA örneklerinin miktar tayini için gerçekleştirilen spektrofotometrik analiz sonuçları

No	Örnek Adı	Nükleik Asit	
		Konsantrasyonu (ng/µl)	OD 260 / 280
1	C.S. 1-1	50.12	1.81
2	C.S. 1-2	53.23	1.82
3	C.S. 1-3	49.01	1.79
4	C.S. 1-4	56.72	1.84
5	C.S. 1-5	51.92	1.88
6	C.S. 1-6	61.32	1.86
7	C.S. 1-7	58.99	1.89
8	C.S. 1-8	54.56	1.90
9	C.S. 1-9	55.78	1.88
10	C.S. 1-10	56.12	1.86
11	C.S. 1-11	63.69	1.91
12	C.S. 1-12	49.92	1.89
13	C.S. 2-1	57.54	1.79
14	C.S. 2-2	62.58	1.82
15	C.S. 2-3	67.71	1.82
16	C.S. 2-4	68.21	1.87
17	C.S. 2-5	69.6	1.84
18	C.S. 2-6	68.66	1.88
19	C.S. 2-7	51.25	1.92
20	C.S. 2-8	56.96	1.93
21	C.S. 2-9	54.31	1.89
22	C.S. 2-10	63.45	1.87

23	C.S. 2-11	59.78	1.85
24	C.S. 2-12	52.12	1.88
25	C.S. 3-1	68.14	1.72
26	C.S. 3-2	66.25	1.80
27	C.S. 3-3	67.85	1.83
28	C.S. 3-4	68.72	1.87
29	C.S. 3-5	69.66	1.86
30	C.S. 3-6	68.22	1.89
31	C.S. 3-7	58.63	1.91
32	C.S. 3-8	78.88	1.88
33	C.S. 3-9	70.33	1.85
34	C.S. 3-10	59.78	1.90
35	C.S. 3-11	56.45	1.93
36	C.S. 3-12	58.37	1.88

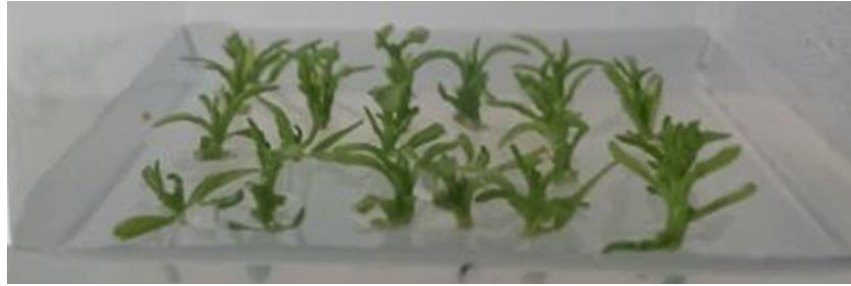
### 3.2. ISSR Primeri Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonrasında Elde Edilen Örneklerle Ait Jel Elektrofrez Sonuçları

Muğla iline ait yerel tohum merkezinden temin edilen şeker portakalı örneklerinden alınan ve 3 farklı tohumdan *in vitro* ortamda başarılı bir şekilde geliştirilen, ardından 12 ay boyunca düzenli aralıklarla alt kültürleme işlemi yapılarak mikroçoğaltımı sağlanan (Şekil 3.1.) bu esnada doku örnekleri alınan klonların her birine ait toplamda 36 farklı DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Başarılı bir şekilde izole edilen DNA'lar ve 10 farklı ISSR primeri kullanılarak gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonrasında elde edilen örnekler UV transilluminator jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

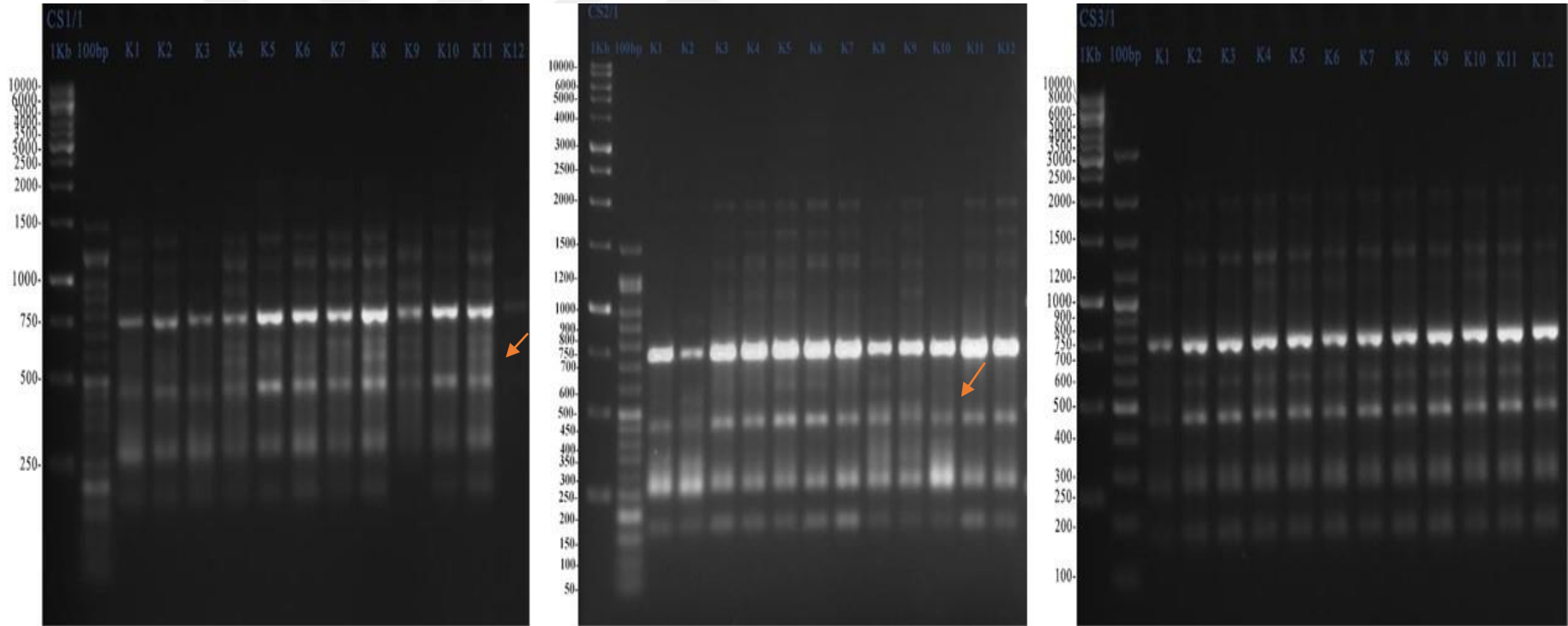
ISSR 1 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.2.'de, ISSR 5 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.3.'te, ISSR 7 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.4.'te, ISSR 10 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.5.'te, ISSR 825 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.6.'da, ISSR 826 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.7.'de, ISSR 864 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.8.'de, ISSR 873 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.9.'da, ISSR 3A53 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.10.'da, ISSR E.D.4 primeri ile elde edilen görüntüler Şekil 3.11'deki gibidir.

Genellikle monomorfik bantlardan oluşan jel görüntüleri üzerinde dikkat çeken bazı polimorfik bant oluşumları kırmızı oklarla gösterilmektedir.

UV transilluminator jel görüntüleme cihazındaki görüntüleme sonrası elde edilen görüntüler Thermo Fisher Scientific 1 kb DNA Ladder'i rehber olarak kullanılarak bant var ise "1", yok ise "0" rakamı verilmek suretiyle skorlanmıştır. Bunun sonucunda ISSR 1 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.1.'de, ISSR 5 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.2.'de, ISSR 7 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.3.'te, ISSR 10 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.4.'te, ISSR 825 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.5.'te, ISSR 826 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.6.'da, ISSR 864 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.7.'de, ISSR 873 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.8.'de, ISSR 3A53 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.9.'da, ISSR E.D. 4 primeri ile elde edilen skorlar Çizelge 3.10.'da gösterilmektedir. Her bir bireyin kendi içerisinde oluşturduğu 12 klonda sonradan oluşabilen bantlar (1'den 0'a) ya da kaybolan bantlar (0'dan 1'e) kırmızı renkle belirtilmiştir.



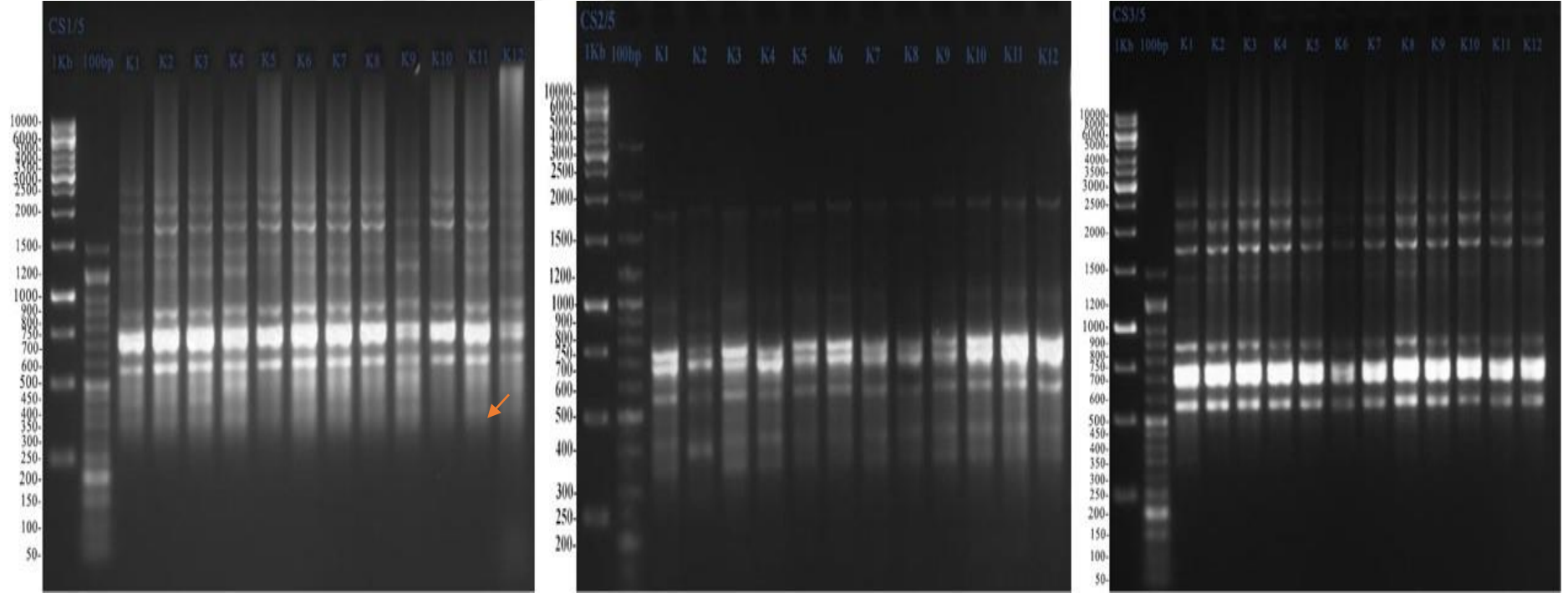
Şekil 3.1. 12 ay boyunca çoğaltılan bir *Citrus sinensis* bireyinden elde edilen klonlar



Şekil 3.2. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.2. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

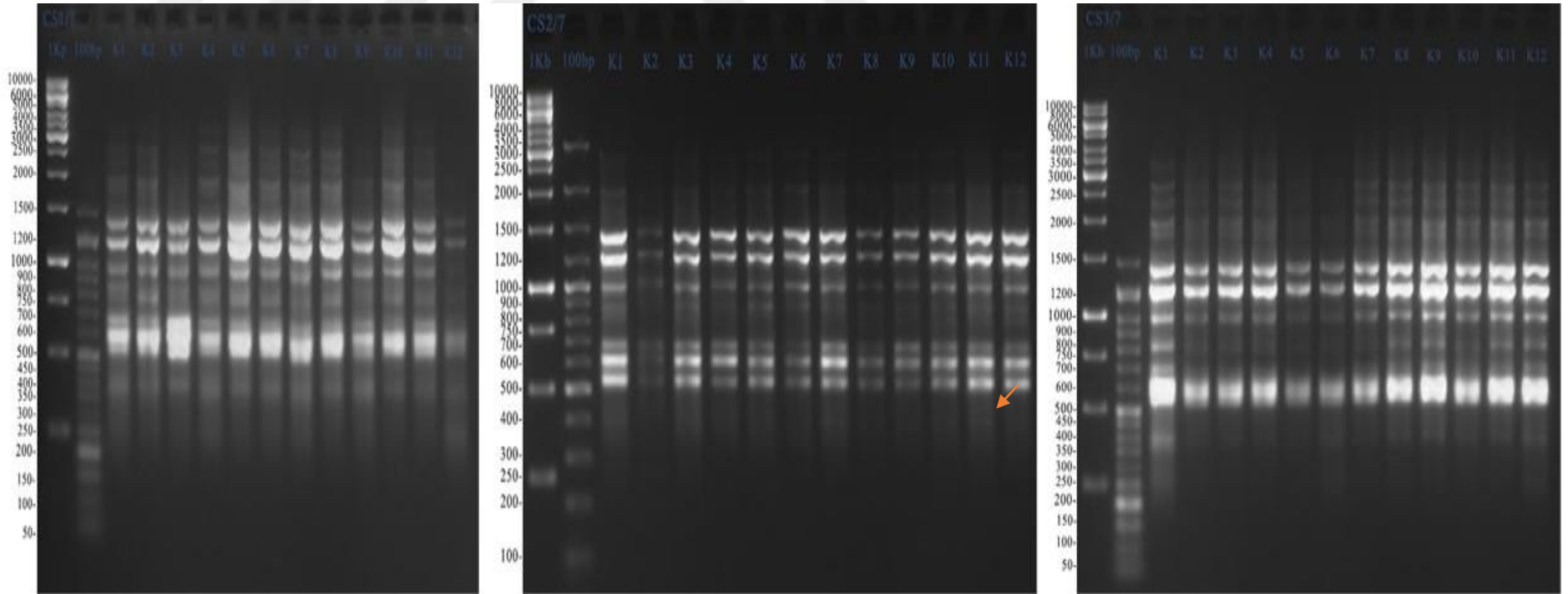
	1300	1000	900	750	600	550	450	275	175
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	2000	1300	1000	750	600	450	275	175	
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2000	1300	1100	750	600	450	275	175	
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	



Şekil 3.3. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 5 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.3. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 5 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

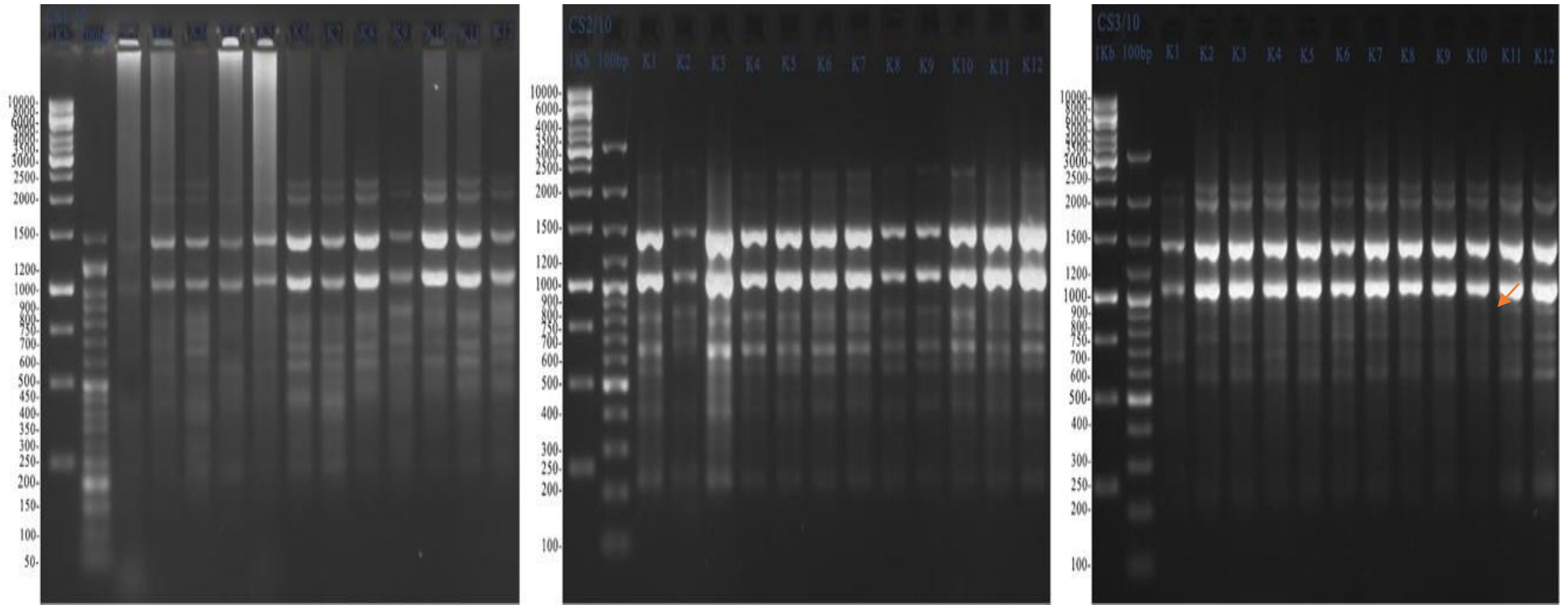
	2300	2000	1600	1400	1200	850	750	700	500	450	400
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1600	1000	750	700	500	400	350				
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1				
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1				
	2500	2000	1600	1500	1400	850	750	700	550		
CS3-K1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1		



Şekil 3.4. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.4. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

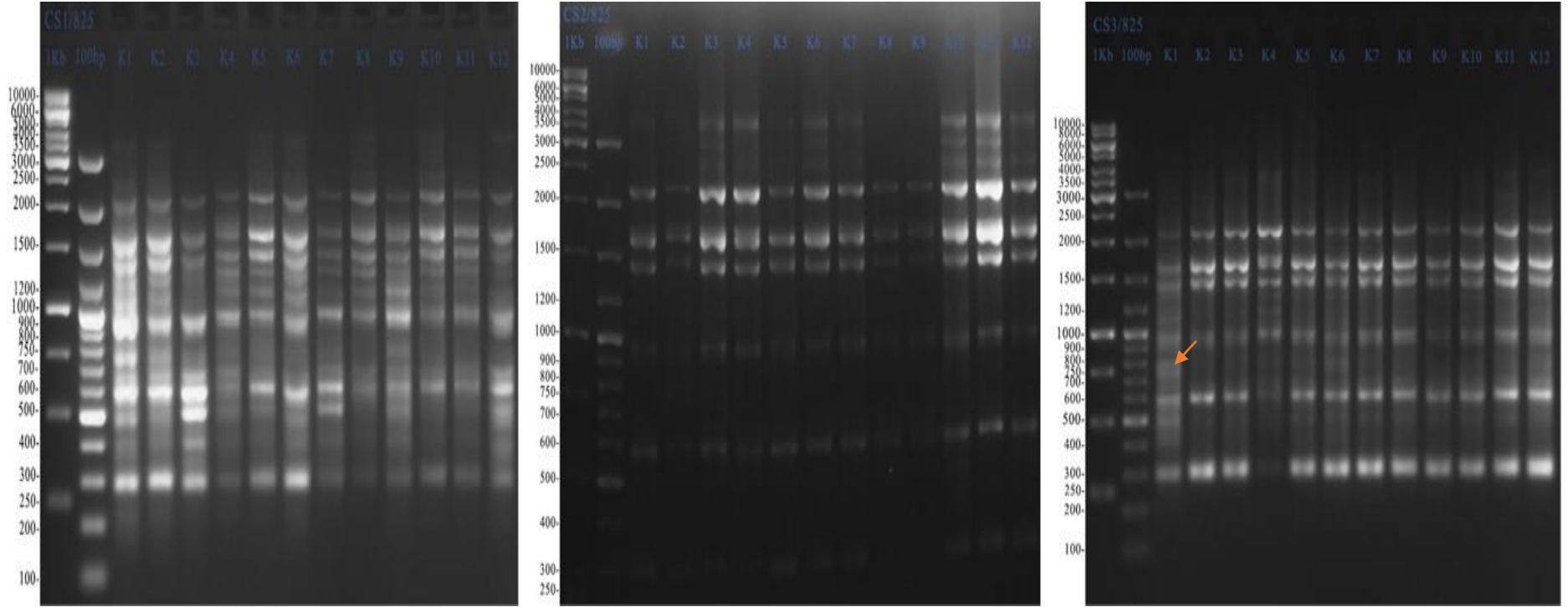
	2700	2100	2000	1300	1200	1000	800	700	600	500	400	250	
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2700	2000	1300	1200	1000	900	850	700	650	600	500	400	
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	3400	3000	2700	2000	1700	1500	1400	1200	1000	800	700	600	400
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.5. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 10 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.5. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 10 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

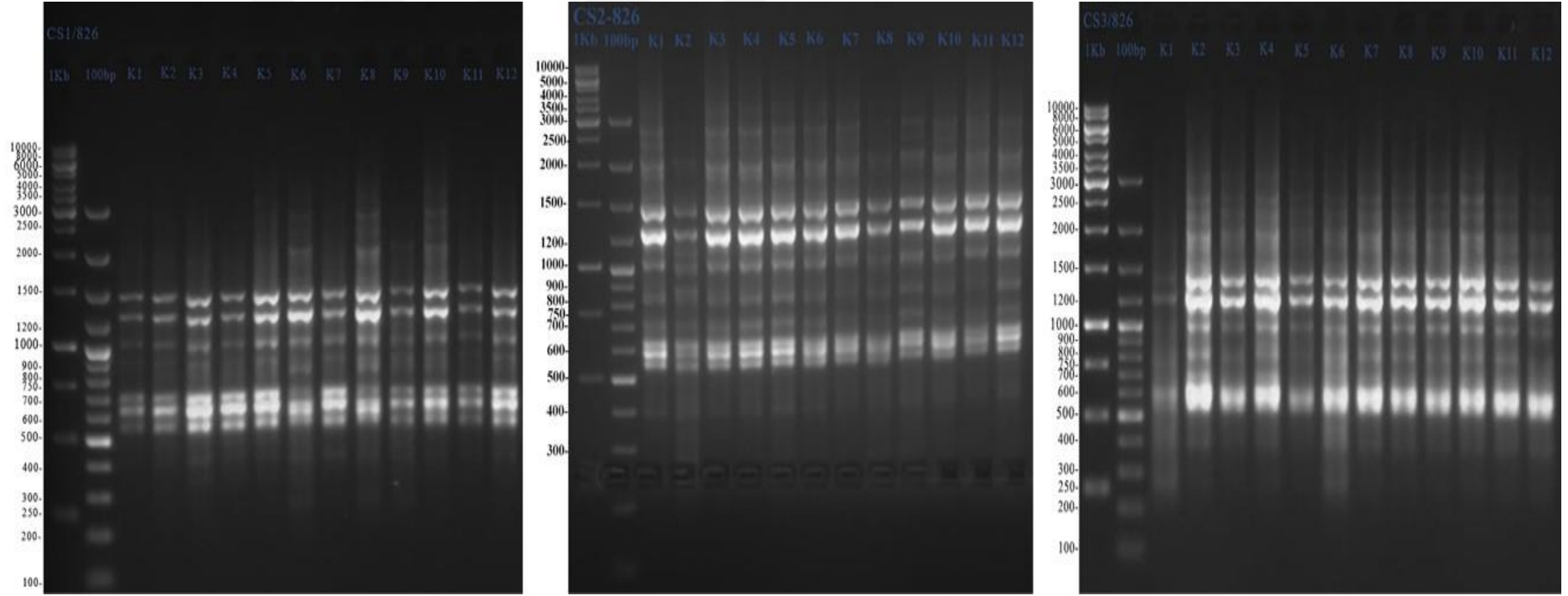
	2300	2000	1500	1000	800	700	600	500	450	250			
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	2300	2000	1600	1400	1000	800	700	650	550	500	400	225	
CS2-K1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K9	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2300	2000	1400	1000	900	850	650	550	250				
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CS3-K10	1	1	1	1	1	0	1	1	1				
CS3-K11	1	1	1	1	1	0	1	1	1				
CS3-K12	1	1	1	1	1	0	1	1	1				



Şekil 3.6. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 825 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

Çizelge 3.6. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 825 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları

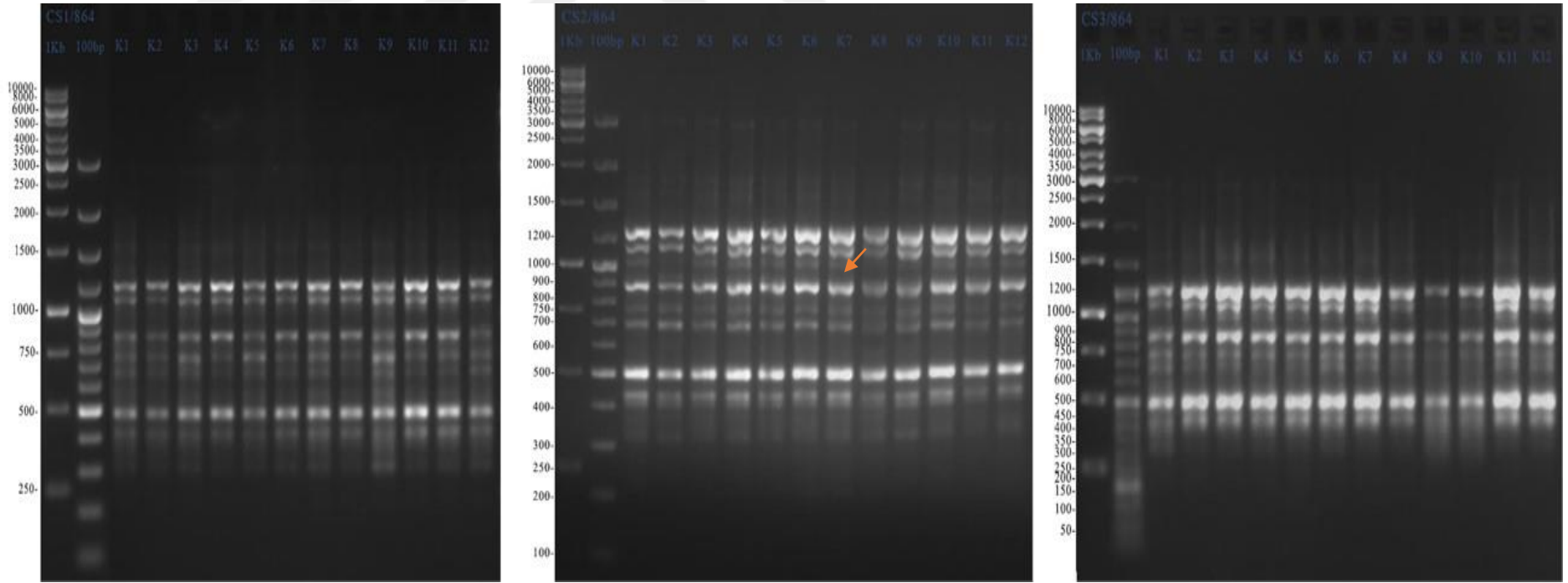
	2000	1500	1300	1200	1100	900	800	750	650	600	500	400	300
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	3500	3000	2500	2100	1600	1500	1400	1000	600	300			
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	2000	1600	1500	1000	750	600	500	300					
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1					
CS3-K2	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K3	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K4	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K5	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K6	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K7	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K8	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K9	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K10	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K11	1	1	1	1	0	1	1	1					
CS3-K12	1	1	1	1	0	1	1	1					



Şekil 3.7. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.7. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

	2750	2000	1500	1300	1000	900	800	700	650	550	400
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2750	2000	1800	1400	1200	1000	800	650	600	550	400
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2500	2250	1900	1400	1200	1000	800	600	550	450	400
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.8. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 864 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

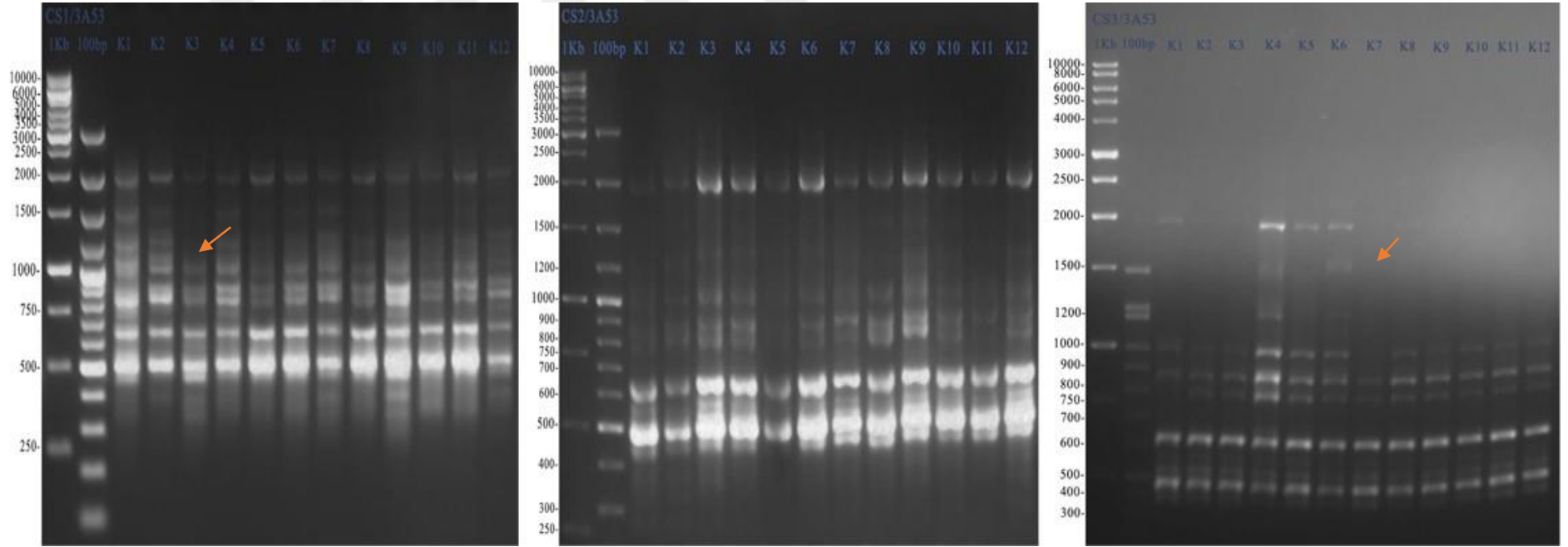
**Çizelge 3.8. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 864 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

	1500	1200	1100	900	750	650	500	450	300			
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS1-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3000	1700	1600	1200	1100	1000	900	850	750	700	500	450
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	3000	2000	1500	1200	1000	800	750	700	500	450	300	
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



**Çizelge 3.9. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 873 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

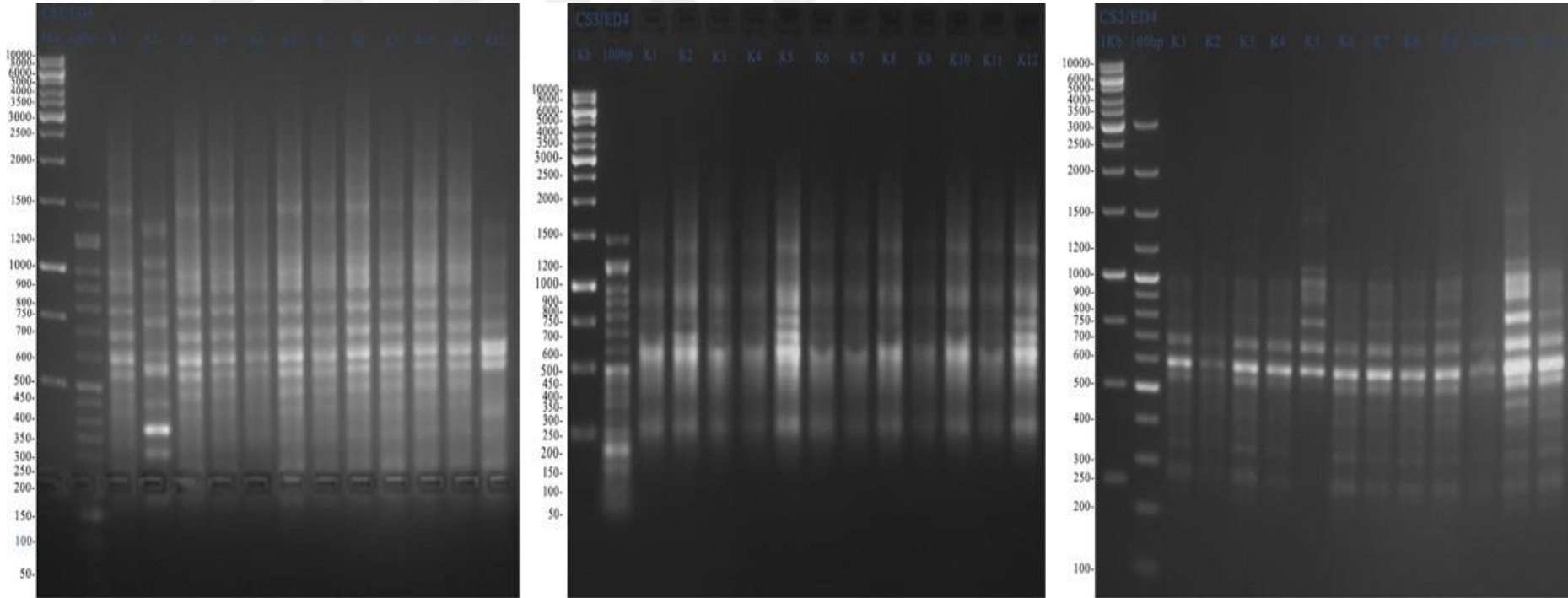
	2750	2500	1600	1300	1200	1000	850	750	600	450	350	
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS1-K12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2500	1750	1500	1400	1200	1100	850	800	700	550	400	
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
CS2-K12	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	
	2750	2500	1600	1500	1300	1200	1000	850	750	600	450	350
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS3-K12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.10. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 3A53 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.10. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR 3A53 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

	2000	1500	1200	1100	1000	900	850	650	450	350	300
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CS1-K3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
CS1-K11	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
CS1-K12	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	2000	1500	1300	1000	850	750	600	550	500	425	
CS2-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2000	1500	1200	1000	850	750	600	550	450	350	
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K8	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K9	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K10	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K11	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CS3-K12	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	



Şekil 3.11. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR E.D. 4 primeri ile gerçekleştirilen PCR tarama sonuçları

**Çizelge 3.11. Üç farklı *Citrus sinensis* bireyinin ISSR-ED4 primeri ile gerçekleştirilen PCR taraması sonrası oluşturulan bantların skorlama sonuçları**

	2000	1500	1200	1100	1000	900	800	700	650	600	550	450	350
CS1-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CS1-K12	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1100	1000	900	750	700	600	550	450	400	350	250		
CS2-K1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K3	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K4	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K5	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K7	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K8	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K9	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K10	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
CS2-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CS2-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	2400	2000	1400	1000	900	750	650	600	450	250			
CS3-K1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CS3-K12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			

10 primerin analizi sonucu toplam 175 lokus saptanmıştır. Çoğunlukla monomorfik çok az da polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir. Çizelge 3.1.'de primerler tarafından saptanan bant sayıları verilmiştir.

**Çizelge 3.12. Bant okumaları sonucunda primerler tarafından saptanan lokus sayısı**

	ISSR 1	ISSR 5	ISSR 7	ISSR 10	ISSR 3A53	ISSR 825	ISSR 826	ISSR 864	ISSR 873	ISSR ED 4
<b>BANT SAYISI</b>	11	16	20	18	17	20	19	17	19	18

Kullanılan primerler içinde toplam 11 bant (2000 bp-175 bp aralığında değişen) sayısı ile ISSR 5 en az bantın gözlemlendiği primer iken toplam 20 bant (3400bp-250bp aralığında değişen) sayısı ile ISSR 825 primeri en fazla bantın gözlemlendiği primer olmuştur. 10 primerin ürettiği bant profillerinin büyüklükleri ise 175 bp – 3500 bp aralığında değişmektedir.

Genetik kararlılığı tayin etmek için kullanılan POPGENE Version 1.32 programı sayesinde elde edilen analiz sonuçlarına göre 3 tohumun 12 ay sonundaki ortalama kararlılık seviyeleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.). Elde edilen sonuçlar neticesinde CS-1 bireyinin genetik materyalinde % 8, CS-2 bireyinin genetik materyalinde %5.71 ve CS-3 bireyinin genetik materyalinde %3.43 gibi çok düşük oranda bir varyasyon oluşmuştur. Elde edilen bu sonuçlar bir yıl gibi uzun bir periyodik dönemi kapsadığından başarılı olarak değerlendirilebilmektedir.

**Çizelge 3.13. 3 *Citrus sinensis* bireyinin hesaplanan ortalama genetik kararlılık değerleri**

<b>Genetik Kararlılık Yüzdesi</b>	
<b>CS-1</b>	% 92
<b>CS-2</b>	% 94.29
<b>CS-3</b>	% 96.57

### 3.2. Doğadan Alınıp *In vitro* Ortamda Çoğaltılan Bitkilerin İklimlendirme Yöntemi ile Tekrar Doğaya Adaptasyonu

Şekil 2.3.'te gösterilen  $27\pm 2$  °C sıcaklık, 16/8 saatlik fotoperiyot ve 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  beyaz gün ışığı floresan ile aydınlatılan ortam koşullarını sağlayan iklimlendirme odasında aşama aşama doğaya adaptasyonu sağlanan *Citrus sinensis* bitkisi başlangıçta üstü kapalı olarak dış etmenlerden bir süreliğine korunmuştur. Ardından üzeri açılarak Şekil 3.12.'deki halinde bakımına devam edilmiştir.



Şekil 3.12. Doğadan alınıp *in vitro* ortamda çoğaltılan bitkilerin iklimlendirme yöntemi ile tekrar doğaya aktarımı

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Muğla iline ait yerel tohum merkezinden temin edilen şeker portakalı örneklerinden alınan ve 3 farklı tohumdan *in vitro* ortamda başarılı bir şekilde geliştirilen, ardından 12 ay boyunca düzenli aralıklarla her bir tohum ayrı ayrı alt kültürleme işlemi yapılmak şartıyla mikroçoğaltımı sağlanan *Citrus sinensis* (CS) bitkisinin DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, genetik kararlılığın belirlenmesi amacıyla ISSR-PCR işlemi uygulanmıştır. PCR ürünlerinin jel üzerinde görüntülenmesine dayalı elde edilen veriler ışığında, genetik kararlılığı tayin etmek için kullanılan POPGENE Version 1.32 programı 3 bireyden gelişen klonların 12 ay sonundaki ortalama kararlılık seviyelerini belirlemiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde CS-1 klonunun genetik materyalinde %8, CS-2 klonunun genetik materyalinde %5.71 ve CS-3 klonunun genetik materyalinde %3.43 gibi düşük oranlarda varyasyonlar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bir yıl gibi uzun bir periyodik dönemi kapsadığından başarılı olarak değerlendirilebilmektedir. Benzer şekilde, Azizi ve arkadaşları (2020) şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) bitkisinin 6 varyetesi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, klonal çoğaltım sonrası SSR primerleri kullanarak genetik kararlılığı incelemişler ve 9 altkültür sonrasında tüm varyetelerin anaçlarına olan benzerlik indeksini 0,94 olarak belirlemişlerdir ve bu çalışma mevcut tez çalışmasıyla uyumludur. Diğer taraftan başka bir çalışmada Pendili ve arkadaşları (2019) *Solanum trilobatum* L. bitkisinin genetik olarak kararlı *in vitro* propagasyonu için geliştirdikleri protokolda genetik kararlılığı RAPD ve ISSR primerleri kullanarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada anaç bitkiyle genetik olarak özdeş *in vitro* materyal elde etmişlerdir. Yine benzer şekilde Ozudoğru ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Thymus vulgaris* L. bitkisinin etkili mikroçoğaltımı için geliştirilen protokolda 10 ay süreyle altkültürlenmiş klonlarda genetik kararlılık RAPD primerleri ile analiz edilmiş ve genetik kararlılık %100 olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, *in vitro* çoğaltılan bitkiciklerin, *in vitro* koşullar altında hücre bölünmesi ve farklılaşması sırasında genetik kararlılıklarını korudukları yapılan bazı çalışmalarda doğrulanmıştır (Shenoy ve Vasil 1992; Ostry ve diğerleri 1994). Ancak, *in vitro* süreçler (örn., stres, oksin-sitokin oranı ve beslenme koşulları; Modgil ve ark. 2005) tarafından indüklenen değişiklik riskinin (Rani ve ark. 1995) hala olduğu göz ardı edilmemelidir. Literatürde, mikro çoğaltılmış bitkiler arasında genetik değişikliklerin

frekansını bildiren çok sayıda çalışma bulunurken (Rani ve diğerleri, 1995; Gimenez ve diğerleri, 2001), ayrıca genetik stabilitenin korunmasını gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur (Rout ve diğerleri, 1998; Javounhey ve diğerleri, 2000). Bu değişiklikler, genellikle kalıtsal olduklarından ve mikro çoğaltılmış bitkiciklerin sonraki nesillerine devam ettirilebildiklerinden çok tercih edilmez (Breiman ve diğerleri, 1987). DNA düzeyinde bu tür değişikliklerin tespiti için çok sayıda moleküler markör mevcut olsa da, ISSR tekniği en yaygın olarak kullanılan, az miktarda kalıp DNA gerektiren, ön dizi bilgisi gerektirmeyen ve birçok diğer tekniğe göre daha hızlı ve daha kolay veri üreten bir yöntemdir. Yöntem ayrıca ön dizi bilgisi gerektirmeden SSR teknolojisinin avantajlarını ve güvenilirliğini sağlamaktadır (Reddy et al. 2002; Vijayan 2005; Kaya ve Souza, 2017). Bitki mikro çoğaltması için çeşitli yöntemler arasında, koltuk altı dallanma, *in vitro* rejenerasyon sistemlerinde en önemli ve yaygın olarak kullanılanlardan biri haline gelmiştir. Rani vd. (1995) bu yöntemi, basitliği ve elde edilen nispeten yüksek yayılma oranları nedeniyle özellikle faydalı olarak tanımlamışlardır (Rani vd., 1995).

Turunçgil (L.), Rutaceae ailesinin Aurantioideae alt ailesine ait, dünyanın ekonomik açıdan en önemli meyve mahsullerinden biridir. Dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın olarak dağılmıştır ve Güneydoğu Asya'dan, özellikle kuzeydoğu Hindistan'dan, Malayan takımadalarından, Çin'den, Japonya'dan ve Avustralya'dan geldiğine inanılmaktadır (Swingle ve Reece 1967; Moore 2001).

Kültürü yapılan türler arasında *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (şeker portakal), Turunçgillerin en önemli ticari mahsulüdür ve mandalınadan sonra ikinci sırada yer alır. *C. sinensis*'in pummelo (*Citrus maxima*) ve mandarin (*Citrus reticulata*) arasında bir melez olduğuna inanılmaktadır (Davies ve Albrigo 1992; Nicolosi vd., 2000)

Oldukça poliembriyonik bir türdür. Meyve özü, C vitamini ve protein içeriği bakımından zengin taze meyve sularının hazırlanmasında kullanılır. Meyvenin kabuğu parfüm ve sabun yapımında kullanılır. Yemeklik yağ, tohumlarından çıkarılır. Yapraklarından elde edilen meyve suyu ülser, yaralar vb. Gibi çeşitli hastalıkları kontrol etmek için kullanılır (Dugo ve Di Giacomo 2002). *C. sinensis*'in genetik çeşitliliği, sınırlı bir gen havuzu oluşturan yoğun bahçe bitkisi yetiştiriciliği için uygun genotiplerin seçilmesi ve eklenmesi nedeniyle doğal gen havuzunun yer değiştirmesi gibi bir dizi faktör sonucu hızla azalmaktadır (Arora 2000).

Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonu ile ilişkili varyasyonlar olarak tanımlanan somaklonal varyasyonlar alt kültürün uzunluğu veya alt kültür sayısındaki artış ile ilişkili olup bu

faktörler mutasyon sıklığını arttırmaktadır. Bu nedenle stok kültürleri periyodik olarak yenilemek gerekmektedir. Maggon ve Singh (1995), turunçgil filiz tohumlarının esas olarak BA içeren bir ortamda kültürlenerek eksplantların kesim yüzeyinde oluşana kallustan kaynaklandığını gözlemlemiştir. Sürgün rejenerasyonu için bu yaklaşım artan genetik kararsızlık riski ile ilişkilidir (Maggon ve Singh 1995). Morfolojik belirteçler bazı genetik değişiklikler gözlenen fenotipik varyasyonda yansıtılmasında somaklonal varyantların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Aynı durumlarda tür dışı bitkilerde gözlemlenen anormallikler ancak tarla koşullarında uzun yıllar süren ekimden sonra fark edilebilmiştir. Turunçgillerde somaklonal varyasyonun ekonomik etkisi uzun yaşam döngülerine sahip oldukları için yüksek olabilir. Birçok turunçgil türü toprağa nakledildikten 2-3 yıl sonra meyve verir ve meyvelerin morfolojik özellikleri üzerindeki somaklonal varyasyonun araştırılması uzun zaman alır ve oldukça maliyetli hale gelir. (Carimi ve De Pasquale 2003).

*C. sinensis* kültür bitkilerinde önemli gelişme sağlamak için varyetelerin / kültürlerin temel karakterlerini korumaya ve mevcut genotipleri karakterize etmeye ve değerlendirmeye acil ihtiyaç vardır. Moleküler belirteçlerin kullanımı, Turunçgil türlerini, çeşitlerini ve biyotiplerini tanımlamak ve turunçgil türlerinin genetik çeşitliliğini araştırmak için değerli ve uygun bir strateji olmuştur. RAPD, ISSR, RFLP, SSR, AFLP ve diğer belirteçler gibi moleküler belirteç teknikleri, germplazm karakterizasyonu, genetik çeşitlilik çalışmaları, sistematikler ve filogenetik analiz için kullanılmıştır (Weising vd., 2005).

Bunlar arasında, rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) belirteçleri, bitki türlerinin karakterizasyonu için en yaygın şekilde kullanılmıştır (Williams vd., 1990). RAPD, prosedürün basitliği, düşük maliyeti ve analiz için gereken çok az DNA miktarı nedeniyle daha fazla dikkat çekmiştir. Turunçgillerde RAPD markörleri çeşit tanımlama, genetik haritalama, genetik çeşitlilik değerlendirmesi ve diğer ıslah programları için kullanılmıştır (Das vd., 2004).

Bu çalışmada, ISSR moleküler belirteçleri ile; *in vitro*'da geliştirilen *C. sinensis*'in moleküler yapısında bir değişiklik oluşmadan genetik kararlılığını koruması amacıyla gerçekleştirilen mikroçoğaltımları sonrasında bu amacın gerçekleşip gerçekleşmediğine bakılmıştır.

Özellikle doğadan direkt kültür ortamına aktarılan bitkilerde bitkinin bulunduğu abiyotik ve biyotik etkenleri değişmesi sonucunda genelde somaklonal varyasyon olarak adlandırılan genetik materyalde birtakım değişimler meydana gelebilir. Ekonomik değerini düşürebilir. Geliştirilmek istenen bitki materyalinin genetik yapısında besi yeri ortamı veya alt kültürleme aşamalarından kaynaklı herhangi bir değişim yaşanmıyor ya da çok düşük oranda yaşanıyorsa sonuç başarılı olarak kabul edilmektedir. Ekonomik öneme sahip aynı zamanda tıbbi aromatik bir bitki olan *Citrus sinensis*'in genetik kararlılığındaki büyük sapmalar bitkinin kendine has özelliklerini, faydalarını yitirmesi anlamına gelmektedir. Bu bağlamda genetik kararlılığı korurken başarılı bir alt kültürleme ile de mikroçoğaltımı hedeflenen *Citrus sinensis*'in doğal ortamına kıyasla daha hızlı ve patojenlerden arı bir şekilde çoğaltılmasına olanak sağlayan 12 aylık periyod başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Sonrasında elde edilen bitkiciklerin bir kısmı DNA izolasyonunda kullanılırken bir kısmı ise doğaya tekrar kavuşturulmak amacıyla iklimlendirme tekniğiyle toprağa adapte edilmiştir.

## KAYNAKÇA

- Anonim (2004). Muğla İli Bahçe Bitkileri Meyve Üretimi, Muğla Valiliği İl Çevre ve Orman Müdürlüğü, Çevre Durum Raporu, Muğla.
- Arora, R. (2000). In situ conservation of biological diversities in citrus. *Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network*. [http://www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/Appendix\\_7.PDF](http://www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/Appendix_7.PDF).
- Azizi, A. A. A., Roostika, I., Reflinur, R., & Efendi, D. (2020). Analysis of Genetic Stability of Micropropagated Sugarcane in Different Subculture Frequencies Using SSR Marker. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 26(1), 49-57.
- Baghurst, K. (2003). The health benefits of citrus fruits, Horticulture Australia.
- Bain, J. M. (1958). Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany* 6(1): 1-23.
- Barkley, N. A., M. L. Roose, R. R. Krueger, C. T. Federici (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 112(8): 1519-1531.
- Barret, H.C. and Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1: 105-136.
- Breiman, A., Rotem-Abarbanell, D., Karp, A., & Shaskin, H. (1987). Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 74(1), 104-112.
- Brouwer, I., M. van Dusseldorp, C. West, S. Meyboom, C. Thomas, M. Duran, M. Hof, K. H. Eskes, T. K. Hautvast, J. G. & Steegers-Theunissen, R. P. (1999b): Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 129: 1135-1139.
- Can, B.A. ve Durul, M.S. (2019). Türkiye’de Mandarin Üretimi ve Pazarlaması Üzerine Bir Dış Pazar Araştırması. Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi (Bahar) 2019 Bildiriler Kitabı Cilt II (Fen Bilimleri) 2310-2317.

- Carimi, F., & De Pasquale, F. (2003). Micropropagation of citrus. In *Micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 589-619). Springer, Dordrecht.
- Cullings, K. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular ecology* 1(4): 233-240.
- Das, A., J. Sarkar, B. Mondal veS. Chaudhuri (2004). Genetic diversity analysis of Citrus cultivars and rootstocks of the north eastern India by RAPD markers. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 64(4): 281-285.
- Davies, F.veL. Albrigo (1992). Taxonomy, cultivars and breeding. *Citrus*. CAB International, Wallingford: 12-51.
- De-qiu, F., Z. Wen-caiveX. Shun-Yuan (1993). Studies on taxonomy and evolution of Citrus and its related genera by isozyme analysis. *Journal of Systematics and Evolution* 31(4): 329.
- Doyle, J. J.ve J. L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- Dugo, G.ve A. Di Giacomo (2002). The genus citrus. *Taylor & Francis Book Ltd, London, UK*.
- Economos, C.veW. Clay (1999). Nutritional and health benefits of citrus fruits. *Energy (kcal)* 62(78): 37.
- Kaya, E., Galatalı, S., Güldağ, S., Öztürk, B., Ceylan, M., Çelik, O., ve Aktay, İ. (2018). Mass Production of Medicinal Plants for Obtaining Secondary Metabolite Using Liquid Mediums Via Bioreactor Systems: SETISTM And RITA®. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 11(2): 05-10.
- Ertek, N., Demir, O., ve Keskin, A. (2020). Türkiye’de portakal piyasasının ekonomik analizi ve pazarlama marjları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(1),
- FAO (1967). Food and Agricultural Organization of the United Nations, (1967). The state of food and agriculture. Rome, Italy.
- FAO (2015). Production, trade and producer price statistics. food and agriculture organization of the united nations 2015. Food & Agriculture Organization

- FAO (2018). Statistical Bulletin of Crops. Food and Agriculture Organizations (FAO), Rome, Italy.
- Federici, C., D. Fang, R. Scora ve M. Roose (1998). Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96(6-7): 812-822.
- Feskanich, D., R. G. Ziegler, D. S. Michaud, E. L. Giovannucci, F. E. Speizer, W. C. WillettveG. A. Colditz (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *Journal of the National Cancer Institute* 92(22): 1812-1823.
- Filiz, E., & Koç, İ. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. GOÜ, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2011, 28(2), 207-214.
- Fiorentino, G., V. Zech-Matterne, E. Boaretto, A. Celant, S. Coubray, N. Garnier, F. Luro, C. PagnouxveM.-P. Ruas (2014). Agrumed: the history of citrus fruits in the Mediterranean. Introductions, diversifications and uses. *Project gallery article*(339).
- Genişel, H. (2013). Türkiye Florası“ ndaki Acı Çiğdem (Colchicum L.) Yeni Tür Adaylarının Karakterizasyonunda ISSR Markörlerin Kullanımı. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul*, 70s.
- George, E.veP. Sherrington (1984). Commercial tissue culture laboratories. *Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics, Basingstoke*: 549-594.
- Gmitter, F. G.veX. Hu (1990). The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Economic Botany* 44(2): 267-277.
- Giménez, C., De Garcia, E., De Enrech, N. X., & Blanca, I. (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 217-222.
- Gould, A. R. (1986). Factors controlling generation of variability *in vitro*. *Plant regeneration and genetic variability*: 549-567.
- Gulsen, O.veM. L. Roose (2001). Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(3): 309-317.

- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. ve Owen, J.L., (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genetics*, 89: 998-1006.
- Harats, D., S. Chevion, M. Nahir, Y. Norman, O. SageevE. M. Berry (1998). Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. *The American journal of clinical nutrition* 67(2): 240-245.
- Harding, P. L. (1947, January). Quality In Citrus Fruits-Seasonal Changes In Relation To Consumer Acceptance Of Oranges, Grapefruit, Temple Oranges, And Tangerines. In *Proceedings Of The American Society For Horticultural Science* (Vol. 49, No. Jun, Pp. 107-115). 701 North Saint Asaph Street, Alexandria, Va 22314-1998: Amer Soc Horticultural Science.
- Hayashi, M.veT. Kozai (1987). Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue-cultured plantlets and the performance of test cultivations [of strawberries]. Symposium: Plant micropropagation in horticultural industries. Preparation, hardening and acclimatization processes, Arlon (Belgium), 10-14 Aug 1987.
- Herrero, R., M. J. Asins, E. A. CarbonellveL. Navarro (1996). Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* 92(5): 599-609.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, D. Kromhout, P. HollmanveM. Katan (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The lancet* 342(8878): 1007-1011.
- Hilooğlu, M. (2012). Türkiye'de yayılış gösteren perorhagia türleri arasındaki genetik akrabalığın moleküler belirteçlerle tespit edilmesi, Anadolu Üniversitesi.
- Jarrell, D., M. Roose, S. TraughveR. Kupper (1992). A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theoretical and Applied Genetics* 84(1-2): 49-56.
- Javouhey, M., Daguin, F., & Letouze, R. (1999, August). Somatic embryogenesis, an efficient tool for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) industrial micropropagation. Characterization and genetic stability of original offshoots and regenerated plantlets by RAPD markers. In *International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation* 530 (pp. 237-242).
- Joshiyura, K. J., F. B. Hu, J. E. Manson, M. J. Stampfer, E. B. Rimm, F. E. Speizer, G. Colditz, A. Ascherio, B. RosnerveD. Spiegelman (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine* 134(12): 1106-1114.

- Kalendar, R., A. Flavell, T. Ellis, T. Sjakste, C. MoisyveA. H. Schulman (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity* 106(4): 520-530.
- Kaneyoshi, J., T. Kanou, Y. Kuwata, A. Hirao, S. NakataniveS. Kobayashi (1997). Breeding of Triploid Citrus Cultivars I. Production of Triploids from Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marc.)× Tetraploid Ponkan Mandarin (Citrus reticulata Blanco) Crosses. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 66(1): 9-14.
- Kaya, E.ve F. V. D. Souza (2017). Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (Saccharum spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 53(4): 410-417.
- Knekt, P., J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. HakulinenveA. Aromaa (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition* 76(3): 560-568.
- Kozai, T. (1991). Acclimatization of micropropagated plants. High-tech and micropropagation I, Springer: 127-141.
- Kurowska, E. M., J. D. Spence, J. Jordan, S. Wetmore, D. J. Freeman, L. A. PichéveP. Serratore (2000). HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *The American journal of clinical nutrition* 72(5): 1095-1100.
- Larkin, P. J.veW. R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60(4): 197-214.
- Li, G.veC. F. Quiros (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103(2-3): 455-461.
- Liu, Y., E. HeyingveS. A. Tanumihardjo (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety* 11(6): 530-545.
- Luro, F., Curk, F., Froelicher, Y., & Ollitrault, P. (2017). Recent insights on Citrus diversity and phylogeny. Agrumed. Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: acclimatization, diversifications, uses. Publications du Centre Jean Bérard, Naples, 16-28.

- Mabberley, D. J. (1997). A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* 7(2): 167-172.
- Maggon, R., & Singh, B. D. (1995). Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Scientia Horticulturae*, 63(1-2), 123-128.
- Martins-Lopes, P., S. Gomes, J. Lima-Brito, J. LopesveH. Guedes-Pinto (2009). Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. *Scientia horticulturae* 123(1): 82-89.
- Martins, M., D. SarmentoveM. Oliveira (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant cell reports* 23(7): 492-496.
- Mendilcioğlu, K. (1996). Subtropik İklim Meyveleri (Turunçgiller). *EÜ Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova, İzmir*.
- Mikkonen, T., Koort, J. M. K., Björkroth, K. J., & Sukura, A. (2005). Testing of amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique as a tool for molecular epidemiology of *Trichinella nativa*. *Veterinary parasitology*, 132(1-2), 19-22.
- Modgil, M., Mahajan, K., Chakrabarti, S. K., Sharma, D. R., & Sobti, R. C. (2005). Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horticulturae*, 104(2), 151-160.
- Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *TRENDS in Genetics* 17(9): 536-540.
- Murashige, T.veF. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- Nicolosi, E., Z. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. ContinellaveE. Tribulato (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100(8): 1155-1166.
- Oral, M., & Akpınar, M. (2017). Proceedings: 1st International Conference on Food and Agricultural Economics: RESPONDING TO THE PROBLEM OF ORANGE MARKETING IN TURKEY'S ORANGE PRODUCERS (No. 2314-2019-4817).

- Ostry, M., Hackett, W., Michler, C., Serres, R., & McCown, B. (1994). Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by *Septoria musiva*. *Plant Science*, 97(2), 209-215.
- Ozudogru, E. A., E. Kaya, E. Kirdok ve S. Issever-Ozturk (2011). *in vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47(2): 309-320.
- Pang, X.-M., C.-G. HuveX.-X. Deng (2007). Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54(2): 429-436.
- Peakall, R. veP. E. Smouse (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6(1): 288-295.
- Pedrosa, A., D. SchweizerveM. Guerra (2000). Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theoretical and Applied Genetics* 100(3-4): 361-367.
- Pendli, S., Rohela, G. K., Jogam, P., Bylla, P., Korra, R., & Thammidala, C. (2019). High frequency *in vitro* plantlet regeneration in *Solanum trilobatum* L., an important ethno-medicinal plant and confirmation of genetic fidelity of R 1 plantlets by using ISSR and RAPD markers. *Vegetos*, 32(4), 508-520.
- Preece, J. E., & Sutter, E. G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In *Micropropagation* (pp. 71-93). Springer, Dordrecht.
- Ramana, K., V. Govindarajan, S. RangannaveJ. Kefford (1981). Citrus fruits—varieties, chemistry, technology, and quality evaluation. Part I: Varieties, production, handling, and storage. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 15(4): 353-431.
- Ranganna, S., V. Govindarajan, K. RamanaveJ. Kefford (1983). Citrus fruits—varieties, chemistry, technology, and quality evaluation. Part II. Chemistry, technology, and quality evaluation. A. Chemistry. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 18(4): 313-386.
- Rani, V., A. ParidaveS. Raina (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant cell reports* 14(7): 459-462.
- Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *euphytica*, 128(1), 9-17.

- Rick, C. ve N. Simmonds (1976). Evolution of crop plants, Longman group, London.
- Rouseff, R. L. ve S. Nagy (1994). Health and nutritional benefits of citrus fruit components. *Food technology (Chicago)* 48(11): 125-132.
- Rout, G. R., Das, P., Goel, S., & Raina, S. N. (1998). Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39.
- Seon, J.-H., Y.-Y. Cui, T. Kozaive K.-Y. Paek (2000). Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant cell, tissue and organ culture* 61(2): 135-142.
- Shenoy, V. B., & Vasil, I. K. (1992). Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theoretical and Applied Genetics*, 83(8), 947-955.
- Smýkal, P., N. Bačová-Kertessová, R. Kalendar, J. Corander, A. H. Schulman ve M. Pavelek (2011). Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 122(7): 1385-1397.
- Sokal, R. ve P. Sneath (1963). Principles of Numerical Taxonomy WH Freeman and Co. *San Francisco*, xvi.
- Spiegel-Roy, P. ve E. E. Goldschmidt (1996). The biology of citrus, Cambridge University Press.
- Swingle, W. ve P. Reece (1967). The botany of citrus and its wild relatives In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. The citrus industry. Berkeley, California, USA: University of California Press.
- Swingle, W. T. (1943). botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subfamily Aurantioideae).
- Şeker, M. (1999). Aurantioideae alt familyasındaki önemli turunçgil genotiplerinin tanımlanmasında genom büyüklükleri ve izoenzim analizlerinden yararlanma olanakları. *ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana*.
- Talon, M. ve F. G. Gmitter (2008). Citrus genomics. *International journal of plant genomics* 2008.

- Tanaka, T., & Tanaka, C. (1954). *Species problem in Citrus: A critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native homes* (Vol. 9). Japanese Society for the Promotion of Science.
- Tanaka, T. (1961). *Citologia: semi-centennial commemoration papers on Citrus studies. Osaka: Citologia Supporting Foundation.*
- Tanaka, T. (1977). Fundamental discussion of Citrus classification. *Studia Citrologica 14*: 1-6.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology 37*(2): 169-180.
- Tolkowsky, S. (1938). *Hesperides. A history of the culture and use of citrus fruits. Hesperides. A history of the culture and use of citrus fruits.*
- Törün, B. (2013). Türkiye'de yetiştirilen bazı çeltik çeşitlerinin genetik çeşitliliğinin ISSR tekniği ile saptanması, Anadolu Üniversitesi.
- TÜİK, (2016). Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri, Ankara
- TÜİK, (2019). Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri, Ankara.
- Uzun, A., T. Yesiloglu, Y. Aka-Kacar, O. TuzcuveO. Gulsen (2009). Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia horticulturae 121*(3): 306-312.
- Valiente, J. I.veL. G. Albrigo (2004). Flower bud induction of sweet orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]: effect of low temperatures, crop load, and bud age. *Journal of the American Society for Horticultural Science 129*(2): 158-164.
- Vijayan, K. (2005). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. *International Journal of Industrial Entomology, 10*(2), 79-86.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research, 23*(21), 4407-4414.

Yeh, F. C. (1999). POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft Window-Bases Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.

Yıldıztekin, M., & Semir, Kuzu. (2019). Soil Properties and Mineral Nutrients of Clementine Mandarin (Citrus reticulata Blanco) Grown in the Koycegiz Region of Mugla Province. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6(4), 323-332.

YORGANCILAR, M., YAKIŞIR, E., & ERKOYUNCU, M. T. (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.

Webber, H. J., R. Walter, W. L. HarryveW. Hodgson (1989). The citrus industry, horticultural varieties of citrus. *Riverside CA: University of California Division of Agricultural Sciences: 1967-1987*.

Weising, K., H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff ve G. Kahl (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, CRC press.

Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. RafalskiveS. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18(22): 6531-6535.

Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

Ziv, M. (1992). Morphogenic control of plants micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization. *International Symposium on Transplant Production Systems* 319.

Zobayed, S., F. Afreen-Zobayed, C. KubotaveT. Kozai (1999). Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35(3): 183-188.

Web-1 : [https://www.west-crete.com/flowers/citrus\\_sinensis.htm](https://www.west-crete.com/flowers/citrus_sinensis.htm) Erişim: 16.05.2021

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: S\*\*\*\*ç G\*\*\*\*ğ  
Uyruk: T.C.  
Doğum Tarihi: 1\*/0\*/94  
Medeni Hali: Bekar  
Telefon: 0 5\*\*5\*\*\*\*27  
E-posta: [s\\*\\*\\*\\*cg\\*\\*\\*\\*g\\*\\*\\*\\*@gmail.com](mailto:s****cg****g****@gmail.com)

## Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/ Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Sinop Anadolu Lisesi	2012
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018

## Yabancı Dil

Dil(İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma			X

## Bilimsel Faaliyetler

### Kitaplar

E. Kaya, S. Galatalı, **S. Guldag** & O. Celik, A New Perspective on Cryotherapy: Pathogen Elimination Using Plant Shoot Apical Meristem via Cryogenic Techniques, M. NASEEM & T. DANDEKAR [Editörler], Plant Stem Cells(137 - 148), ISBN: 978-1-0716-0182-2, ABD: Springer, 01 Ocak 2020, Kitapta Bölüm.

## **Makaleler**

Secil Kıvrak Kıran, Selin Galatalı, Sevil Yeniocak, Damla Ekin Ozkaya, Taner Mercan, **Sevinc Guldag**, Onur Celik, Naeem Abdul Ghafoor, Ergun Kaya, Investigation of modified WPM medium for the best meristem proliferation of *Corylus avellana* L., 2021.

Kaya Ergun, Balcı Mehmet Ali, Akgüller Ömer, Galatalı Selin, Yeniocak Sevil, Mercan Taner, **Güldağ Sevinç**, Özkaya Damla Ekin, Öztürk Bilge, Çelik Onur, Aktay İrem, 2021. Determination an optimum proliferation medium via graph kernel statistical analysis method for genetical stable in vitro propagation of endemic *Thymus cilicicus*, Boiss. & Bal. Acta Botanica Croatica. DOI: 10.37427/botcro-2021-024.

E. Kaya, S. Galatalı, **S. Guldag**, B. Öztürk, M. Ceylan, O. Celik & I. Aktay, Mass Production Of Medicinal Plants For Obtaining Secondary Metabolite Using Liquid Mediums Via Bioreactor Systems: Setistm And Rita(R), Turkish Journal Of Scientific Reviews, 2018, 2146-0132, 11, 2, 5-10.

## **Bildiriler**

**S. Guldag**, E. Kaya, Genetic stability determination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck one-year old *in vitro* culture clones via ISSR markers, Tam metin sözlü sunum, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 19 Mart 2020, 20 Mart 2020

E. Kaya, D. E. Ozkaya., **S. Guldag** (2020) Conservation Strategies of Citrus Germplasm: *in vitro* Approaches and Biotechnological Applications, INSAC Natural and Health Sciences (INHS-2020), Turkey, 39-44

E. Kaya, B. Ozturk, D. E. Ozkaya, S. Galatalı, **S. Guldag**, O. Celik, I. Aktay, S. Yeniocak, M. A. Balcı & Ö. Akgüller, Investigation of FeEDDHA and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> effects on shoot formation of endemic *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal, Poster Sunumu, II. International Green Biotechnology Congress, 09 Eylül 2019, 11 Eylül 2019.

E. Kaya, S. Galatalı, **S. Guldag** & O. Celik, Cryogenic Technology for virüs elimination from infected plants, Sözlü Sunum, 3. Global Congress on Plant Biology and Biotechnology, 11 Mart 2019, 13 Mart 2019.

D. E. Özkaya, I. Kaya, O. Celik, I. Aktay, S. Savran, S. Yıldırğan, **S. Guldag**, S. Kıvrak, M. Ceylan, B. Öztürk, S. Galatalı & E. Kaya, Effect of FeEDDHA and Zeatin on shoot formation of *in vitro* grown *Mentha* spp. meristems, Poster Sunumu, 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity, 03 Temmuz 2018, 06 Temmuz 2018.

**S. Guldag**, B. Öztürk, O. Çelik & E. Kaya, Micropropagation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck ], Sözlü Sunum, 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity , 03 Temmuz 2018, 06 Temmuz 2018.

B. Öztürk, **S. Guldag**, O. Çelik & E. Kaya, *in vitro* propagation of bitter orange (*Citrus aurantium* L.), Poster Sunumu, 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity, 03 Temmuz 2018, 06 Temmuz 2018.

S. Galatalı, **S. Guldag**, O. Celik & E. Kaya, Micropropagation of olive (*Olea europae* L.): The effects of FeEDDHA on *in vitro* shoot formation, Poster Sunumu, 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25 Nisan 2018, 27 Nisan 2018.

**S. Guldag**, E. Kaya, Micropropagation of Economically Important Local Citrus Species, Poster sunumu, VIII. Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 20 Aralık 2018.

### **Diğer Yayınlar**

Geleneksel Mirasımız: Gökova Susamı- Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltımı Ve Kriyojenik Yöntemlerle Koruma Altına Alınması Başlıklı Broşür Kitap, Türkiye. 2020

### **TÜBİTAK Burs ve Destekleri**

217S543, Oral ve Maksillofasiyal Kemik Rekonstrüksiyonları İçin Yeni Bir Kompozit Biyomateryalin Üretimi, Karakterizasyonu ve Kullanımının *in vitro* ve *in vivo* Olarak Araştırılması, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 19.06.2018 - 09.03.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2018 - 01.10.2021 projesinde bursiyer olarak çalışmakta.

### **Deneyimler**

İsteğe Bağlı Yaz Stajı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü- Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (1 Temmuz-1 Ağustos 2015)