

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özhan ŞİMŞEK

**BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA DEMİR (Fe) KLOROZUNA
DAYANIKLILIKTAN SORUMLU GENLERİN SSCP MARKIRLARIYLA
ALLELİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA DEMİR (Fe) KLOROZUNA
DAYANIKLILIKTAN SORUMLU GENLERİN SSCP MARKIRLARIYLA
ALLELİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZHAN ŞİMŞEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez/...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu
İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Doç. Dr. Yıldız Aka-Kaçar	Prof. Dr. Turgut Yeşiloğlu	Doç. Dr. Hatice K. Güvenmez
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu Tarafından desteklenmiştir.
Proje No: ZF2009YL2

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA DEMİR (Fe) KLOROZUNA DAYANIKLILIKTAN SORUMLU GENLERİN SSCP MARKIRLARIYLA ALLELİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Özhan ŞİMŞEK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR
Yıl : 2009, **Sayfa:** 92
Jüri : Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Turunçgil anaçlarında demir klorozundan sorumlu genlerde allelik çeşitliliği tespit etmek amacıyla SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak turunçgil EST lerinden demir klorozundan sorumlu üç aday gen belirlenmiştir. Turunçgil anaçlarını temsil eden 8 farklı turunçgil genotipi seçilerek, belirlenen aday genlere özgü PCR primerleri kullanılarak genlerin PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir ve PCR ürünlerinden direk DNA sekans yapılarak genlerin seçilen 8 genotip açısından DNA sekansları belirlenmiştir. DNA sekans sonuçlarının analizleri bilgisayar paket programları aracılığıyla yapılarak polimorfizmler belirlenmiştir. SSCP analizlerini gerçekleştirmek amacıyla bu mutasyonlu bölgeleri çoğaltacak yeni SSCP primerleri dizayn edilmiştir ve SSCP analizlerine geçilmiştir. Dizayn edilen SSCP primerleri ve tez kapsamında kullanılan toplam 35 farklı turunçgil anacına ait DNA materyalleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezinde koşturulmuştur, elde edilen DNA bant profillerinin cluster analizleri yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur. Fe-S geni için elde edilen dendogramda demir klorozuna duyarlı oldukları bilinen üç yapraklı genotipleri aynı grup içinde kümelenmişlerdir, üç yapraklı melezleri ise kendi içerisinde aynı alt kollarda yer almışlardır. IRT1 geni için oluşturulan dendogramda ise benzer sonuçlar bulunmuştur, üç yapraklı ve melezleri aynı alt kollarda kümelenmişler ve mandarin genotipleri arasında yüksek bir varyasyon tespit edilmiştir. NRAMP3 geni ile PCR ürünü akrilamid jel içerisinde ayrılamadığından dolayı cluster analizleri yapılamamıştır.

Anahtar Kelimeler: SSCP, Demir Klorozu, Turunçgil, Allelik Çeşitlilik

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF ALLELIC DIVERSITY OF CANDIDATE GENES RESPONSIBLE FOR RESISTANCE TO IRON CHLOROSIS BY SSCP MARKERS IN SOME CITRUS ROOTSTOCKS

Özhan ŞİMŞEK

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

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR

Year : 2009, **Pages:** 92

Jury : Assoc. Prof. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR
Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

We performed SSCP (Single Stranded Conformation Polimorphism) analysis in order to discover allelic diversity of candidate genes responsible for iron chlorosis in citrus rootstocks. Three Iron chlorosis candidate genes were selected from existing Citrus ESTs databases and *Arabidopsis thaliana* genome databases. Iron-Sulfur assembly protein, Vacuolar Metal Transporter and root iron transporter candidate genes were used. Eight citrus genotypes were selected to be representative cultivars of the basic taxon of Citrus to analyse the polymorphism. Two primers were used to amplify for each gene with these eight genotypes and directly sequencing of amplified DNA of candidate genes was done from PCR products to design new SSCP primers. We developed new primers for further diversity and routine genotyping by SSCP method from the results of direct sequencing on the basic taxa. Two pair of primers were defined for each genes. SSCP-PCR analysis was performed with thirty-five citrus rootstocks and PCR product were was subjected to electrophoresis in a non-denaturing PAGE and gels were stained with silver nitrate. Neighbour joining method was used to construct dendrograms for cluster analyses. Trifoliata genotypes and their hybrids were clustered together and mandarins showed high diversity for both genes, for Fe-S gene and IRT1 gene. Dendograms could not be constructed, because the DNA profiles could not be separated in acrylamide gel for NRAMP3 gene.

Key Words: SSCP, Iron Chlorosis, Citrus, Allelic diversity

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren her konuda ve her şekilde desteğini esirgemeyen, tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi konularında çok büyük katkıları olan danışman hocam sayın **Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının bir bölümünün İspanya/Valenciano Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yapılması konusunda ve ilk yurtdışı deneyiminin gerçekleşmesi konusundaki katkılarından dolayı ve tez çalışması boyunca her türlü desteğinden ötürü sayın **Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU**'na teşekkür ederim.

Bu araştırmada materyallerin toplanması konusundaki yardımları ve tez çalışması boyunca desteklerini esirgemeyen **Yard. Doç. Dr. Bilge YILDIRIM, Ar. Gör. Meral İNCESU** ve **Ar. Gör. Müge UYSAL KAMİLOĞLU**'na müteşekkirim.

Yüksek Lisans eğitimime başladığım dönemden itibaren büyük destekleri olan sayın hocam **Doç. Dr. Yeşim YALÇIN-MENDİ**'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın İspanya'da gerçekleşen bölümündeki desteklerinden dolayı sayın **Dr. Patrick Ollitrault** ve sayın **Dr. Raphaël Morillon**'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın her aşamasında yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım **Dr. Muharrem YILMAZ, Biyolog Melda BONCUK, Biyolog Aygül TURUNÇ, Biyolog Tolga İZGÜ, Biyolog Fatma ASLAN, Ziraat Müh. Esra KOCAMAN**'a ve tüm Bitki Biyoteknoloji laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Çalışmanın her aşamasında her türlü anlamda desteklerini esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım. **Biyolog Ali Haydar COŞKUN, Biyolog Kübra KENDİRLİ** ve **Biyolog Dicle DÖNMEZ**'e teşekkürlerimi sunarım.

Verilerimin cluster analizleri sırasında yardımları ve değerli önerileri için hocam **Doç. Dr. Sedat SERÇE**'ye teşekkür ederim.

Son olarak ta bugünlere gelmemde sonsuz emekleri ve katkıları olan **Sevgili Aileme...**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Turunçgiller.....	1
1.2. Bitkilerde Demir (Fe) ve Demir Noksanlığı.....	4
1.3. Moleküler Markırlar.....	6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Turunçgil Taksonomisi ve Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Çalışmaları.....	13
2.2. Turunçgillerde ve Farklı Bitkilerde Demir ve Demir Klorozuyla İlgili Yapılan Çalışmalar.....	18
2.3. Bitkilerde ve Diğer Organizmalarda Yapılan Bazı SSCP Çalışmaları....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. Bitkisel Materyal.....	24
3.1.1. Demir Klorozuna Dayanıklılıktan Sorumlu Aday Genler.....	34
3.2. Metod.....	36
3.2.1. Bitkisel Materyalin Alınması ve DNA izolasyonu.....	36
3.2.2. DNA izolasyonu için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması.....	37
3.2.3. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi.....	39
3.2.4. DNA Sekans Analizleri, Polimorfizmlerin Belirlenmesi ve SSCP Primerlerinin Dizaynı.....	39
3.2.5. SSCP Analizleri.....	42
3.2.6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	43
3.2.7. Gümüş Nitrat Boyama.....	44

3.2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	45
3.2.8.1. DNA Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	45
3.2.8.2. SSCP Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Dendogramların Oluşturulması.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. DNA İzolasyonu.....	46
4.2. DNA Sekans Analizleri, Polimorfizmlerin Belirlenmesi ve SSCP Primerlerinin Dizaynı.....	48
4.3. SSCP Analizleri.....	52
4.3.1. SSCP Analizleri Sonucunda Fe-S Geni İçin Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi.....	54
4.3.2. SSCP Analizleri Sonucunda IRT1 Geni İçin Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi.....	56
4.3.3. SSCP Analizleri Sonucunda Fe-S Geni ve IRT-1 Geni için Elde Edilen Verilerin Birleştirilmesiyle Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi.....	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	74
EK 1. Çalışmada 8 Farklı Turunçgil Genotipi İle Demir Klorozundan Sorumlu Aday Genlerin DNA Dizilerine Ait Sonuçlar.....	75

KISALTMALAR

AFLP	:	Amplified Fragment Length Polymorphism
cDNA	:	Complementary deoxyribonucleic acid
cM	:	santimorgan
CTAB	:	Cetyltrimethylammoniumbromide
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
mg	:	Miligram
ml	:	mililitre
μ l	:	mikrolitre
μ M	:	mikromolar
ng	:	Nanogram
PCR	:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RE	:	Restriksiyon Enzimi
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	:	Single Strand Conformation Polymorphism
rpm	:	revolution per minute
Taq	:	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	:	Ultra Violet

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Çalışmada SSCP Markırlarını dizayn etmek amacıyla kullanılan genotiplerin listesi.....	24
Çizelge 3.2.	Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal.....	25
Çizelge 3.3.	Demir Klorozundan Sorumlu Aday Genler.....	34
Çizelge 3.4.	DNA izolasyon Yönteminde kullanılan Tampon Çözeltinin İçeriği.....	37
Çizelge 3.5.	DNA Sekans Amacıyla Aday Genlerin Amplifikasyonunda Kullanılan PCR Primerleri.....	40
Çizelge 3.6.	DNA Sekans Sonuçlarından Dizayn edilen SSCP Primerleri.....	41
Çizelge 4.1.	Tez Kapsamında Kullanılan Bitkisel Materyale Ait Miktar ve Saflıkları.....	46
Çizelge 4.2.	Aday Genlerin Baz Sayısı ve DNA Sekans sonucunda Belirlenen Polimorfizm ve Mutasyon Sayıları.....	49
Çizelge 4.3.	Dizayn Edilen SCP Primerleri, içerdikleri Polimorfizm Bilgileri ve Çoğalttıkları DNA uzunluğu.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Demir klorozu belirtisi gösteren bir turuncgil yaprağı.....	5
Şekil 1.2.	RFLP Analiz Aşamaları.....	8
Şekil 1.3.	TILLING ve ECOTILLING Analiz Aşamaları.....	10
Şekil 1.4.	SSCP Analiz Aşamaları.....	12
Şekil 3.1.	Pomeroş Üç Yapraklısı (1), Corsica Ağaç Kavunu (2), <i>Citrus micrantha</i> (3), Nules klemantin (4).....	31
Şekil 3.2.	Kleopatra mandarin (5), Chandler Şadok (6), pink şadok (7), Carrizo Sitranjı (8).....	31
Şekil 3.3.	C35 Sitranjı (9), Citrumelo 4475 (WN) (10), Nasnaran Mandarini (11), Sunki Mandarini (12).....	32
Şekil 3.4.	Shekwasha Mandarini (13), Fuzhu Mandarini (14), Kaba Limon (15), Volkameriana (16).....	34
Şekil 3.5.	Alemow (macrophylla) (17), Bigarade Gou Tou Turuncu (18), Poncirus flying-dragon (19), Poncirus rubidoux (20).....	36
Şekil 3.6.	Yuvarlak Kamkat (21), Yerli Mandarin (22), Meksika Laymı (23), Duncan Altıntopu (24).....	39
Şekil 3.7.	Eureka limonu (25), Changsha mandarini (26).....	43
Şekil 3.8.	A.Yaprakların Sıvı Azota Daldırılması, B. Yaprakların Sıvı Azotta Öğütölmesi, C. Örneğın Santrifüj Tüplerine Doldurulması, D. Sıvı Azottaki Santrifüj Tüplerinin Saklama İçin Alınması.....	36
Şekil 3.9.	A. Öğütölmiş bitkisel materyalin 65° C’de bekletilmesi, B- C. Tüplerin üzerine solüsyonların eklenmesi, D. Santrifüj işlemi.....	38
Şekil 3.10.	A. Agaroz jelin dökölmesi, B. Agaroz jelin yüklenmesi, C. Agaroz jelin koşturulması.....	41
Şekil 3.11.	A. Jelin şırınga yardımıyla dökölmesi, B. Jelin Polimerize olmasının beklenmesi, C. Jelin koşturulması, D. Jel koşturulurken örneklerin jel içerisindeki görüntüsü.....	44

Şekil 4.1.	Bioedit bilgisayar programında DNA dizilerin arasındaki farklılıkların belirlenmesi.....	48
Şekil 4.2.	SSCP analizleri sonucunda Fe-S geni için elde edilen dendogram.....	55
Şekil 4.3.	SSCP analizleri sonucunda IRT1 geni için elde edilen dendogram.....	57
Şekil 4.4.	SSCP analizleri sonucunda Fe-S ve IRT1 genlerine ait verilerin birleştirilmesi sonucu elde edilen dendogram.....	59

1. GİRİŞ**1.1. Turunçgiller**

Turunçgiller dünyada yetiştiriciliği yapılan en önemli meyve gruplarından biridir. Turunçgil grubunun sahip olduğu tür ve çeşit zenginliği, meyvelerinin olgunlaşmasının uzun bir döneme yayılması ve olgunlaşan meyvelerin ağaç üzerinde bekletilebilmesi turunçgillerin önemini arttırmaktadır.

Dünyada turunçgil üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarıküre’de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarıküre’de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya’da ekonomik olarak üretilmektedir (**Karahocagil, 2003**).

Turunçgillerin ilk defa M.Ö 500’lü yıllarda kültüre alındığı sanılmaktadır. (**Anonim, 1975**). Bugüne kadar geçen binlerce yıllık süre içerisinde turunçgil türlerinde seleksiyon, doğal hibritleme ve spontan mutasyonlar aracılığı ile yeni turunçgil tür ve çeşitler ortaya çıkmıştır. Bu durum turunçgillerde geniş bir tat, asitlik, renk, şekil ve irilik çeşitliliği sağlamıştır (**Göksel, 1999**).

Turunçgiller yaklaşık 115 milyon ton üretim ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur. Dünyada en büyük üretici ülke Brezilya olup onu sırasıyla ABD, Çin, Meksika, İspanya ve Hindistan izlemektedir. Dünya üretiminin %57’si portakal, %23’ü mandarin, %11’i limon, %4’ü altıntop ve kalan kısım diğer turunçgillerdir. Türkiye toplam 3.1 milyon ton üretim ile Akdeniz ülkeleri içerisinde önemli bir üretici konumundadır. Bu üretim aynı zamanda dünya turunçgil üretiminin % 2.7’sini oluşturmaktadır. Türkiye turunçgil üretiminin %48’i portakal, % 24’ü mandarin, %23’ü limon ve %5’i altıntoptur (**FAO, 2007**). Türkiye’de toplam turunçgil üretiminin %91’i Akdeniz, %8.5’i Ege, %0.5’i ise Doğu Karadeniz bölgelerinden elde edilmektedir (**Yeşiloğlu ve ark., 2007**).

Türkiye’de oldukça eski bir geçmişe sahip olan turunçgil yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren üretimde önemli artışlar olmuştur. Türkiye turunçgil yetiştiriciliğine ekolojik koşullar açısından son derece uygundur.

Turunçgiller, Türkiye yaş meyve sebze ihracatının yaklaşık % 50'sini oluşturmakta ve bu ihracat gelirinin de yaklaşık olarak % 50'si yine turunçgillerden sağlanmaktadır (**Anonim 2002**).

Dünyada kullanılan bazı turunçgil anaçları arasında, Amerika ve Arjantin'de üç yapraklı ve melezleri, Florida ve Brezilya'da kaba limon (*Citrus jamphiri*) ve rangpur laymı (*Citrus limonia*), Güney Afrika'da ise Kleopatra mandarini ve melezleri yer almaktadır. Ülkemizde ise, turunçgil meyveleri üretiminin büyük bir bölümünün sağlandığı Akdeniz bölgesinde en yaygın anaç turunçtur. Kuzeydoğu Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde ise üç yapraklı kullanılan tek anaç durumundadır. Geçit Ege bölgesi yani Büyük Menderes vadisinde ise turunç ve üç yapraklı karışık olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda Ege ve Akdeniz bölgesinde Carrizo sitranjının portakal, mandarin ve altıntop türlerine anaç olarak kullanımı hızlı bir artış göstermiştir (**Tuzcu ve ark, 2001**). Ticari amaçla yetiştirilen turunçgil ağaçlarının hemen hemen tamamı aşılarmakta ve kalem olarak kullanılan çeşidin performansı üzerine anacın büyük bir etkisi olmaktadır. Yeni bahçelerin kurulması sırasında ise, uygun anaç seçimi oldukça önemli bir konudur. Anaçların sahip oldukları değişik ve farklı özellikleri nedeniyle toprak, hastalık, iklim vb. sınırlayıcı ve engelleyici etkenlerin çözümlenmesinde ayrıca verimlilik, erkencilik, meyve kalitesi gibi faktörler, gerek yetiştirici, gerekse pazar isteklerinin karşılanmasında ortaya çıkacak güçlüklerin giderilmesinde anaç seçimi önemli rol oynamaktadır. Ancak, anaçların farklı ekolojik koşullardaki davranışları değişik olabilmekte ve bunun sonucu olarak da üzerine aşılarmak çeşitlerin meyve verim ve kalitesini, bitki besin maddelerinin alımı ve kullanımını, büyüme ve gelişmelerini farklı şekilde etkileyebilmektedirler. Bu nedenle, anaç seçimi yetiştiricilik açısından önemli faktörlerden birisidir (**Açıkalın ve ark., 2008**).

Akdeniz bölgesinin baskın anacı olan turuncun (*Citrus aurantium* L.) önemli tür ve çeşitlerle uyuma, verim ve kalite yönünden büyük bir sorunu bulunmasa da önemli bir hastalık olan Göçüren (Tristeza) virüs hastalığına duyarlı oluşu ve bu hastalığın ülkemizde bazı yerlerde ortaya çıkışı turunç anacı yerine kullanılabilecek dayanıklı anaçların seçimini zorunlu kılmaktadır. Ayrıca Akdeniz bölgesi özellikle dünya pazarlarında önemli ölçüde talep bulan limon yetiştiriciliğine yönelirken, anaç

olarak kullanılan turunç, limon çeşitleriyle oransal uyumsuzluklar nedeniyle bazı sorunların da ortaya çıkmasına neden olmuştur (**Tuzcu, 1978**).

Dünya’da ve Türkiye’de büyük öneme sahip turunçgiller genellikle tohum, çelik ve diğer vegetatif yöntemlerle kolaylıkla çoğaltılabilirlerse de, özellikle başta hastalıklar olmak üzere, çeşitli toprak ve iklim koşullarına uyabilmeleri için anaç kullanması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (**Yıldırım, 1996**).

Kireçli ve oldukça değişik karakterdeki topraklara uygunluk gösteren turunç anacı kök boğazı çürüklüğüne dayanıklı olması, ticari çeşitlerle genellikle iyi uyuşması, kolaylıkla çoğaltılabilmesi, %85-90 oranında nüseller embriyo oluşturmaları ile bir örnek çöğür vermesi sebebiyle Akdeniz havzasında yaygın olarak kullanılan bir anaç olmuştur (**Özsan, 1979**).

Ancak turunçgillerde görülen tristeza virüs hastalığı ilk kez 1890’lı yıllarda turunç anacı üzerinde yetiştirilen portakal ve mandarinlerin ölüm nedeni olarak belirlenmiştir. Hastalık aşı gözü ve aşılama yoluyla yayıldığı gibi en önemli bir diğer yayılma yolu ise yaprak biti vektörlerdir. Özellikle ülkemiz turunçgiller yetiştiriciliğinin %100’e yakın olarak turunç anacı üzerinde yapılıyor olması tristeza virüs hastalığının ülkemiz için potansiyel tehlike olarak dikkate alınmasına neden olmaktadır (**Baloğlu, 2001**). Dünya turunçgil üretiminin % 22’ sinin gerçekleştirildiği Akdeniz havzası hem turunç anacının kullanılması nedeniyle bu virüs hastalığının tehdidi altında ve hem de toprakların yüksek pH’lı olması sebebiyle meyve ağaçlarının %20-50 ‘si demir klorozu ile ilgili sıkıntı yaşamaktadır (**Pestana ve ark., 2005**).

Bitkilerde eksiklik semptomu tanımlanan ilk besin elementi demir (Fe) dir. Noksanlığı bitkilerde büyümenin, dayanıklılığın, direncin ve verimliliğin azalmasına neden olmaktadır (**Daşgan, 1999**).

Turunçgil üretiminin çok önemli bir paya sahip olduğu bu bölgede turunca alternatif olabilecek hem tristeza virüs hastalığına dayanıklı hem de yüksek pH’lı topraklara iyi adapte olabilecek yeni anaçların bulunması zorunlu hale gelmiştir.

Türkiye’de yer alan her bölgenin sahip olduğu farklı iklim, toprak ve yetiştiricilik koşulları, o bölgede kullanılacak çeşit ve çeşidin anaç ile uyumu, kullanılacak anacı belirlemede en önemli kriterlerdir. Bu kriterler göz önünde

bulundurulduğunda bölgeye uyum sağlayan bir anacın kalem ile iyi uyuşması ve anacın özellikle verim ve meyve özellikleri bakımından çeşit üzerine olumlu etki yapması gerekmektedir. Anacın çeşit ile uyuşmazlık göstermesi, anacın bölgeye uygun olmaması yeni anaç geliştirme arayışı içerisine girmemize neden olmaktadır. Uygun ıslah programları kullanılarak yeni anaç eldesi mümkündür. Bu ıslah programları içerisinde; melezleme, seleksiyon, mutasyon vb. klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra modern ıslah yöntemleri olarak adlandırılan; *in vitro* kültür teknikleri ve moleküler yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemlerin birlikte kullanılması ıslah programlarında başarıya ulaşmada çok önemlidir (Biçen, 2008).

1.2. Bitkilerde Demir (Fe) ve Demir Noksanlığı

Yer kabuğunun % 5' ini demir oluşturur. Topraklar genellikle demir açısından zengin olmasına karşılık ortamda Ca'un fazla olması ve havalanması uygun olmayan toprak şartlarında bitkiler demirden faydalanamazlar. Bitkiler demiri daha ziyade Fe_2^+ formunda alırlar. Bazen de Fe_3^+ formunda alabilirler. Ayrıca demir kleytleri olarak da alınabilmektedir. Demir hangi formda alınırsa alınsın bitki bünyesinde Fe_2^+ formuna dönüşmeden kullanılamaz. Yüksek kalsiyum olduğunda yani toprak pH'sı yüksek iken demir bileşikler Fe_2^+ ve Fe_3^+ formlarına indirgenemez. Öte yandan bikarbonat iyonları da demirin hareketliliğini azaltarak, alımını azaltabilirler. Topraktaki kirecin çözünmesinde CO_2 'in önemli etkisi vardır. Havasız koşullar da CO_2 oluşumuna sebep olmakta ve bu durum dolaylı olarak demir eksikliğiyle sonuçlanmaktadır. Sıkışık topraklar, uzun süreli sulama, aşırı yağışlar, yüksek taban suyu da demir alımını engelleyen unsurlardır. Toprakta fazla miktarda ağır metal olması da (örneğin mangan) demir eksikliğine neden olmaktadır. Demirin bitkilerdeki fizyolojik işlevi; bir çok enzim sisteminde prostetik grup olarak görev yapan hem hemin maddelerinde yapı elementi olmasıyla ilgilidir (Anonim, 2009a). Demir eksikliği belirtileri öncelikle genç yapraklarda başlar ve yaprak damarları arasında sararma dikkat çeker. Görünümleri oldukça tipiktir. Kolayca tanınırlar. En ince damarlar dahi yeşil kalarak bu damarlar arasındaki renk tamamıyla sarıya döner. Şiddetli noksanlıkta damarlar da sararabilir. Demir noksanlığı bitkilerde büyümenin,

dayanıklılığın, direncin ve verimliliğın azalmasına neden olmaktadır (**Daşgan, 1999**). Noksanlığı belirlemek için toprak ve yaprak analizi yapılması uygundur. Tüm bitkilerde demir klorozu görülebilmektedir. Elma, armut, şeftali, kiraz, vişne, ayva, turunçgiller, asma, antepfıstığı ve çilek en duyarlılarıdır (**Anonim, 2009a**). Demir klorozu belirtisi gösteren bir turunçgil yaprağı **Şekil 1.1.**'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Demir klorozu belirtisi gösteren bir turunçgil yaprağı

Ülkemizin de içinde yer aldığı Akdeniz Havzasındaki meyve ağaçlarının %20-50 'si demir klorozu ile ilgili sıkıntı yaşamaktadır (**Pestana ve ark., 2005**). Turunçgil tarımının yoğun olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesinde Dünya toplam turunçgil üretiminin %22'si karşılanmaktadır ve Türkiye'nin bu üretimdeki payı % 2.5 dır (**FAO, 2006**). Turunçgiller demir klorozuna hassas olarak bilinirler ve yüksek miktarda kireç içeren topraklarda, turunçgil bitkilerinde en sık görülen beslenme problemi demir klorozudur (**Choliaras ve ark., 2004**).

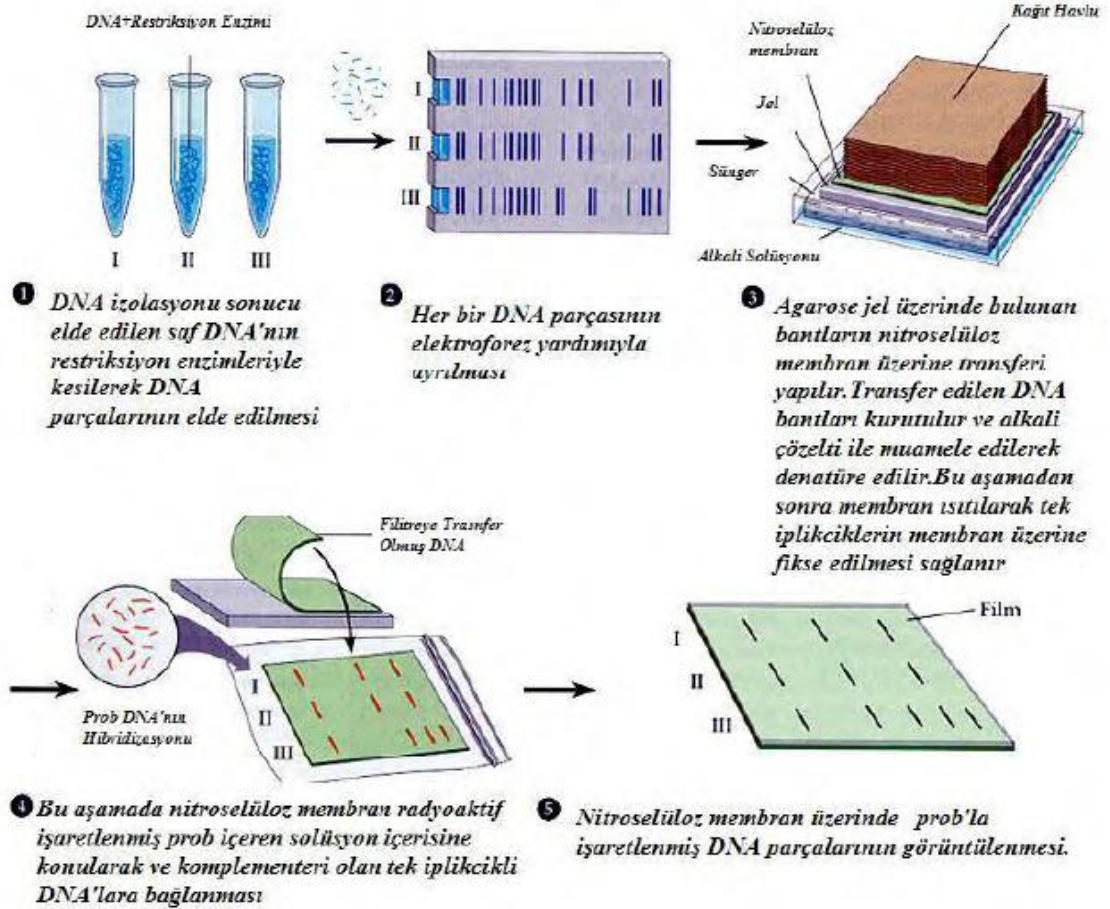
Akdeniz Bölgesi turunçgiller yetiştiriciliği abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin tehdidi altındadır. Trizteza virüsünün ve bunun vektörü olan *Toxoptera citricida* zararlısının yayılması halinde tuzluluk ve kireçliliğe yeterli toleransı gösteren turunç anacının kullanımı sınırlı hale gelecektir. Bu nedenle turunca alternatif olabilecek yeni anaçların seçimine ihtiyaç duyulmaktadır (**Ollitrault ve ark., 2006**).

1.3. Moleküler Markırlar

Geride bıraktığımız yüzyılda DNA'nın keşfi ve Moleküler Biyoloji biliminin hızla ilerlemesi ile ortaya çıkarılan birçok moleküler teknik sayesinde bitki moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları da hızla artmış ve ıslah programlarında uygulanmaya başlanmıştır. Moleküler markırların kullanım alanı olarak; bitki tür ve çeşitlerinin DNA parmak izlerinin belirlenmesi ile yapılan taksonomik çalışmalar, genetik haritalama çalışmaları, moleküler işaretleyiciler yardımıyla yapılan erken seleksiyon çalışmaları, Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) tanımlanması, mutasyonların belirlenmesi, varlığını bildiğimiz genlerin allelik çeşitliliğinin araştırılması ve bunun gibi pek çok çalışma sayılabilir. Genetik kaynakların yönetiminde genotiplerin tanımlanması ve fenotipik olarak benzer olanların birbirlerinden ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Bu anlamda moleküler markırların kullanılması hız ve kolaylık sağlamaktadır (**Roose, 1988**). Moleküler markırlar, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ebeveynlerin ortaya konulması, farklı turunçgil türleri arasındaki filogenetik ilişkilerin saptanması çalışmaları için önemli bir araçtır (**Barkley ve ark., 2006**). Bu konuda kullanılan yöntemler; izoenzimler, RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) ve ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) ve diğer markır sistemleridir (**Whitkus ve ark., 1994**). AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği gerek bir tek jel üzerinde çok sayıda bant verebilmesi gerekse de spesifik markırlar verebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (**Zabeau ve Vos, 1993**). Turunçgillerde de genetik çeşitliliğin ve akrabalık düzeylerinin ortaya konulması amaçlarıyla bu moleküler markır sistemleri kullanılmaktadır.

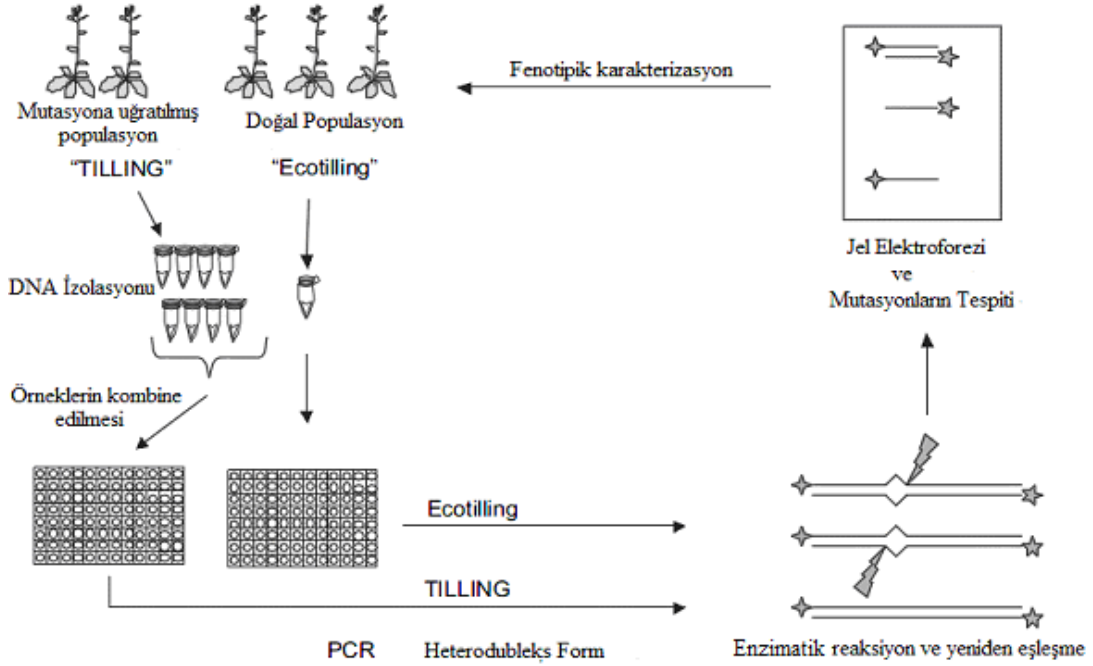
Mutasyonların tespiti, allelik çeşitliliğin araştırılması ve genetik ilişkilerin belirlenmesi amacı ile kullanılan en eski ancak halen geçerliliğini koruyan yöntemlerden biri RFLP (Restriction Fragment-Length Polymorphism) (Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi) markırlarıdır. Farklı bireylerin genomları arasında bazların dizilimi yönünden farklılıklar söz konusudur. Buna DNA polimorfizmi denir. Mendel Yasalarına göre nesilden nesile aktarılan bu kalıtsal değişiklikler çoğunlukla DNA düzeyinde tek bir bazın değişimi yada genin küçük yada büyük bir bölümünün eksilmesinden kaynaklanabilir. Eğer bu değişiklikler bir restriksiyon enziminin kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına sebep olursa kolaylıkla saptanabilir. DNA sarmalı özgül restriksiyon endonükleaz ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu fragmentler RFLP olarak adlandırılır. RFLP'ler bir çok durumda marker olarak kullanılır (**Öner, 2002; Bozkurt ve Algüneş, 2000; Pazarbaşı, 2003**). RFLP analiz aşamaları **Şekil'1.2.** üzerinde sunulmuştur.



Şekil 1.2. RFLP Analiz Aşamaları (Anonim, 2007; Açar, 2007)

Mutasyonların ve genetik yapıdaki farklılıkların tespitinde kullanılan diğer bir yöntem ise TILLING ve EcoTILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genome) dir. TILLING ve EcoTILLING doğal polimorfizmler ve mutasyonların hızlı şekilde belirlenmesinde kullanılan birbirlerine çok yakın yöntemlerdir (Henikoff ve ark., 2004). TILLING yöntemi birbirini takip eden ve birkaç basamaktan oluşan bir prensiple çalışır (Till ve ark., 2006). TILLING yönteminde ilk işlem EMS gibi nokta mutasyonu teşvik eden bir kimyasalla tohumlarda mutasyon teşvikidir. Tohumlardan M1 bitkilerinin elde edilmesi ve M1 bitkilerinin kendilenmesi sonucunda M2 bitkileri elde edilir ve bu bitkilerden mutasyon taraması için DNA izolasyonu gerçekleştirilir (Colbert ve ark., 2001). Mutasyona teşvik edilen bitkisel materyale ait DNA'lar uygun şekilde karıştırılarak bir havuz

oluşturulur ve PCR reaksiyonu hazırlanır. PCR amplifikasyonu için Forward 5' ucu floresan boya ile etiketlenmiş primer ve Reverse 5' ucu floresan boya ile etiketlenmiş primerler kullanılır. PCR amplifikasyonundan sonra amplifikasyonu sağlanan DNA materyalinin ilk önce denatürasyonu ve ardından tekrar renatürasyonu gerçekleştirilir. Bu basamakta mutasyon içeren DNA zinciri ile mutasyon olmayan DNA zinciri arasında yanlış bir eşleşme sonucu heterodupleks bir yapı oluşacaktır. Oluşan bu yanlış eşleşmeler ilgili DNA materyalinde mutasyon olduğunun tespiti için. Bu yanlış eşleşmeleri kesmek için tek zincir spesifik nükleazlar ile örnekler inkübasyona tabi tutulur. Reaksiyon sonlandıktan sonra DNA saflaştırılması yapılır ve DNA'lar floresan etiketle çoğaltılmış DNA parçalarını tanıyan poliakrilamid jel sistemlerinde koşturulur. PCR amplifikasyonunda kullanılan Forward ve Reverse primerlerin farklı dalga boylarına göre etiketlenmesinden dolayı çoğalan DNA parçaları farklı iki tabaka ile görüntülenebilir. Mutasyon içeren DNA parçaları yanlış eşleşme sonrasında uygun kesim enzimiyle kesildiği için bu iki tabakada PCR ürününün genel boyutunu oluşturan ve birbirini tamamlayan iki DNA bandı gözlenir. Bu şekilde birbirini tamamlayan iki DNA bandı gözlemlendiği zaman bu örnekte mutasyon olduğu tespit edilmiş olmaktadır ve ilgili DNA'ya ait sekanslama işlemi gerçekleştirilerek mutasyonun tipi belirlenebilir (Till ve ark., 2006). Ecotilling ve Tilling analiz aşamalarını gösteren **Şekil 1.3**'te gösterilmiştir.



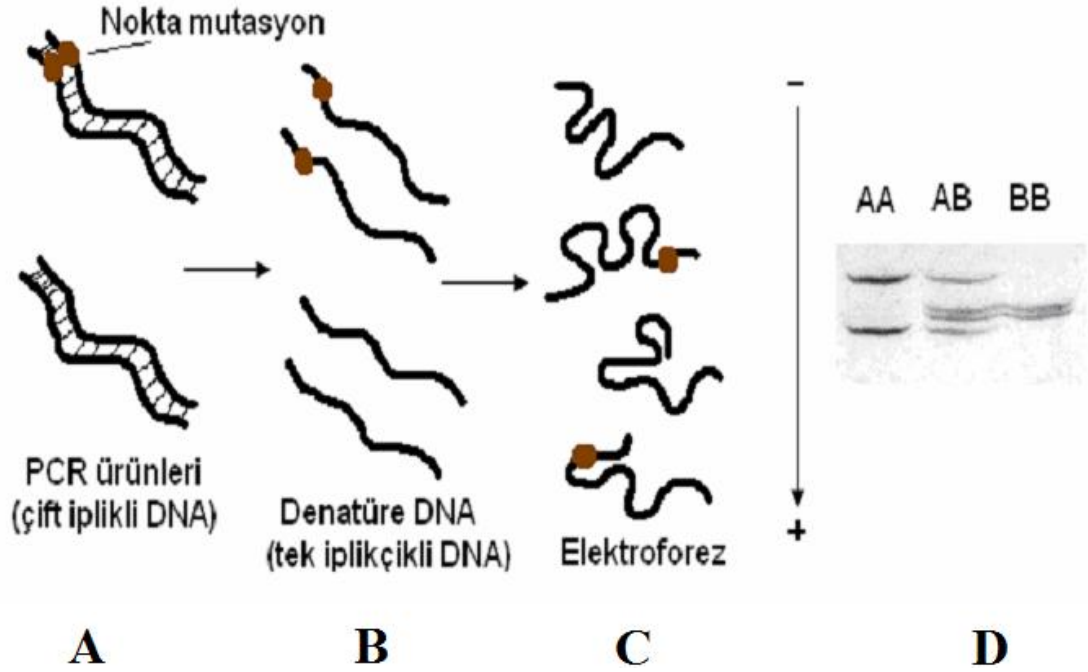
Şekil 1.3. TILLING ve ECOTILLING analiz aşamaları (Till ve ark., 2006).

Mutasyonların tespiti için kullanılan ve bu tez çalışmasında da kullanılmış olan diğer bir yöntem ise SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) dir. SSCP, PCR kullanımını içeren mutasyon saptama yöntemlerinden birisidir (Öner, 2002). SSCP, tek zincir DNA nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (=ikincil yapının) oluşmasına ve poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon içeren DNA molekülü tek bir baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir bant oluşturacağı için nondenatüre jel elektroforezinde normalden farklı yerlerde bantlar gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek bu yöntem ile karşılaştırıldığında normalden farklı bant(lar)ın bulunması örnekte mutasyonun varlığını göstermektedir (Öner, 2002; Tuli, 2001; Kocatürk Sel, 2005).

SSCP analizinin duyarlılığı yani mutasyonları tarama özelliği %35-100 arasında değişir (Solak ve ark., 2000). Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri incelenen DNA fragmentinin uzunluğudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığında düşme olur. Örneğin 300 bç'den kısa DNA parçalarında başarı %99 dolayında iken 300-450 bç'lik DNA parçalarının

incelenmesinde aynı oran %90 seviyesine düşmektedir. SSCP'nin uygulandığı mutasyon analizlerinde PCR ürünlerinin küçük tutulması istenir. Bu yöntemde önce, ya uzun DNA molekülünün RE (restriksiyon enzimi) ile kesimi ya da PCR yöntemi ile küçük DNA fragmentleri elde edilir. Sonra bu çift sarmallı DNA fragmentleri denatüre edilerek tek sarmallı hale getirilir. Daha sonraki aşamada ise non-denatüre koşullarda poliakrilamid jel elektroforezi yapılır **(Solak ve ark., 2000)**. SSCP mutasyon analizleri için olduğu kadar, polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem jel üzerindeki molekülün elektroforetik hareketine bağlı olarak işlemektedir. Bu yöntemde denatüre olmayan ortamlarda tek sarmal DNA'nın katlanıp molekül içindeki etkileşimlerle aldığı konuma (konformasyona) göre değerlendirme yapılmaktadır. Tek sarmal konformasyon polimorfizmi analizinde tek bir nükleotiddeki değişim katlanmayı ve yeniden şekillenmeyi değiştirir. Bu değişim elektroforetik mobiliteye de aynı düzeyde etki yapmaktadır. Dolayısıyla diğer bazı mutasyon analiz yöntemlerinde olduğu gibi heterozigot konumdaki bir değişim elektroforetik olarak dört farklı tek sarmal DNA bandı vermektedir **(Şekil 1.4. D)**. Bu dört bant normal allelin anlamlı ve anlamsız dizisi ile mutant allelin anlamlı ve anlamsız dizisini içermektedir **(Solak ve ark., 2000)**. SSCP'nin kullanım alanları arasında, mutasyonların tespiti, allelik çeşitliliğin belirlenmesi, genetik ilişkilerin belirlenmesi, genetik haritaların oluşturulması gibi analizler sayılabilir. SSCP tekniğinin Ko-dominant özellik göstermesi de önemli bir avantajdır, böylece heterozigot karakterlerin ortaya çıkarılmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı; turunçgil anaçlarında demir klorozu ile ilgili genlerin allelik çeşitliliklerinin saptanması ve böylece turunçgil anaçlarının bu genler açısından genetik ilişkilerinin tespiti ile turunçgiller için demir klorozuna dayanıklı yeni anaç ıslahı çalışmalarına yol göstermesidir.



Şekil 1.4. SSCP Analiz Aşamaları; A) PCR reaksiyonu sonucu elde edilmiş mutasyon içeren DNA ürünleri. B) PCR ürünlerinin denatürasyonu sonucu elde edilmiş tek zincirli DNA parçaları. C) Denatüre edilmiş PCR ürünlerinin kendi konformasyonlarında kıvrılmaları sonucu jelde farklı hareket etmeleri. D) Kendi konformasyonlarında kıvrılmış DNA parçalarının non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda ki görüntüleri.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgillerde moleküler anlamda birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar halen günümüzde de hızla devam etmektedir. Ancak bugüne kadar turunçgillerde demir klorozundan sorumlu genlerle ilgili herhangi bir allelik çeşitlilik çalışması ya da mutasyon tespit çalışması yapılmamıştır.

2.1. Turunçgil Taksonomisi ve Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Çalışmaları

Turunçgil taksonomisi konusundaki ilk çalışmalar genelde morfolojik markırlar kullanılarak yapılmış ve sistematikçiler arasında baştan itibaren turunçgillere bağlı türlerin sayısı ile ilgili tartışmalar süregelmiştir. Turunçgil taksonomisinde iki ana sistem gelişmiştir. Bunlar Swingle (**Swingle 1943; Swingle ve Reece 1967**) ve Tanaka (**1977**)'nın geliştirdiği sistemlerdir. **Swingle (1943)**, *Citrus* cinsi için 2 altcins (*Eucitrus* ve *Papeda*) ve bunlara ait 16 tür önerirken; **Tanaka (1969)**, 2 alt cins (*Archicitrus* ve *Metacitrus*) ve bunlara ait 159 türün var olduğunu belirtmektedir (**Swingle, 1967 ; Davies ve Albrigo, 1994**). Swingle, bilinen türlerin morfolojik özelliklerini gösteren formların tür olarak tanımlanmadan önce melez olmadıklarının doğrulanması gerektiğini belirtmektedir. Bu görüş, bir taksonomik sistem içerisinde olası değişimleri en aza indirmek gibi bir avantaja sahiptir. **Hodgson (1965)**, Swingle tarafından kabul edilen 16 türü geliştirerek bunu 36 türe çıkarmıştır.

Tanaka temelde, Swingle gibi aynı türleri benimsemekle beraber, her bir türü daha dar bir kavramla ele alarak bunlarla ilişkili tiplere, melez olarak bilinseler de ek özel adlar vermiştir. Tanaka botanik çeşit yada melez olarak bilinen birçok formlara tür statüsünü vermektedir. Tür sayısının bu gibi üretkenliğinin doğrulanması tartışmalı ise de *Citrus* cinsi içindeki tür kavramının net bir tanımı eksik kalmaktadır. Tanaka'nın sistemi bir çok turunçgil türü bakımından morfolojik tanımlamalar sağlamaktadır (**Şeker, 1999**).

Reece, (1969), *Citrus* cinsi içerisindeki sınıflandırmayla ilgili çalışmasında, bu konudaki iki temel sistem olan **Swingle (1943)** ve **Tanaka (1954)** sistemlerini

karsılaştırmıştır. Swingle'nin sistemini biyolojik konseptte uygun olarak bulan Reece, Tanaka'nın sistemini ise daha çok faydacı olarak değerlendirmiştir.

Torres ve ark., (1978), yaprak izoenzimlerini kullanarak turunçgillerdeki genetik benzerlikleri araştırmışlardır. Mandarin içerisinde diğer türlere göre daha fazla varyasyonun olduğu bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan limonlar içerisinde sadece 'Ponderosa' limonu diğerlerinden farklı olarak tespit edilmiştir. Diğer 15 limon çeşidinde bulunan *W* alleli bu çeşitte bulunamamıştır. Daha önceki çalışmalarda limonun ağaç kavunu ve laym melezi veya ebeveynlerinden birinin kaba limon olduğu görüşünün bulunduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmada tüm limonlarda *Pgi-1* geni için *W* alleli bulunurken, ağaç kavunu ve laymlarda bu allel bulunamamıştır. Bu allelin turunç ve mandarinde var olduğu ortaya konulmuştur.

Ollitrault, (1990), turunçgillerin genetik yapısının ortaya konulması amacıyla, moleküler markırların kullanımının bu konuda kapsamlı çalışmaların yapılmasına geniş olanaklar tanıdığını belirtmektedir. Bu amaçla sekonder metabolitler, izoenzimler ve DNA tekniklerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini belirtmiştir. Özellikle izoenzim ve RFLP tekniklerinin, turunçgillerde genetiksel yapının ortaya konulması, çeşit tanımlaması, allel çeşitliliği ve heterozigoti, turunçgil cins, tür ve akrabaları arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konulması, nuseller ve zigotik orjinli bitkilerin ayırt edilmesi, In vitro kültürlerinin monitörize edilmesi ve gen haritalandırmaları amacıyla kullanılmakta oldukları da bildirilmektedir.

Yamomota ve ark., (1993), Citrus, Fortunella ve Poncirus cinsinde yer alan 28 tür ve çeşidi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemiyle tanımlamışlardır. Bunlar, Mitokondrial DNA analizlerine göre, Citrus ağaç kavunu, şadok ve mandarin olmak üzere başlıca 3 gruba; ayrıca şadok grubu şadok ve yuzu olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. Şadok alt grubu şadok, altıntop, limon, turunç, portakal, *Citrus reticulata*, *C.natsudaidai*, *C. hassaku*, *C. sudachi*, *C. hyuganatsu* ve *C. iyo*'yu kapsamıştır. Yuzu alt grubu, Yuzu (*Citrus junos*) ve Meksika laymını (*Citrus aurantifolia*); mandarin grubu ise mandarin (*Citrus reticulata*) ve portakal X mandarin melezlerini kapsamıştır. Poncirus cinsi, Citrus ve Fortunella'dan uzak bulunmuş; bununla beraber, Fortunella cinsinin mitokondrial genomu Yuzu ve layma

benzer olduğu için Citrus'dan ayrılamamıştır. Kloroplast DNA analizlerinde ise, 2 grup oluşmuştur. Poncirus, Fortunella, Microcitrus, ağaç kavunu, Yuzu, Kalamodin ve mandarin grubuna dahil edilen çeşitler benzer fragment örneğini gösterirken, şadok alt grubundakiler ve laym diğer fragment örneğini göstermiştir.

Fang ve Roose, (1997), 48 üç yapraklı klonunda izoenzim, RFLP ve ISSR markırları ile genetik çeşitliliği araştırmışlardır. İzoenzim ve RFLP analizlerinde çok az polimorfizm elde edilebilmiştir. RFLP ve ISSR markırlarında polimorfizm % 10 olarak saptanmıştır. ISSR markırları ile üç yapraklılar dört ana gruba ayrılmışlardır. *P. trifoliata*'nın orijini Çin'in ılıman bölgeleri iken, Citrinae altsoyundaki diğer türlerin orijini tropik ve subtropik bölgeler olarak belirtilmiştir. Üç yapraklılar içerisinde büyük çiçekli genotipler ile küçük çiçekli genotipler genetik olarak ayrı gruplarda yer almışlardır. Son dönemlerde Çin'den getirilen üç adet genotip farklı markırlara sahip bulunmuş ve değerli ıslah kaynakları olarak gösterilmiştir.

Novelli ve ark., (1998), 31 portakal çeşidinde Mikrosatellit markırları kullanarak 18 primerle çeşitleri değerlendirmeye çalışmışlar; ancak turuncgil tür ve akrabalarında başarılı sonuçlar veren bu yöntemle çeşitler arasında polimorfizm saptamaları olanağı bulunmamıştır. Araştırmacılar, portakalda görüldüğü gibi düşük oranda polimorfizm gösteren vejetatif çoğaltılan türlerdeki çalışma için bu moleküler marker tiplerinin uygun olmadığını ve portakalda yeni mikrosatellit primerlerinin geliştirilmekte olduğunu bildirmişlerdir.

Nicolosi ve ark., (1999), Citrus cinsine ait 36 ve Poncirus, Fortunella, Microcitrus ve Eremocitrus cinslerine ait birer türde RAPD, SCAR ve cpDNA markırlarıyla turuncgillerin filogenisini araştırmışlardır. Fortunella'nın Citrus cinsine yakın, diğerlerinin Citrus cinsinden ve birbirlerinden uzak olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar Swingle sistematğinde olduğu gibi, Citrus cinsinde Eucitrus ve Papeda olmak üzere 2 alt grup oluştuğunu, fakat Citrus celebica ve Citrus indica'nın bu gruplarda yer almadığını belirtmişlerdir. Citrus cinslerinde yer alan hemen hemen bütün türler 3 alt gruba dağılmıştır. Gerçek Turuncgil Grubu'nda yer alan her genotip ve tür kendi cinsi içerisinde yer almıştır. Farklı filogenetik ilişkiler cpDNA verileriyle ayrıca ortaya konmuştur. Eucitrus ve Papeda alt cinsine ayırım ortadan kaldırılarak, Citrus cinsi Tanaka tarafından Archicitrus ve Metacitrus olmak üzere 2

alt cinse ayrılmıştır. *Citrus medica* ve *Citrus indica* diğer *Citrus*'lardan oldukça uzak bulunmuştur. Limon ve Filistin tatlı laymı *Citrus latipes* salkımında liderlik eden Şadok salkımında yer almıştır. *Citrus aurantifolia* ise *Micrantha* salkımına yerleşmiştir. Ayrıca, genetik köklerine göre 17 tür ve çeşidin genetik orijini araştırılmıştır. Limonunun ağaç kavunu x turunç; Rangpur laymı ve kaba limonun ise ağaç kavunu x mandarin melezi olduğu varsayılmıştır. Diğer yandan, elde edilen verilere göre Meksika laymı için *Citrus micrantha*'nın ana ve *Citrus medica*'nın baba olduğu bildirilmiştir.

Gülşen ve Roose., (2001), Seksen-üç limon çeşidi, bazı akraba türler ve bazı ebeveyn olduğu söylenen şadok (*C. maxima*), ağaç kavunu (*C. medica*) ve mandarin (*C. reticulata*) arasındaki genetik çeşitlilik ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri saptamak amacı ile izoenzimleri, ISSR (inter-simple sequence repeats) ve SSR (microsatellite) markırlarını kullanmışlardır. Çalışılan limonlar arasında izoenzimler çok az varyasyon gösterirken 8 ISSR primeri toplam 103 polimorfik fragment retmiştir. Benzerlik katsayıları hesaplanmış ve tartılmamış çift grup aritmetik ortalama metodu ve gruplandırma analiziyle (UPGMA) genetik ilişkileri gösteren filojenik ağaç oluşturulmuştur. Bütün limonlar, kaba limonlar, tatlı limonlar ve hibrit olduğu düşünülen bazı tipler ağaç kavunlarıyla aynı grupta yer almıştır. Altmış-iki limondan 48 tanesi genetik olarak aynı bulunmuştur. Araştırmacılar bu nedenle 48 limonun çok fazla genetik değişiklikleri içermeyen klonal ebeveynlerden mutasyonlar sonucu oluştuğunu savunmuşlardır. Ağaç kavunlarının limon, kaba limon, tatlı laym ve tatlı limonların çekirdek DNA'larının büyük bölümünü oluşturduğu, ISSR markırları kullanılarak tespit edilmiştir. Limonlardan bazı *C. reticulata* ve *C. maxima* spesifik ISSR markırları tespit edilmiştir. ISSR markırlarında olduğu gibi, çalışılan SSR markırları da limonlar arasında genetik varyasyon göstermemiştir, fakat taksonomik olarak nispeten birbirinden uzak gruplar arasında önemli varyasyon saptanmıştır.

Yeşiloğlu, (2002), Turunçgil cins, tür ve akrabalarından oluşan 30 adet türün RAPD yöntemiyle tanımlanarak turunçgil sistematikteki yerinin belirlenmesi ve türlerin birbirlerine genetik uzaklığının saptanması amacıyla yaptıkları bu çalışmada 10 RAPD primeri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda ; Turunçgil cins, tür ve

akrabaları arasındaki polimorfizm oranı 0.26-0.85 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. ‘İlkel Turunçgil Grubu’nda yer alan *Pleiospermium alatum* ve *Severinia buxifolia* ile ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *Citrus*, *Fortunella* ve *Microcitrus* cinslerine ait türler arasındaki polimorfizmin genel olarak yüksek bulunduğunu, ‘İlkel Turunçgil Grubu’nda yer alan *Pleiospermium alatum* ile ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *Citrus micrantha* türleri arasındaki polimorfizm oranının denemeye alınan türler içerisinde en yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. *Pleiospermium alatum* ile Yakın Turunçgil Grubu içerisinde yer alan *Citropsis gillettiana* arasındaki polimorfizmde yüksek olduğu saptamışlardır. En düşük polimorfizm oranı ise ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *Citrus limonia* ve *Citrus pennivesiculata* türleri arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Aka-Kaçar ve ark., (2005), RAPD yöntemi ile uç kurutan (*Phoma tracheiphila*) hastalığına dayanıklı veya tolerant olarak belirlenmiş olan toplam 16 limon genotipinin moleküler tanılamasını yapmışlardır. Çalışmada kullanılan 100 primer içerisinde 48 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Çalışmada tüm genotiplerin birbirinden farklılıkları ortaya konulmuştur. Ancak Tuzcu 896 ve Tuzcu 897 genotipleri RAPD yöntemi ile birbirinden ayıramadığı gözlenmiştir.

Ağar, (2007), SSR markırları kullanarak yapmış olduğu çalışmada Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tuzcu Turunçgil Koleksiyonunda bulunan *Citrus* tür ve akrabalarına ait 88 adet genotip arasındaki moleküler farklılıklar incelenmiştir. Kullanılan toplam 13 adet mikrosatellit primerlerinden toplam 95 adet polimorfik bant elde etmiş, SSR analizleri sonucunda elde edilen veriler ile *Citrus* tür ve akrabaları arasındaki genetik benzerlikler ve buna dayalı olarak dendrogram oluşturulmuştur. Tez çalışması kapsamında kullanılan mandarin, portakal, turunç, altıntop türleri aynı alt gruplarda toplandıkları belirtilmiştir.

Abkenar ve ark., (2008), Japonya’da yetiştirilen asitli turunçgilleri organel DNA kullanarak RFLP markırlarıyla genetik olarak karşılaştırmışlardır. Kloroplast DNA varyasyonlarına göre asitli turunçgiller üç farklı gruba ayrılmış ve üç gerçek turunçgil türü birbirlerinden ve *C.ichangensis*’den ayrı gruplarda yer almışlardır. Kullanılan genotiplerin çoğu turunç-şadok grubu içerisinde yer almıştır. Swingle ve Reece (1967), tarafından *C.ichangensis* ve mandarin melezi olarak kabul edilen

Yuzu'nun kloroplast DNA'sında *C.ichangensis*'den farklı kalıplar elde edilmiştir. Ancak daha ileri çalışmaların *C.ichangensis*'in Yuzu'nun orijini üzerindeki rolünü ortaya koymakta faydalı olacağı vurgulanmıştır. Kloroplast ve mitokondri DNA verilerine göre ağaç kavunun Japon asitli turunçgilleri için ana ebeveyn olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada üç gerçek türden ikisi olan mandarin ve şadok ile

Uzun, (2009), yaptığı çalışmada, ülkemiz turunçgil koleksiyonlarında bulunan turunçgil türleri ve bunların akraba gruplarına ait 825 adet genotipte SRAP markırları ile genetik çeşitliliği ortaya koymuştur. Çalışmada 21 adet primer kombinasyonu kullanılmış ve materyaller tür gruplarına göre sekiz ayrı gruba ayrılarak çalışılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde her grup ayrı olarak değerlendirilmiş ve daha sonra gruplar kombine edilerek toplam on ayrı değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, portakal, limon, altıntop ve turunç türleri içerisinde düşük düzeyde varyasyon olduğu saptanmıştır. Mandarin, şadok ve ağaç kavununun turunçgiller içerisindeki üç temel tür olduğu görüşü bu çalışmada da desteklenmiştir. *Citrus* cinsi içerisinde, limon-ağaç kavunu, şadok-altıntop, mandarin- portakal grupları olmak üzere üç ana grup oluşmuş ve diğer *Citrus* türleri de bunlar arasına dağılmıştır. Gerçek turunçgiller içerisinde *Citrus* cinsine yakınlık olarak diğer cinslerin sıralanması, *Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus* ve *Microcitrus* şeklinde olmuştur. 'Yakın' ve 'İlkel' turunçgiller 'Gerçek' turunçgillerden daha uzakta yer almışlardır. Genel olarak turunçgil sınıflamasında Citrinae altsoyu dışında bulunan materyaller bu alt soydan ayrı ve uzakta yerleştiği gözlenmiştir.

2.2. Turunçgillerde ve Farklı Bitkilerde Demir ve Demir Klorozuyla ilgili Yapılan Çalışmalar

Castle ve Manthey, (1998), 26 farklı Citrus cinsi ve yakın akrabalarının demire dayanıklılık oranlarını belirlemek için yaptıkları çalışmalarında 3 aylık bitkileri kullanmışlardır. Deneme bitkileri Fe içermeyen besin çözeltisiyle büyütülmüş ve genotiplerin demire karşı toleranslılıklarının belirlenebilmesi için Fe^{+3} 'ü indirgeyebilme durumları göz önünde bulundurmuşlardır. Beyaz kök

uçlarından periyodik olarak aldıkları örnekleri redüksiyon kapasitesini belirlemek için test etmişlerdir. En fazla indirgeme kapasitesine sahip olarak Volkameriana limonu, Eureka limonu, Etrog ağaç kavunu, turunç ve Rangpur laymı; en düşük olarak Swingle sitrumelo, Duncan altıntopu, Thong Dee altıntopu, Ridge Pineapple portakalı, üç yapraklı ve bir papeda seleksiyonunu bulmuşlardır. Bir çok genotip ise düşük-orta indirgeme özelliğinde bulunmuştur. Araştırmacılar yüksek tolerans gösterenlerin Citrus cinsi içinde *C. medica* orjinli olanlar olduğunu belirtmiştir. Aynı zamanda Rangpur laymının tamponlanmamış çözeltide pH değerini çok fazla düşürdüğünü (5'in altında) ve tamponlanmamış çözeltideki redüksiyon oranının tamponlanan çözelti yanında daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Abadia ve ark., (1999), Araştırmacılar demir noksanlığının Akdeniz Bölgesi'nin kireçli topraklarında meyve ağaçlarını etkileyen ve en yaygın besin elementi noksanlığı olduğunu ve demir noksanlığının yapraklardaki fotosentetik pigment olan klorofil miktarının azalmasına bağlı olarak yaprakta sararmalar şeklinde kendini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Pestana ve ark., (2001), Troyer sitranjı (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) üstüne aşılı Newhall portakal çeşidinde 0,5,10 ve 20 μM Fe miktarlarını kalsiyum karbonatlı ve kalsiyum karbonatsız koşullarda su kültüründe denemişlerdir. 0 μM Fe ve 5 μM Fe uygulamalarında yaprak klorozu görüldüğünü, yaprak klorofil miktarının azaldığını ve köklerin diğer uygulamalara göre daha küçük olduğunu ve yan dal oluşumunun daha az meydana geldiğini bildirmişlerdir. 0 μM Fe CaCO_3 'lü ve CaCO_3 'süz uygulamalarında oksijen değerlendirme oranını 10 μM Fe uygulamasından daha düşük bulmuşlardır. CaCO_3 'lü 0 μM Fe ve 5 μM Fe uygulamalarında FCR (Fe chelate reductase), 10 ve 20 μM Fe uygulamalarına göre, aktivitesinin önemli derecede artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar köklerdeki FCR aktivitesinin kendi denemelerinde sadece CaCO_3 'lü uygulamalarında görüldüğünü ve bu sonuçlara göre de turunçgillerde Fe noksanlığının FCR aktivitesinin artması için tek başına yeterli olmayacağını bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada tüm CaCO_3 'lü uygulamalarda fotosistem II etkinliği benzer olarak bulunmuş ancak, 0 μM Fe'de bu etkinliğin biraz daha az olduğunu saptamışlardır. Yaprak klorofil konsantrasyonun CaCO_3 'lerde daha

belirgin ve bu değerlerin de 0 µM Fe uygulamasındaki değerlere yakın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırma sonucunda yaprak klorofil konsantrasyonunun Troyer anacı üstüne aşılı Newhall portakallarında önemli derecede azalma gösterdiğini, fotosentetik kapasitenin az miktarda azaldığını ve fotosistem II etkinliğinin çok az miktarda etkilendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca demir klorozu gösteren portakal fidanlarının FCR aktivitesinin CaCO₃ varlığında meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Daşgan ve ark., (2003), Fe klorozuna karşı hassas ve dayanıklı olan iki ayrı domates genotiplerinde yürüttükleri çalışmalarında yaprak klorozu ve toplam demir konsantrasyonunun, demir içeren enzimler ile arasındaki ilişkilerini incelemişlerdir. Demir içeren askorbat peroksidaz, katalaz ve guaiakol peroksidaz enzimleriyle demir içermeyen ancak bir stres parametresi olan glutathione redüktaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre domates genotiplerinde demir klorozuna karşı dayanıklılığın belirlenmesinde demir içeren enzimlerden katalazın, toplam demir konsantrasyonuna göre daha doğru bir parametre olduğunu bildirmişlerdir.

Chouliaras ve ark., (2004), Farklı demir dozlarının (20 µM Fe-EDDHA (pH=6), 0 µM Fe-EDDHA (pH=6), 3 µM Fe-EDDHA (pH=6) ve 0,5 g L⁻¹ CaCO₃ + 10mM NaHCO₃ eklenmiş 10 µM Fe-EDDHA (pH=7,5)) yaklaşık 15 cm boyundaki *Citrus taiwanica* ve *Citrus volkameriana* anaçlarında meydana getirdiği fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Taiwanica ve Volkameriana anaçlarının kök-Fe indirgeme kapasitesi, rizosfer asidifikasyonu, peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ve bitki besin maddeleri birikimi birbirinden farklı bulmuşlardır. Bu fizyolojik parametrelerin turuncgillerdeki screening çalışmalarında demir klorozuna tolerantlığın belirlenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmaları sonucunda Volkameriana anacının demir klorozuna karşı Taiwanica'dan daha hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Chouliaras ve ark., (2004), Turunç (*Citrus aurantium*) ve Swingle sitrumele (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus paradisi* Macf.) üzerine aşılı iki portakal (*Citrus sinensis*) çeşidinin demir noksanlığında katalaz ve peroksidaz aktivitesine, bitki-su ilişkileri, stoma iletkenliğine ve yaprak ağırlıkları parametrelerini

incelemişlerdir. Hoagland besin çözeltisine demir eklemeyerek demir noksanlığı yaratmışlar ve bunun sonucunda da katalaz ve peroksidaz aktivitesi fotosentez, osmotik basınç, turgor ve yaprak ağırlığının önemli derecede azalma gösterdiğini fakat stoma iletkenliğinin ve yaprak su potansiyelinin değişmediğini bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar besin çözeltisine NaHCO_3 (10 ve 40 mM) ekledikleri zaman stoma iletkenliği, fotosentez ve turgor basıncının azaldığını ayrıca yaprak su potansiyeli ve osmotik basıncın arttığını saptamışlardır.

Pestana ve ark., (2005), Troyer sitranjı (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), *Citrus taiwanica* Tan. ve Shim., ve Swingle sitrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus paradisi* Macf.) turuncgil anaçlarını farklı dozlarda (0, 5, 10, 15 ve 20 $\mu\text{mol Fe dm}^{-3}$) demir içeren besin çözeltilerinin 3 anaç üstünde meydana getirdiği değişimleri incelemişlerdir. Besin çözeltisine 1 g dm^{-3} kalsiyum karbonat ekleyerek ortam pH'sını arttırmışlardır. Her bir anaç için sürgün boyu, yaprak sayısı, kök ve sürgünlerin taze ve kuru ağırlıkları deneme sonunda ölçülmüş ve ayrıca yapraklardaki klorofil konsantrasyonunu ve bitki besin madde miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda Troyer sitranjını bu 3 anaç içerisinde demire en tolerant olarak, Swingle sitrumelo anacını en hassas ve Taiwanica'yı ise orta derecede tolerant olarak bulmuşlardır.

2.3. Bitkilerde ve Diğer Organizmalarda Yapılan Bazı SSCP Çalışmaları

Hongyo ve ark., (1993), Yaptıkları çalışmada, SSCP analizleri için kolay, kısa süreli ve radyoaktif olmayan bir metod tanımlamışlardır. PCR ürününün Etidium Bromide boyasıyla muamelesi sonucunda, büyüklüğü 117 bp ile 256 bp arasında değişen PCR ürünlerinin varlığını mini akrilamid jellerde belirlemişlerdir. Çalışmalarında insan p53 ekzon ve K-ras bölgelerini farklı örneklerden amplifiye ederek yöntemi tanımlamışlardır. Tanımladıkları bu metodun daha güvenli ve birçok açıdan daha tasarruflu olduğunu belirtmişler.

Rubio ve ark., (1996), Farklı coğrafik bölgelerden toplanan Tristeza (CTV) virüslerinin kılıf proteinlerini kodlayan genlerde SSCP analizleri ile polimorfizmleri tespit etmişlerdir. İzole edilen 17 adet kılıf proteinin DNA'ya dönüşümü sağlanmış

ve PCR amplifikasyonlarını gerçekleştirmişler ve bir plazmit vektör içerisine yerleştirmişlerdir. Oluşturulan bu klonların PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiş ve PCR ürünü % 8 lik poliakrilamid jelde koşulmuş ve polimorfizmler tespit edilmiştir.

Kjoller ve Rosendahl, (1999), Dört farklı bitki türüne ait köklerden alınan mikoriza çeşitlerinde SSCP markırlarıyla sekans farklılıklarını tespit etmişlerdir. Çalışmada *Glomus consrictum*, *Glomus caledonium*, *Glomus geosporum*, *Glomus coronatum*, *Glomus fragilistratum* ve *Glomus comosseae* türleri kullanılmıştır. SSCP analizleri non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezinde gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan polimorfizmler direk DNA sekansa gönderilerek doğrulanmıştır.

Kong ve ark., (1999), Turunçgil Tristeza (CTV) virüsünde SSCP markırlarıyla genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada Kaliforniya’da Turunçgillerde tanımlanan 5 farklı virüs kullanılmış hem virüsler arasında hem de virüsler içerisinde genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda aynı virüs izolatları arasında bile nükleotid farklılıkları belirlemişlerdir.

Kocatürk Sel, (2004), Spinal Müsküler Atrofi Hastalarında SMN Geni Ekzon 7 ve 8’in Moleküler Analizini SSCP ve RFLP markırlarıyla gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada RFLP yöntemi ile, tüm SMA hastalarında (tiplerine bakılmaksızın) ortalama olarak %92,4 (49/53) oranında SMN1 geni homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonu tespit etmişlerdir. Tiplerine göre de Tip 1 hastalarının %94,7 (18/19)’sinde, Tip 2 hastalarının %91,6 (11/12)’sında, Tip 3 hastalarının % 89,4 (17/19)’ünde homozigot delesyon bulmuşlardır. Ekzon 7 ve 8’de homozigot delesyonu olmayan fakat klinik bulgulara göre SMA hastası olan 4 kişinin, SSCP yönteminde çalışılan farklı elektroforez koşullarından en az birinde kontrollerden farklı yani birleşik heterozigot genotipli hasta olduğunu belirlemişlerdir.

Techaprasan ve ark., (2007), Zencefilgiller familyasına ait 15 türde AFLP ve SSCP markırlarını kullanarak genetik ilişkileri araştırmışlardır. AFLP analizleri sonucunda 6 primer kombinasyonundan 893 parça elde etmişler ve polimorfizm oranını % 99.78 olarak belirlemişlerdir. Morfolojik olarak benzer olan iki türde daha hassas bir metot olan SSCP markırlarını kullanmışlar ve SNP’leri tespit etmişlerdir.

Giannetto ve ark., (2008), Bazı üzüm genotiplerinde meyve renginden sorumlu genlerdeki mutasyonların tespitini SSCP markırlarıyla gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada farklı üzüm genotiplerine ait meyve renklerindeki varyasyonları kolay, ucuz ve hızlı bir şekilde ayırdıklarını belirtmişlerdir. Bazı üzüm genotiplerini meyve renklerine göre beyazdan pempe ya da kırmızıya ve beyazdan yeşile şeklinde ayırmışlardır ve bu ayrımı yapılan genotiplerde meyve renginden sorumlu genlerde SSCP markırları kullanarak DNA sekans farklılıkları tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda farklı meyve rengine sahip üzüm genotipleri karşılaştırıldığında DNA sekans düzeyinde bazı boşluklar olduğu saptanmıştır.

Kuhn ve ark., (2008), Yaptıkları çalışmada bitki türlerinde moleküler markır oluşturmak için daha kolay ve avantajları olan PCR-SSCP markırlarını kullanmışlar ve önermişlerdir. SSR markırları ile birlikte SSCP markırlarında yüksek oranda polimorfizm bilgisi içerebileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar dünya geneline yayılmış 1231 bitkiye ait örnekler kullanarak SSCP markırları ile SSR markırlarını karşılaştırmışlardır ve SSCP markırlarının SSR markırlarına alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada bitki materyali olarak, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi ‘Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonu’, Valenciano İspanya (Instituto Valenciano Investigaciones Agrarias, IVIA) ve Fransa (Agricultural Research Station, SRA; Institut National de la Recherche Agronomique, INRA) Turunçgiller Koleksiyonunda yer alan 35 adet turunçgil anacı kullanılmıştır.

Tez kapsamında kullanılan 35 farklı turunçgil anacı içerisinde, polimorfizmleri belirlemek ve yeni SSCP primerleri dizayn etmek amacıyla, bu popülasyonu temsil eden sekiz turunçgil genotipi seçilmiştir. Genetik farklılıkları belirlemek amacıyla seçilen sekiz turunçgil genotipi ve SSCP analizlerinde kullanılan diğer genotipler **Çizelge 3.1.** ve **Çizelge 3.2.**’de gösterilmiştir. **Çizelge 3.1.**’de sunulmuş genotiplerden “*Citrus reticulata*” Klemantin mandarini ve “*Citrus maxima*” Chandler Şadok haploid olarak seçilmiştir. Seçilen bu sekiz genotip ile direkt DNA sekans çalışmaları yapılmış ve DNA sekans sonuçlarından yeni SSCP primerleri dizayn edilerek **Çizelge 3.2.**’de sunulmuş genotiplerle SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada SSCP markırlarını dizayn etmek amacıyla kullanılan genotiplerin listesi

No	Genotip	Latince İsmi
1	Pomeroy Üç Yapraklısı	<i>Poncirus trifoliata</i>
2	Corsica Ağaç Kavunu	<i>Citrus medica</i>
3	Micrantha	<i>Citrus micrantha</i>
4	Nules Klemantin	<i>Citrus reticulata</i>
5	Kleopatra Mandarin	<i>Citrus reshni</i>
6	Haploid Klemantin	<i>Citrus reticulata</i>
7	Chandler Şadok	<i>Citrus maxima</i>
8	Pink Şadok	<i>Citrus maxima</i>

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal

No	Genotip	Latince İsmi
1	Carrizo Sitranjı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. X <i>Citrus sinensis</i> Osb. 'Washington Navel'
2	C-35 Sitranjı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. X <i>Citrus sinensis</i> Osb. 'Ruby'
3	Citrumelo 4475 (WN)	<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
4	Nasnaran mandarini	<i>Citrus amblycarpa</i>
5	Sunki mandarini	<i>Citrus sunki</i>
6	Shekwasha mandarini	<i>Citrus depressa</i>
7	Fuzhu mandarini	<i>Citrus reticulata</i> 'Fuzhu'
8	Bintangor Sarawak	<i>Citrus reticulata</i> Blanco x <i>Citrus aurantium</i> L.
9	Red Kaba Limon	<i>Citrus jambhiri</i> Lush.
10	Volkameriana	<i>Citrus volkameriana</i> Tan.& Pasg.
11	Rangpur laymı	<i>Citrus limonia</i> Osb.
12	Alemow (macrophylla)	<i>Citrus macrophylla</i>
13	Bigarade Gou Tou turuncu	<i>Citrus aurantium</i> var. Gou tou
14	Maroc Turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.
15	Poncirus Flying Dragon	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
16	Rubidoux üç yapraklısı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
17	Yuvarlak kamkat (Marumi)	<i>Citrus japonica</i> Thunb.
18	Yerli mandarin (willowleaf)	<i>Citrus deliciosa</i>
19	Meksika laymı	<i>Citrus aurantifolia</i>
20	Duncan altıntopu	<i>Citrus paradisi</i> Macfad.
21	Eureka limonu	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.
22	Changsha mandarini	<i>Citrus reticulata</i> Blanco
23	Tuzcu 31 31 turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.
24	Alanya Dilimli portakalı	<i>Citrus sinensis</i> Osb.
25	M. Kleopatre X P. trifoliata 'Swingle'	<i>Citrus reticulata</i> Blanco x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.)
26	Tuzcu Kleopatra Mandarin	<i>Citrus reshni</i> Hort. ex. Tan.
27	Gou Tou Turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.

Üç Yapraklı (*Poncirus trifoliata*): Temel özelliği yapraklarının üç parçadan oluşmasıdır. Ağaçları 4-5 m büyüyen küçük ağaçlardır. Meyveleri küçük, üzerleri pürüzlü ve ince tüylerle kaplıdır. Soğuk havalara dayanıklıdır. Meyveleri önce gri renkli olgunlaşınca açık sarı renklidir. Meyve eti acı-ekşidir. Bol miktarda çekirdeklere sahiptir. Kalın, sivri dikenleri vardır. Çiçekleri beyaz, hoş kokuludur. uçkurutana karşı dayanıklıdır. *Citrus* cinsi için anaç olarak kullanılan en eski tür'dür (Ağar, 2007).

Corsica Ağaç Kavunu (*Citrus medica*): Corsican Ağaç Kavunlarının tatlı bir çeşidi olarak bilinmektedir. Bu genotip ilk olarak 1891 yılında ABD'de tanıtılmıştır ve günümüzde California'da yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonim, 2009c).

Micrantha (*Citrus micrantha*): *Citrus*'larda en küçük meyve ve çiçeklere sahip olan genotip olarak bilinmektedir. Meyveler genelde 5-7 cm uzunluğunda değişmektedir. Meyveleri yenilmemekte olup önemli bir ekonomik değeri bulunmamaktadır (Anonim, 2009c).

Klemantin Mandarin (*Citrus reticulata*): Yerli bir mandarin ile turunc arasında doğal bir melez olduğu sanılan erkenci bir çeşittir. Orta boylu, sık taçlı ağaçlar meydana getirir ve yaprakları mızrak şeklindedir. Meyvedeki tohum sayısı tozlanmaya bağlı olarak değişim gösterir. Meyve iriliği küçük ile orta; meyve şekli ise hafif basık ile yuvarlak arasında değişim gösterir. Meyve kabuğu koyu portakal ile kırmızımsı portakal rengine, orta kalınlıkta, yüzeyi düzgün ve parlaktır. Dilim sayısı 8 - 12 adettir. Meyve eti koyu portakal rengine ve suludur. (Anonim, 2009c).

Chandler Şadok (*Citrus maxima*): Chandler en ünlü şadoklardan bir tanesidir. En çok ABD'de yetiştirilen renkli çeşittir. Çok büyük ağaçları vardır. Verim ortanın üzerindedir. Semitropik ve tropik iklimlere uygundur. Subtropiklerde verim azalmaktadır. Orta mevsim çeşididir (Aralık – Ocak). Meyveler yuvarlak ve orta büyüklüktedir (400 gramdan 1 kilografa kadar). Pürüzsüz, parlak kabuğu orta kalınlıktadır. Sarıdır ancak bazı kırmızılıklar vardır. Orta derecede suludur. Çok tekerlidir ve iyi dengelenmiş asit oranı meyveye hoş bir aroma vermektedir (Anonim, 2009c).

Carrizo Sitranjı: 1894 - 1895 donlarından sonra üç yapraklının soğuklara dayanıklılık özelliğinden yararlanarak yeni anaç elde edilmesi amaçlanmış ve

Swingle tarafından 1897 yılında Carrizo sitranjı, Washington Navel portakalı x Üç yapraklı melezlemesi ile elde edilmiştir. **(Davies ve Albrigo, 1994).**

Birçok nedenlerden dolayı portakal ve altıntoplar için anaç olarak çok yaygın şekilde kullanılmaktadır. Carrizo sitranjı meyveleri çekirdekli ve yüksek oranda nüseller embriyonu göstermektedir ve anaç olarak kolaylıkla çoğaltılabilmektedir. Tohumla çoğaltım ve aşılınması kolaydır Üzerine aşılı ağaçlar kumlu, kumlu - tınlı topraklarda iyi gelişmektedir. Kireçli topraklarda zayıf gelişmektedir. Ancak, kireçli topraklara adaptasyon bakımından üç yapraklı anacından daha avantajlı görünmektedir **(Davies ve Albrigo, 1994).** Kaliforniya' da ve Akdeniz Ülkelerinde anaç olarak başarı ile kullanılmaktadır. Troyer sitranjına göre daha hızlı gelişmekte ve meyve kalitesine daha olumlu etki yapmaktadır. Verimliliği yüksek, meyveye yatması erkendir. Kök nematoduna (*Radopholus similis* Cob.) toleranttır. Uçkurutana dayanıklıdır. Troyer sitranjına göre kuraklığa daha dayanıklıdır. **(Gardner ve Horanic, 1961; Ford 1966; Blondel 1967; Tuzcu, 1978; Özcan ve Ulubelde, 1984; Jackson, 1985 ve Tuzcu, 1994).** İspanya'da portakal, mandarin ve mandarin melezlerinin % 80'ni Carrizo sitranjı üzerine aşılınmaktadır. Güney Afrika 'da da en çok kullanılan anaçlar arasında bulunmaktadır **(Saunt, 2000).**

C-35 Sitranjı: Ruby Kan portakalı ve üç yapraklı anacının melezlenmesi ile elde edilmiş bir anaçtır. *Pytophthora* ve tristeza hastalıklarına tolerant ve nematodlara karşı dayanıklıdır. Soğuklara dayanımı Carrizo sitranjı kadar veya biraz daha fazladır. Ağaçları orta büyüklüktedir ve Troyer üzerine aşılı olanlardan %25 kadar daha küçük taç yapar. Kumlu, kumlu-killi ve killi topraklara uyumu iyidir ancak kireçli topraklara Carrizo sitranjından daha duyarlıdır **(Saunt, 2000).**

Citrumelo 4475 (WN) (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L) Raf.): Duncan altıntopu ile Üç Yapraklı'nın melezlenmesi ile elde edilmiştir. Yüksek pH'lı topraklar için uygun değildir. Tristeza virüs hastalığına dayanıklıdır **(Anonim, 2009c).**

Nasnaran Mandarini (*Citrus amblycarpa*): Kireçli topraklara dayanıklı bir anaçtır. Ancak üzerinde yetişen kalemin meyvelerin iriliğini azaltıcı etkisi vardır. Meyveleri çok küçük, sarı ve asitlidir **(Anonim, 2009c).**

Sunki Mandarinini (*Citrus sunki*): Sunki mandarini Çin’de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tristeza ve Xyloporosis virüs hastalıklarına tolerant ancak exocortise duyarlıdır. Sunki mandarini üzerine aşılı ağaçlar tuzluluğa yüksek tolerant, soğuklara orta derecede dayanıklı ve kireçli topraklara adapte olabilmektedir. Meyve verimi, meyve suyu miktarı ve meyve suyundaki şeker içeriği turunç üzerine aşılı ağaçlardan elde edilen meyvelerle eşit miktarda veya daha üstündür (Saunt, 2000).

Shekwasha Mandarinini (*Citrus depressa*): Meyveleri çok küçük ve turuncu renktedir, meyve kutupları yassılaştırmış şekildedir Bu mandarin çeşidinin ağaçları süs bitkisi olarak ta kullanılmaktadır (Anonim, 2009c).

Fuzhu mandarini (*Citrus reticulata 'Fuzhu'*): Bu mandarin çeşidinin meyve dış görünümü oldukça parlak ve kırmızımsıdır. Orijini muhtemelen Çin’dir ve buradan Japonya’ya taşınmıştır (Anonim, 2009c).

Bintangor Sarawak (*Citrus reticulata Blanco x Citrus aurantium L.*): Mandarin ile turunç melezidir. Kireçli topraklara dayanıklılık göstermektedir.

Red Kaba Limon (*Citrus jambhiri Lush.*): Moleküler markırlar kullanılarak yapılan son zamanlardaki çalışmaların bulguları bize kaba limonun bir mandarin ve ağaç kavunu melezi olduğunu gösterdi. Farklı toprak koşullarına adaptasyon yeteneği yüksektir (Anonim, 2009c).

Volkameriana (*Citrus volkameriana Tan.& Pasg.*): Volkameriana anacının İtalyan kökenli ve limon x turunç melezi olduğuna kabul edilmektedir. Çok yaygın olarak kullanılan bir anaç değildir ve gelecek yıllarda da yaygın kullanılan anaçlar içerisinde yer alamayacağı varsayılmaktadır. Kaba limona benzer şekilde farklı toprak koşullarına adaptasyon yeteneği yüksektir. Ancak sıcak bölgelerde çok kuvvetli ve verimli ağaçlar oluşturmaktadır. Kireçli topraklarda iyi gelişme göstermektedir. Tuzluluğa dayanımı zayıftır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).

Alemow (macrophylla) (*Citrus macrophylla*): Tuzluluğa ve Bor’a dayanıklılığı önemli bir özelliktir. Genelde tüm çeşitlerle iyi uyur. Ancak Tristeza ve Xyloporosis hastalıklarına duyarlı olması nedeniyle daha çok limon ve laymlara anaç olarak kullanılır. Exocortis ve Psorosis hastalıklarına tolerant olarak

görülmektedir. Üzerine aşılı ağaç hızlı büyür ve erken meyveye yatar. Ancak bu anaç meyve kalitesini olumsuz etkiler. Soğuklara karşı duyarlıdır. Bu özelliği limon anacı olarak kullanılma imkanını sınırlamaktadır (Anonim, 2009c).

Bigarade Gou Tou Turuncu (*Citrus aurantium* var. *Gou tou*): Bazı hastalıklara dayanıklı olması açısından tercih edilen bir anaçtır. Çin ve Kuzey doğu Asya kökenlidir (Anonim, 2009c).

Yuvarlak Kamkat (marumi) (*Citrus japonica* Thunb.): 'Marumi', yada Yuvarlak Kamkat (*F. japonica* Swing., syn. *Citrus maduremis* Lour.) Meyve şekli yuvarlaktan hafif ovale kadar değişiklik gösterir. Meyvelerinin ortalama ağırlığı 10-12 g'dır. Meyve başına 3-6 adet tohum bulunur (Saunt, 2000).

Yerli Mandarin (willowleaf) (*Citrus deliciosa*): Bu çeşidin 1800'lü yıllardan beri Akdeniz çevresinde yetiştirildiği bilinmektedir. Orta boylu, yayılan ve sarkmış bir ağaçtır. Dallar mızrak gibi incedir. Meyve; orta büyüklükte, pürüzsüz, hafif kenardan basık, mis kokulu portakal rengindedir. Meyve eti, sulu, tatlı, hafif portakal tadı verir (Anonim, 2009c).

Duncan altıntopu (*Citrus paradisi* Macfad.): Duncan altıntopu Florida'ya götürülen ilk altıntoptur. Ağaçları kuvvetli büyür, büyük taç yapar ve çok verimlidir. Meyveleri Marsh altıntopundan daha iridir ve soğuklara yine daha dayanıklıdır. Meyvelerinde 30-50 adet tohum/meyve bulunur (Tuzcu, 1999).

Eureka limonu (*Citrus limon* (L.) Burm. f.): Eureka ilk olarak 1850'li yıllarda tohumlarının sicilyadan California'ya gelmesi ile yetiştirilmeye başlanmıştır. Genel olarak meyve hasatı kışın sonu ya da ilkbaharın başlangıcında olmaktadır (Anonim, 2009c).

Changsha Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco): Changsha soğuğa karşı olan toleransı sayesinde son dönemlerde soğuk bölgelerdeki kullanımında artış gözlenmiştir. Changsha meyvelerinin olgunlaşması erken sonbaharda olmaktadır. Meyveleri oldukça tatlı ve suludur. Ayrıca bu çeşit meyve suyu sanayinde ve süs bitkisi olarak ta kullanılmaktadır (Anonim, 2009c).

Tuzcu 31 31 Turuncu (*Citrus aurantium* L.): 1974 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi'nden selekte edilmiştir (Yeşiloğlu, 1982). Küçük yapılı, dik habitüs formulu, soğuğa dayanıklı bir turunçtur (Demirkese, 1993).

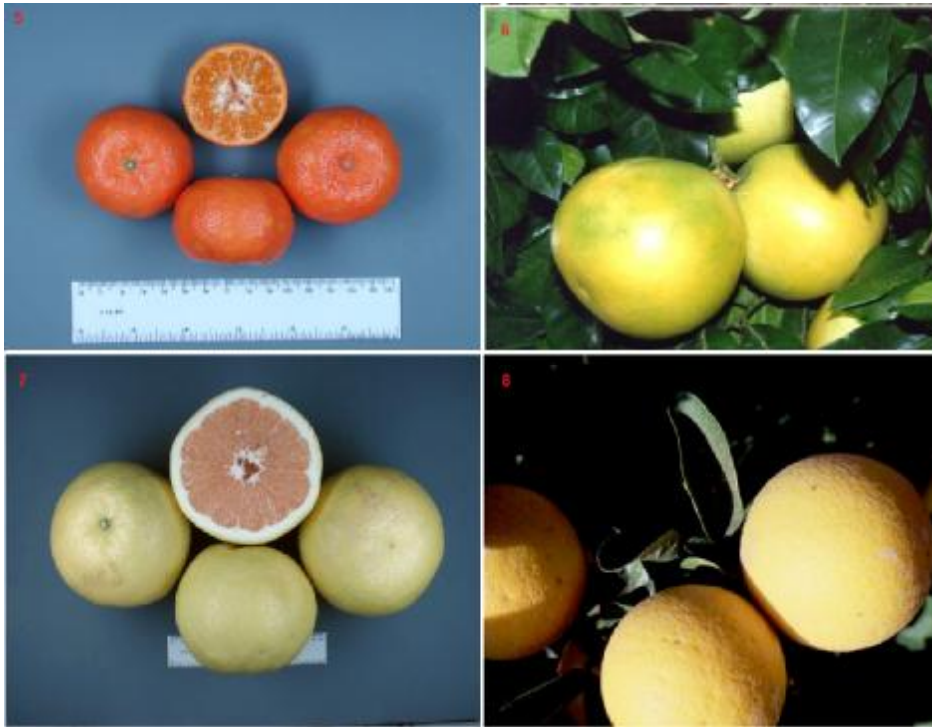
Alanya Dilimli Portakalı (*Citrus sinensis* Osb.): Kökeni üzerinde kesin bir bilgi bulunmayan Alanya ve yakın çevresinin ekolojisi dışında özelliklerini kaybeden yöresel yerli portakal çeşididir. Türkiye'de sadece Alanya ve çevresinde yetiştirilmekte, günümüzde giderek önemini yitirmekte ve yeni dikim alanlarında yer alamamaktadır. Kabuk, açık portakal rengindedir. En önemli özelliği, kabuk üzerinde sap tarafından stil ucuna doğru 4-8 arasında değişen sayıda olukların bulunmasıdır. Kabuk kalınlığı 4.06 mm'dir. Olgunluk ilerledikçe kabuk kalınlığı inceler. Kabuk hafif pürüzlü, kabuğun ete bağlılığı gevşek, meyve eti koyu portakal renginde ve çok suludur. Meyveler küçük veya orta büyüklükte ve yuvarlak şekillidir. (Anonim, 2009c).

M. Kleopatre X *P. trifoliata* 'Swingle' (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.): Kleopatra mandarini ile Swingle melezidir.

Tuzcu Kleopatra Mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan.): Kleopatra mandarini dünyada yaygın olarak kullanılan bir anaç değildir. Ancak son yıllarda anaç olarak kullanımını artıracak önemli özellikleri gözlemlenmiştir (Davies ve Albrigo, 1994). Florida'da hala yaygın olarak kullanılan anaçlardan biridir. Portakal çeşitlerinden de Hamlin için yaygın olarak kullanılmakta, diğer portakal çeşitlerinde özellikle de Valencia portakalında düşük verimlilik görülmektedir. Kleopatra üzerine aşılı altıntop çeşitlerinin meyve kalitesi mükemmel olmakta ancak, ağaçlarda düşük verimlilik ve küçük meyve oluşumuna neden olmaktadır. Kleopatra mandarini değişik toprak koşullarına kolayca uyum sağlayabilmektedir. Hafif tuzlu topraklardan ağır killi topraklara kadar oldukça geniş uyum yeteneğine sahiptir. Kumlu - ağır killi topraklarda iyi gelişmektedir. Yüksek tuzluluk ve pH'ya dayanıklıdır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).



Şekil 3.1. Pomeroy Üç Yapraklısı (1), Corsica Ağaç Kavunu (2), *Citrus micrantha* (3), Nules klemantin (4) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.2. Kleopatra mandarin (5), Chandler Şadok (6), pink şadok (7), Carrizo Sitranjı (8) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.3. C35 Sitranjı (9), Citrumelo 4475 (WN) (10), Nasnaran Mandarinini (11), Sunki Mandarinini (12) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.4. Shekwasha Mandarinini (13), Fuzhu Mandarinini (14), Kaba Limon (15), Volkameriana (16) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.5. Alemow (macrophylla) (17), Bigarade Gou Tou Turuncu (18), Poncirus flying-dragon (19), Poncirus rubidoux (20) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.6. Yuvarlak Kamkat (21), Yerli Mandarin (22), Meksika Laymı (23), Duncan Altıntopu (24) (Anonim, 2009c).



Şekil 3.7. Eureka limonu (25), Changsha mandarini (26) (Anonim, 2009c).

3.1.1. Demir Klorozuna Dayanaıklılıktan Sorumlu Aday Genler

Allelik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla 3 farklı aday gen belirlenmiştir. Aday genler turuncgil EST (Expressed Sequence Tag) ve *Arabidopsis thaliana* genom bilgisi kullanılarak seçilmiştir. Belirlenen aday genler, kısa adları ve *Arabidopsis thaliana* lokus isimleri **Çizelge 3.3.**'te sunulmuştur.

Çizelge. 3.3. Demir Klorozundan Sorumlu Aday Genler

Gen Adı	Kısa Adı	<i>Arabidopsis</i> Lokus Adı
Iron-Sulfur Assembly Protein	Fe-S	AT2G16710
Root Iron Transporter	IRT1	AT4G19690
Vacuolar Metal Transporter	Nramp3	At2g23150

Çalışmada allelik çeşitliliğin belirlenmesi için kullanılan demir klorozundan sorumlu 3 aday genden “Iron-Sulfur Assembly Protein” (Fe-S) geninin fonksiyonu bitkilerde tam olarak bilinmemekle beraber hayvan hücrelerinde demir taşınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. “Root Iron Transporter” (IRT1) ve Vacuolar Metal Transporter (NRAMP3) genleri ise bitkilerde demir taşınmasından sorumludur.

Tez çalışmasına başlamadan önce bu genlerin demir klorozuna tolerant ve duyarlı turuncgil anaçlarında farklı seviyelerde ifade edilip edilmediğinin analizi

mikroarray çalışmasıyla yapılmış ve mikroarray çalışmasından elde edilen sonuçlar eş zamanlı (Real Time) PCR analizleri ile başka bir çalışmada doğrulanmıştır.

3.2. Metod

Bu çalışma İspanya Instituto Valenciano Investigaciones Agrarias, (IVIA) Genomic Center Abiyotik Stres Laboratuvarı ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2.1. Bitkisel Materyalin Alınması ve DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerden DNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla genç yapraklar toplanmıştır. Toplanan taze yapraklar saf su ile yıkanmış, alüminyum folyo ile sarılmış ve sıvı azot içerisine batırılmıştır. Her genotipe ait örnekler porselen havan içerisinde sıvı azot ile öğütülerek 0,1 g olacak şekilde 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır (**Şekil 3.4**).



Şekil 3.8. A.Yaprakların Sıvı Azota Daldırılması, B. Yaprakların Sıvı Azotta Öğütülmesi, C. Örneğin Santrifüj Tüplerine Doldurulması, D. Sıvı Azottaki Santrifüj Tüplerinin Saklama İçin Alınması

3.2.2. DNA İzolasyonu için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (**Johnstone ve Thompson, 1991**). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği **Çizelge 3.4**'te sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform:izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, EDTA: 0.5 M pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği

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

DNA İzolasyon Aşamaları; (Şekil 3.5.)

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

- Ø Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir
- Ø Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
- Ø Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C’de bekletilmiştir.
- Ø 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Ø Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir
- Ø Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- Ø Örnekler -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.9. A. Öğütülmüş bitkisel materyalin 65° C’de bekletilmesi, B-C. Tüplerin üzerine solüsyonların eklenmesi, D. Santrifüj işlemi.

3.2.3. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

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

3.2.4. DNA Sekans Analizleri, Polimorfizmlerin Belirlenmesi ve SSCP Primerlerinin Dizaynı

SSCP analizlerini gerçekleştirmek amacıyla ilk olarak genetik olarak birbirinden farklı olan ve demir klorozuna farklı tepkiler veren 8 turuncgil genotipi ve belirlenmiş 3 farklı aday geni çoğaltacak olan sentetik PCR primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürününden direk DNA sekans analizleri yapılmıştır. DNA sekans sonuçlarından ise allelik çeşitlilik çalışmaları için yeni SSCP primerleri dizayn edilmiştir. Çalışmada kullanılan 3 farklı aday geni PCR reaksiyonu ile çoğaltmak amacıyla kullanılan PCR primerleri **Çizelge 3.5.**'te verilmiştir. Sentetik primerler ve seçilen 8 farklı turuncgil genotipi ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri agaroz jel içerisinde koşturularak (**Şekil 3.6.**) PCR ürününün varlığı tespit edilmiştir ve PCR ürününden direk DNA sekans analizi yapılmıştır. DNA sekans işlemi için uygulanan PCR protokol ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

Kullanılan Kimyasallar	Her Örnek için kullanılan miktar
PCR Master Mix 2X	16.9 µl
MgCl ₂	1 µl
Forward Primer (20 µM)	1 µl
Reverse Primer (20 µM)	1 µl
ddH ₂ O	3 µl
Taq Polimeraz (500 Ünite)	0.1 µl
DNA (50 ng/µl)	3 µl
Toplam Hacim	26 µl

94 °C 2 dk ön denatürasyon
 94 °C 30 sn denatürasyon
 57 °C 45 sn annealing
 72 °C 2 dk polimerizasyon
 72 °C 10 dk son yazılım
 4 °C ∞

} 30 döngü

Çizelge 3.5. DNA Sekans Amacıyla Aday Genlerin Amplifikasyonunda kullanılan PCR primerleri

Primer	Sekans	Baz uzunluğu
Fe_S F	GCTCTCATGCACGTTATTGG	20
Fe_S R	TGTAGACGGCAAAACAGCAAT	21
IRT1 5' F	TGGTGTCTGTTTACCGCTGTT	21
IRT1 5' R	ACGGCTCTCTCTTGGTCTCG	20
IRT1 3' F	CCCATGGCCTAAGTCCTGAT	20
IRT1 3' R	AATCCCAAGTGCAATTCCAAA	21
Nramp3 F	TCGCCTTAAGCTCTTTAGAA	20
Nramp3 R	ACAGCCTGCTGTATTGTTTT	20

PCR ürünlerinin direk DNA sekansı sonucunda aday genlerin DNA dizileri elde edilmiştir ve seçilen 8 farklı turuncgil genotipine ait elde edilen sekans bilgileri BioEdit bilgisayar programı (Hall, 1999) kullanılarak karşılaştırılmış, sekans seviyesindeki polimorfizm ve mutasyonlar tespit edilmiştir.



Şekil 3.10. A. Agaroz jelin dökülmesi, B. Agaroz jelin yüklenmesi, C. Agaroz jelin koşturulması

Direk olarak DNA sekans sonuçlarından Aday genlerin DNA dizilerine ulaşılmıştır. Sekiz turuncgil genotipinin aday genlerimiz açısından DNA sekansları karşılaştırılıp polimorfizmler ve mutasyonlar tespit edildikten sonra, DNA seviyesinde farklılık gösteren bu bölgeleri çoğaltacak SSCP primerleri Primer3 programı (**Rozen ve Skaletsky, 2000**) kullanılarak dizayn edilmiştir. Her gen için iki farklı, toplam 6 farklı SSCP primer çifti dizayn edilmiştir. Allelik çeşitliliği belirlemek amacıyla dizayn edilen SSCP primerleri **Çizelge 3.6.**'ta sunulmuştur.

Çizelge 3.6. DNA sekans sonuçlarından dizayn edilen SSCP primerleri

Primer	Sekans	Uzunluğu
Fe-S1 Forward	GACCACTTTGATGGCTGTGA	20
Fe-S1 Reverse	GCAGAAGTCAGTAAACC	17
Fe-S2 Forward	CATCACCAGCATATGGGACA	20
Fe-S2 Reverse	CAGAAGCGGCAAGAATGT	18
IRT1-1 Forward	ATCGTGTTATCGCCATGGTT	20
IRT1-1 Reverse	CGTAACGTGCCAAAGTTTTT	20
IRT1-2 Forward	GCTTCAGGAATAACCCCAGA	20
IRT1-2 Reverse	CGTAACGTGCCAAAGTTTTT	20
Nramp3-1 Forward	AGTGAAATGCATTATCTGTTGCAG	24
Nramp3-1 Reverse	TTATCAATATCTCTTGATTGCACA	24
Nramp3-2 Forward	TGTTGGAGTTGTGGGCTGTA	20
Nramp3-2 Reverse	AAAATTGGGAAAAGTCCACCT	21

3.2.5. SSCP Analizleri

SSCP analizleri için aday genlerin 8 farklı turunçgil genotipi kullanılarak direk olarak DNA sekansından elde edilen sonuçlar ile dizaynı yapılan SSCP primerleri ve tez kapsamında belirlenmiş tüm turunçgil anaçları ile SSCP-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. SSCP analizleri için uygulanan PCR protokolü ve PCR döngü koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Kullanılan Kimyasallar	Her Örnek için kullanılan miktar
PCR Master Mix 2X	15.8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
Forward Primer (5 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (5 µM)	0.5 µl
ddH ₂ O	2 µl
Taq Polimraz (1 Ünite)	0.2 µl
DNA (50 ng/µl)	3 µl
Toplam Hacim	23 µl

94 °C 2 dk ön denatürasyon	
94 °C 30 sn denatürasyon	} 40 döngü
55°C 45 sn annealing	
72 °C 2 dk polimerizasyon	
72 °C 10 dk son yazılım	
4 °C ∞	

3.2.6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SSCP-PCR analizleri sonucunda elde edilen 23 µl PCR ürününden ilk olarak 6 µl çekilerek üzerine 1 µl yükleme boyası eklenmiş ve PCR ürününün varlığı agaroz jelde kontrol edilerek poliakrilamid jel analizlerine geçilmiştir. Çalışmada SSCP PCR ürünlerinin varlığını belirlemek için % 14 konsantrasyonunda non-denatüre poliakrilamid jel hazırlanmıştır.

Non-Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

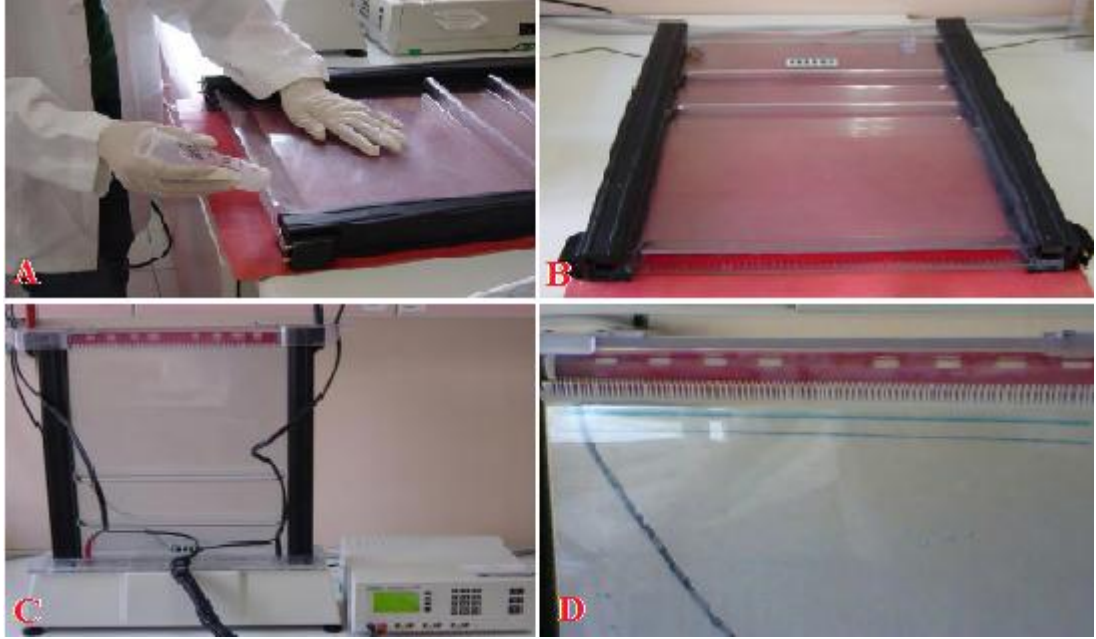
% 14 konsantrasyonda non-denatüre poliakrilamid jel hazırlamak için;

43 g	Üre
13.86 g	Akrilamid
0.14 g	Bis-akrilamid
10 ml	10X TBE buffer,(Tris-Base, Boric asit, EDTA(Na ₂ .EDTA.H ₂ O))
500 µl	Amonyum persülfat (APS) (0.1g/1ml),
100 µl	TEMED,
100 ml	ye tamamlanacak şekilde ddH ₂ O

Hazırlanan solüsyon filtreden geçirilerek şırınga yardımı ile elektroforez aparatına dökülerek 2 saat boyunca jelin polimerize olması beklenmiştir (**Şekil 3.7.**).

SSCP-PCR reaksiyon ürünlerini yüklemeyen önce 700 ml 1X TBE buffer elektroforeze eklenerek 40 W'da 30 dakika ön ısıtma (preheating) yapılmıştır.

SSCP-PCR ürününden 4 µl çekilerek üzerine 2 µl denatüre edici etkisi olan formamide yükleme boyası eklenerek 95 °C de 10 dakika boyunca denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra örnekler 10 dakika boyunca -20 °C de bekletilmiştir ve örnekler polimerizasyonu ve ön-ısıtması tamamlanmış poliakrilamid jel içerisine yüklenmiştir. Örneklerin yüklenmesinin ardından jel 2500-3000 V arasında, 40 W' da 30 mA'da 8 saat 8 °C de koşturulmuştur. Elektroforez ekipmanı olarak, Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell (BIO RAD) kullanılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezi aşamaları **Şekil 3.7.**'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. A. Jelin şırınga yardımıyla dökülmesi, B. Jelin Polimerize olmasının beklenmesi, C. Jelin koşturulması, D. Jel koşturulurken örneklerin jel içerisindeki görüntüsü.

3.2.7. Gümüş Nitrat Boyama

Elektroforezde koşma işlemi tamamlandıktan sonra SSCP-PCR ürünlerinin varlığını tespit etmek ve gerekli değerlendirmeleri yapmak için gümüş nitrat boyaması yapılmıştır. Gümüş nitrat boyama için aşağıda verilen protokol takip edilmiştir.

- Koşma işlemi tamamlanmış jel öncelikle fiksatif solüsyon (% 10'luk glacial asetik asit) içerisine koyularak 20 dakika boyunca hafif şekilde çalkalanmıştır.
- Daha sonra jel 3 kez ddH₂O ile çalkalanarak, 20-30 sn boyunca kurumaya bırakılmıştır.
- Jel boyama solüsyonuna (1 paket AgNO₃ + 3ml %37'lik Formaldehite 2 L saf suda çözülür) transfer edilerek 30 dakika boyunca bu solüsyonda bekletilmiştir.
- Daha sonra jel developing solüsyonuna (60 g Na₂CO₃ 2L saf suda çözünür ve 10 °C' ye soğutulduktan sonra üzerine 3 ml Formaldehite ve 400 µl

Sodyum Thiosülfate eklenir) aktarılarak PCR ürünleri jel içerisinde görünene kadar çalkalanmıştır.

- Bantlar görülmeye başlayınca bu solüsyon üzerine fix/stop solüsyon direkt olarak eklenerek bantların daha iyi görünmesi ve kalıcı olması sağlanmıştır.
- Son olarak jel 2 kez ddH₂O ile çalkalanarak kurumaya bırakılmıştır ve jelin görüntüsü alınmıştır.

3.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2.7.1. DNA Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında kullanılan turunçgil anaçlarını temsil eden 8 genotip ile yapılan DNA sekans analizleri sonucunda 3 farklı aday gene ait DNA dizileri, her gen kendi içerisinde olacak şekilde bu 8 genotip açısından BioEdit bilgisayar paket programı kullanılarak karşılaştırılmıştır ve bu 8 turunçgil genotipi arasında var olan mutasyon ve polimorfizmler tespit edilmiştir.

3.2.7.2. SSCP Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Dendogramların Oluşturulması

SSCP analizleri sonucunda PCR ürünlerinin varlığı non-denatüre poliakrilamid jel içerisinde tespit edilmiştir ve PAGE sonucu elde edilen bantlar bant olma veya olmama durumlarına göre “1” veya “0” şeklinde değerlendirilerek bu veriler üzerinden cluster analizleri yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur. Cluster analizleri PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony) bilgisayar paket programı (Swofford, 1998) ile Neighbor-Joining metoduna (Saitou ve Nei, 1987) göre yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonu

Tez kapsamında DNA sekans analizleri için kullanılan 8 turuncgil genotipi ve daha sonrasında bunlara ek olarak SSCP analizleri için kullanılan tüm turuncgil genotiplerinden DNA izolasyonları yapılmıştır ve izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların miktar ve kalitelerine spektrofotometre aracılığıyla bakılmıştır. DNA'ların miktar ve kaliteleri **Çizelge 4.1.**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Kullanılan bitkisel materyale ait DNA miktar ve saflıkları

Genotip	DNA Miktarı (ng DNA μl^{-1})	DNA Saflığı (A260/A280)
Pomeroy Üç Yapraklısı	904.03	1,96
Corsica Ağaç Kavunu	654.98	1,94
Micrantha	876.67	2,08
Nules Klemantin	582.16	2,02
Kleopatra Mandarin	912.34	1,85
Haploid Klemantin	982.45	2,07
Chandler Şadok	709.65	2,03
Pink Şadok	456.34	2,09
Carrizo Sitranjı	764.61	2,04
C-35 Sitranjı	524.66	2,02
Citrumelo 4475 (WN)	411.13	1,98
Nasnaran Mandarin	310.52	1,86
Sunki Mandarin	989.4	2,02
Shekwasha mandarin	143.54	2,08
Fuzhu mandarin	3023.54	1,75
Bintangor Sarawak	1349.09	1,85
Red Kaba Limon	2973.12	1,92

Volkameriana	2134.98	2,02
Rangpur laymı	3123.76	1,97
Alemow (macrophylla)	1298.37	1,99
Bigarade Gou Tou Turuncu	453.20	1,96
Maroc Turuncu	279.70	1,94
Poncirus Flying Dragon	376.34	2,05
Poncirus rubidoux üç yapraklısı	298.12	2,02
Yuvarlak kamkat (marumi)	3877.36	2,07
Yerli Mandarin (willowleaf)	2195.91	2,07
Meksika laymı	3963.11	2,11
Duncan altıntopu	520.85	2,12
Eureka limonu	1934.65	1,85
Changsha Mandarin	845.90	2,09
Tuzcu 31 31 Turuncu	1642.03	2,01
Alanya Dilimli Portakalı	816.67	1,99
M. KleopatreX <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'	827.99	1,94
Tuzcu Kleopatra Mandarin	567.09	2,12
Gou Tou Turuncu	707.48	1,85

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

gerçekleştirilen DNA'ların saflık oranları 1,75-2,12 arasında değişmiştir (**Çizelge 4.1.**).

4.2. DNA Sekans Analizleri, Polimorfizmlerin Belirlenmesi ve SSCP Primerlerinin Dizaynı

Allelik çeşitliliği belirlemek amacıyla tüm genotipleri temsil eden, genetik olarak birbirinden farklı olan ve demir klorozuna farklı tepkiler veren 8 turunçgil genotipi ve 3 farklı aday geni çoğaltacak olan sentetik PCR primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürününden direkt DNA sekans analizleri yapılmıştır. DNA sekans sonuçlarından allelik çeşitlilik çalışmaları için yeni SSCP primerleri dizayn edilmiştir. DNA sekans analizleri için belirlenen 8 genotip ve aday genleri çoğaltacak primerler ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR ürününün varlığı her aday gen için agaroz jelde kontrol edilmiş ve sekans analizleri yaptırılmıştır.

Belirlenen 8 turunçgil genotipi ile demir klorozundan sorumlu aday genlere ait DNA sekansları BioEdit bilgisayar programı (**Hall, 1999**) kullanılarak değerlendirilmiştir. Her genotipe ait DNA sekansın program yardımıyla analizleri sonucu sekanslar arasındaki SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), delesyon ve/veya insersiyonlar belirlenmiştir (**Şekil 4.1.**).



Şekil 4.1. Bioedit bilgisayar programında DNA dizilerinin arasındaki farklılıkların belirlenmesi

NRAMP3 genine ait DNA dizilerinin analizleri sonucunda tespit edilen bir nokta mutasyonu **Şekil 4.1.**'de sunulmuştur.

Fe-S geninin DNA sekansı sonucunda, sekans için kullanılan 8 genotipte toplam olarak 22 SNPs ve 1 adet Indel (insersiyon/delesyon) tespit edilmiştir. IRT1 geninde ise toplam olarak 34 adet SNPs ve 1 adet Indel (insersiyon/delesyon) belirlenmiştir. NRAMP3 aday geninin direk DNA sekansı sonucunda ise 19 SNPs ve 2 adet Indel (insersiyon/delesyon) tespit edilmiştir. Demir klorozundan sorumlu 3 aday gene ait sekans sonuçlarından toplam olarak elde edilen SNPs sayısı 75, Indel (insersiyon/delesyon) sayısı ise 4 olarak belirlenmiştir. Aday genlerin baz sayısı ve DNA sekans sonucunda belirlenen polimorfizm ve mutasyon sayıları **Çizelge 4.2**'de gösterilmiştir.

Tez kapsamında 8 turuncgil genotipi ile aday genlerin tüm DNA dizileri **EK 1**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Aday genlerin baz sayısı ve DNA sekans sonucunda belirlenen polimorfizm ve mutasyon sayıları

Gene	Gen Büyüklüğü (bç)	SNPs Sayısı	Indel sayısı
NRAMP3	804	19	2
IRT1	1252	34	1
Fe-S	963	22	1
Toplam	3019	75	4
SNP veya Indel/1000 nükleotid		24.8	1.3

DNA sekans sonucunda toplam olarak 3 aday gen için 3019 DNA sekans elde edilmiştir ve ortalama 1000 baz çifti DNA sekansta 24.8 SNPs, 1.3'te Indel tespit edilmiştir. DNA sekans sonuçları incelendiğinde polimorfizm seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Bunun en büyük sebebi DNA sekans çalışması için belirlenen genotiplerin genetik olarak uzak olmasıdır.

Ollitrault ve ark., (2009), Turuncgillerde tuz stresine karşı yeni anaç ıslahı amacıyla yapılan çalışmada tez kapsamında DNA sekans amacıyla kullanılan aynı genotiplerle DNA sekans çalışmaları yapmışlardır. Araştırmacılar, tuz stresinden sorumlu 12 farklı aday genle DNA sekans analizleri yapmışlar ve toplamda 7299 bç

DNA dizileme gerçekleştirmişlerdir. Tüm DNA sekans sonuçlarından toplam 170 SNPs, 13 Indel belirlemişler ve ortalama 1000 baz çifti DNA sekansta 23.8 SNPs, 1.8'te Indel tespit etmişlerdir. Araştırma sonuçlarında turuncgillerde mutasyon seviyesinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

DNA sekans sonuçlarından 8 turuncgil genotipi açısından polimorfizm ve mutasyonlar tespit edildikten sonra SSCP analizleri için bu sekans bilgilerinden yeni SSCP-PCR primerleri Primer3 bilgisayar programı **(Rozen and Skaletsky, 2000)** ile dizayn edilmiştir. SSCP analizlerinde kullanmak üzere her gen için 2 primer çifti toplamda 6 primer çifti dizayn edilmiştir. SSCP primerlerini dizayn ederken PCR' da çoğaltacağı bölgenin yüksek polimorfizm göstermesi istendiği için mümkün olduğu kadarıyla SNPs sayısı fazla ve Indel içeren bölgeleri çoğaltacak PCR primerleri dizayn edilmiştir. SSCP analizlerinde primerlerin çoğalttığı DNA bölgelerindeki farklılıkların miktarı arttıkça PCR ürününün ayrılma olasılığı o düzeyde artmaktadır **(Hongyo ve ark., 1993)**. SSCP primerlerinin dizayn edilmesinde diğer önemli bir nokta ise elde edilecek PCR ürününün boyutudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığında düşme olur. Örneğin 300 bp'den kısa fragmentlerde başarı %99 dolayında iken 300-450 bp'lik fragmentlerin incelenmesinde aynı oran %90 seviyesine düşmektedir. SSCP'nin uygulandığı mutasyon analizlerinde PCR ürünlerinin küçük tutulması istenir **(Solak ve ark., 2000)**. Bu nedenle tez dizayn edilen SSCP primerlerinin çoğalttığı DNA bölgeleri 300 bp'den az tutulmuştur. Dizayn edilen SSCP primerleri, içerdikleri polimorfizm bilgileri ve çoğalttıkları DNA uzunluğu **Çizelge 4.3.**'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Dizayn edilen SSCP primerleri, içerdikleri polimorfizm bilgileri ve çoğalttıkları DNA uzunluğu (bç)

Primer	Polimorfizm	DNA Boyutu
Nramp3-1 F Nramp3-1 R	SNP	149
Nramp3-2 F Nramp3-2 R	SNP	150
IRT1-1 F IRT1-1 R	Indel	200
IRT1-2 F IRT1-2 R	SNP	199
Fe-S-1 F Fe-S-1 R	Indel ve SNP	216
Fe-S-2 F Fe-S-2R	SNP	154

SSCP analizleri için DNA sekans sonuçlarından dizayn edilen primerlerin çoğalttığı DNA uzunlukları 149-216 bç arasında değişmektedir. Nramp3 geni için dizayn edilen her iki primer çiftinin de polimorfizm içerikleri SNPs tir. IRT1 geni için dizayn edilen primer çiftlerinden birinin polimorfizm içeriği SNPs diğeri ise Indel (İnseriyon/delesyon) olarak ayarlanmıştır. Fe-S geni için dizayn edilen primer çiftlerinden birinin polimorfizm içeriği Indel ve SNPs diğeri ise yalnızca SNPs olacak şekilde oluşturulmuştur (**Çizelge 4.3.**).

SSCP primerlerinin dizayn edilmesinden sonra tez kapsamında kullanılan tüm turuncgil anaçlarının demir klorozundan sorumlu aday genler açısından allelik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla SSCP analizlerine geçilmiştir.

4.3. SSCP Analizleri

Turunçgil anaçlarında demir klorozundan sorumlu aday genlerde allelik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yapılan SSCP analizlerinde belirlenen her aday gen için 2 adet SSCP primer çifti toplam olarak 3 aday gen için 6 SSCP primer çifti dizayn edilmiştir ve SSCP-PCR analizleri yapılarak non-denatüre poliakrilamid jel analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlardan dendogramlar oluşturulmuştur.

Fe-S (Iron-Sulfur Assembly Protein) aday geni için dizayn edilen SSCP primerlerinin değerlendirilmesi;

Fe-S-1 Primeri: SSCP-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürününün % 14 konsantrasyonunda ki non-denatüre poliakrilamid jelde koşturulması sonucunda toplam olarak 6 farklı DNA bantı elde edilmiştir. Elde edilen 6 DNA bantının 5 i polimorfik 1 tanesinde monomorfik sonuçlar vermiştir.

Fe-S-2 Primeri: PCR ve poliakrilamid jel analizleri sonucunda, DNA sekans sonuçlarından dizayn edilen Fe-S-2 primeri için toplam olarak 8 DNA bant profili elde edilmiştir. Analizler sonucu değerlendirilen 8 farklı DNA bant profilinin 5 tanesinin polimorfik 3 tanesinin ise monomorfik sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Fe-S-2 primerinin sonuçları incelendiğinde, demir klorozuna karşı duyarlı oldukları bilinen *P. trifoliata*, *P. Flaying Dragon* ve *P. rubidoux* üç yapraklı genotiplerine ait spesifik bir allelin varlığı tespit edilmiştir.

Hayvan hücrelerinde demir taşınmasından sorumlu olan ancak bitkilerde tam olarak fonksiyonu bilinmeyen fakat demir taşınmasından sorumlu olduğu düşünülen Fe-S (Iron-Sulfur Assembly Protein) aday genine ait SSCP jel görüntüleri değerlendirilerek cluster analizleri PAUP bilgisayar paket programı (**Swofford, 1998**) ile Neighbor-Joining metoduna (**Saitou ve Nei, 1987**) göre yapılmış ve bu gen için dendogram oluşturulmuştur.

IRT1 aday geni için dizayn edilen SSCP primerlerinin değerlendirilmesi;

IRT1-1 Primeri: SSCP analizleri sonucunda yapılan non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi ile elde edilen DNA profilleri incelendiğinde IRT1-1 primeri için 6 farklı DNA bant profili tespit edilmiştir. Tespit edilen tüm DNA bant profilleri polimorfik sonuçlar vermiş ve bu primer için polimorfizm oranı %100 olarak belirlenmiştir.

IRT1-2 Primeri: IRT1 aday geninin 8 farklı turunçgil genotipinde DNA sekans sonuçlarından dizayn edilen IRT1-2 SSCP primeri ile yapılan analizler sonucunda toplam olarak 8 farklı DNA bant profili tespit edilmiştir. Tespit edilen tüm DNA bant profillerinin tamamı polimorfik sonuçlar vermiş ve bu primer için polimorfizm oranı % 100 olarak belirlenmiştir.

Bitkilerde demir taşınmasından sorumlu olan IRT1 aday genine ait SSCP jel görüntüleri değerlendirilerek cluster analizleri PAUP bilgisayar paket programı (**Swofford, 1998**) ile Neighbor-Joining metoduna (**Saitou ve Nei, 1987**) göre yapılmış ve bu gen için de ayrı bir dendogram oluşturulmuştur.

Nramp3 aday geni için dizayn edilen SSCP primerlerinin değerlendirilmesi;

DNA sekans analizleri sonucunda Nramp3 aday geninin turunçgil anaçlarında allelik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla polimorfizm içeriği SNPs olan iki adet primer çifti dizayn edilmiştir. Ancak yapılan SSCP analizleri sonucunda PCR ürünü poliakrilamid jel içerisinde ayırlanamamıştır ve polimorfizm tespit edilememiştir. Bu sebepten dolayı Nramp3 geni için cluster analizleri yapılmamış ve dendogramlar oluşturulamamıştır.

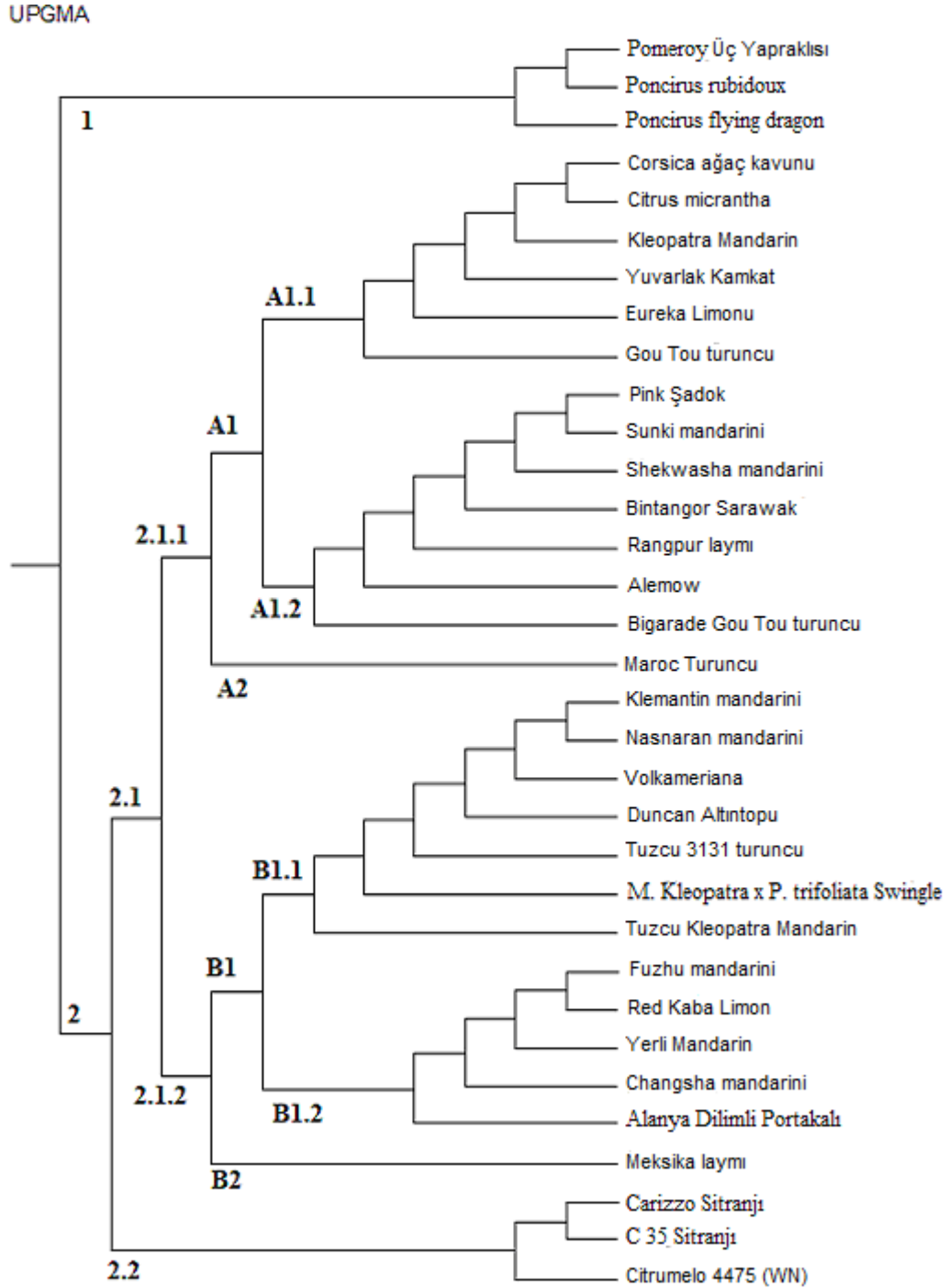
Nramp3 geni için dizayn edilen SSCP primerleri incelendiğinde, bu primerlerin çoğalttığı DNA bölgelerinin polimorfizm içerikleri yalnızca tek bir nokta mutasyonundan oluşmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda tek bir nokta mutasyonunu ayırabilmek mümkün olmamıştır ve bu sebepten ötürü akrilamid jel içerisinde DNA profilleri birbirinden ayırlanamamıştır.

Tez kapsamında belirlenen demir klorozundan sorumlu 3 farklı aday genin SSCP analizleri sonucunda Fe-S genine ait veriler değerlendirilerek kendi içerisinde cluster analizleri yapılmış ve dendogramlar oluşturulmuştur. IRT1 genine ait veriler de kendi içerisinde ayrı olarak değerlendirilerek dendogramlar oluşturulmuştur.

Ayrıca Fe-S ve IRT1 aday genlerinin verileri birleştirilerek tek ayrı bir cluster analizi yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur.

4.3.1. SSCP Analizleri Sonucunda Fe-S Geni için Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi

SSCP analizleri sonucunda Neighbor-Joining metoduna (Saitou ve Nei, 1987) göre oluşturulan dendogram Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Alleller arasındaki toplam genetik çeşitlilik oranı %0.1 olmuştur. Analizler sonucu oluşturulan dendogram ilk olarak iki ana kola ayrılmıştır ve bu iki ana kol dendogram üzerinde 1 ve 2 şeklinde numaralandırılmıştır. 1 no'lu ana kol içerisinde *P. trifoliata*, *P. rubidoux* ve *P. flying-dragon* üç yapraklı genotipleri yer almıştır. Dendogram üzerinde 2 şeklinde numaralandırılmış ikinci ana kol ise kendi içerisinde tekrar iki gruba ayrılmıştır ve bu iki grup 2.1 ve 2.2. şeklinde gösterilmiştir. 2.1. grubu tekrar iki alt gruba ayrılmıştır ve bu iki alt grup dendogram üzerinde 2.1.1 ve 2.1.2 şeklinde numaralandırılmıştır. 2.1.1 alt grubu ise dendogram üzerinde A1 ve A2 şeklinde gösterilmiş iki kola ayrılmıştır. A2 kolu içerisinde yalnızca Bigarade Maroc turuncu yer almıştır. A1 kolu ise A1.1 ve A1.2 şeklinde numaralandırılmış iki alt kola ayrılmıştır. A1.1 alt kolu içerisinde Corsica Ağaç Kavunu, *Citrus micrantha*, Mandarin Kleopatra, Yuvarlak kamkat, Eureka limonu ve Gou Tou turuncu yer almıştır. A1.2 alt kolu içerisinde ise pink şadok, Sunki mandarini, Shekwaska mandarini, Bintangor Sarawak, Kaba Limon, Alemow, Bigarade Gou Tou turuncu kümelenmiştir. 2.1.2 alt grubu dendogram üzerinde B1 ve B2 şeklinde gösterilmiş iki kola ayrılmıştır. B2 kolu içerisinde Meksika laymı genotipi yer almıştır. B1 kolu ise B1.1 ve B1.2 şeklinde numaralandırılmış iki alt kola ayrılmıştır. B1.1 alt kolu içerisinde Mandarin Klemantin, nasnaran mandarini, volkameriana, duncan altıntopu, tuzcu 3131 turuncu, Mandarin Kleopatra X *P. trifoliata* melezi ve Tuzcu Kleopatra mandarini yer almıştır. B1.2 alt kolu içerisinde Fuzhu mandarini, Kaba Limon, yerli mandarin, Changsha mandarini, Alanya dilimli portakalı genotipleri kümelenmiştir.

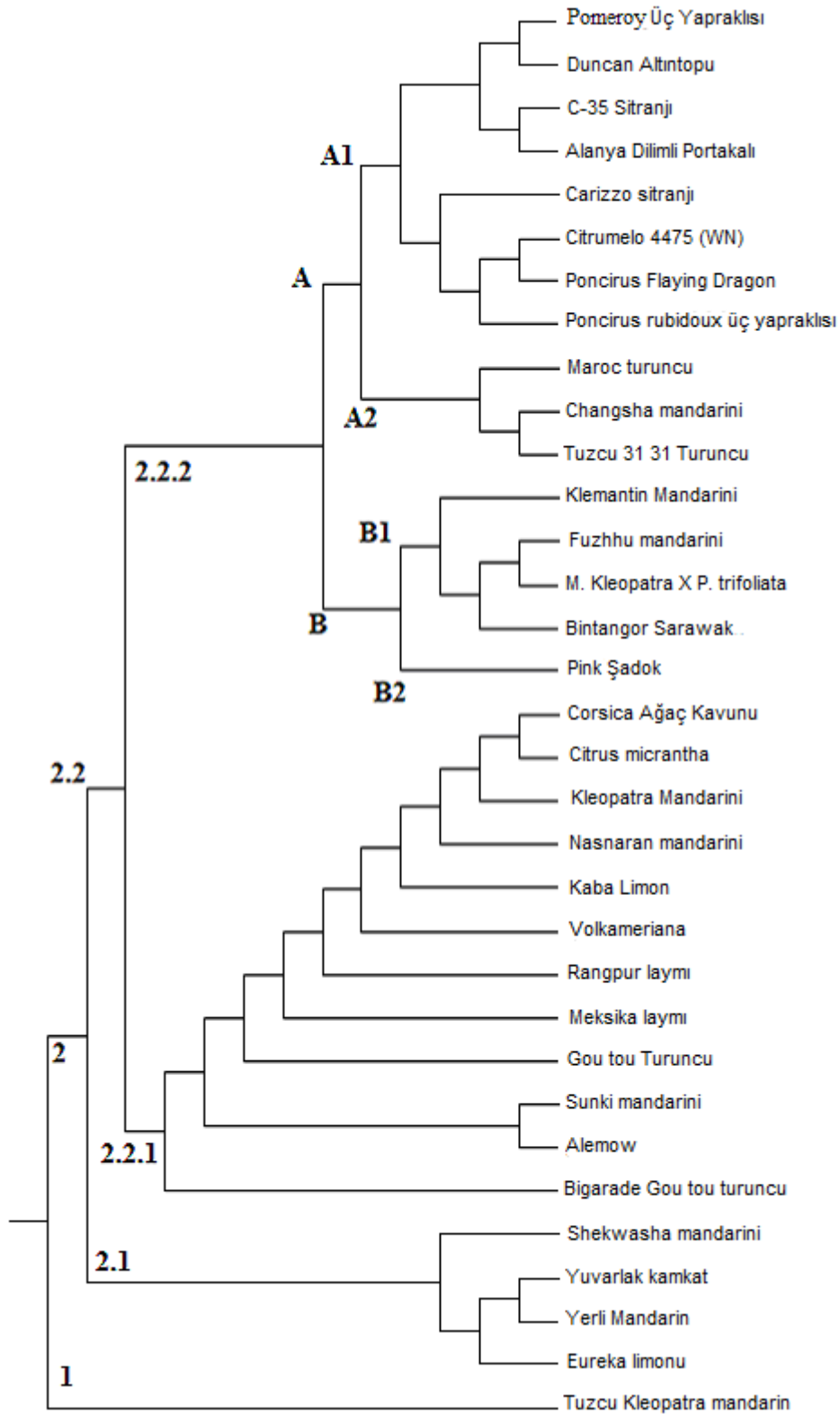


Şekil 4.2. SSCP analizleri sonucunda Fe-S geni için elde edilen dendrogram

4.3.1. SSCP Analizleri Sonucunda IRT1 Geni için Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi

SSCP analizleri sonucunda IRT1 geni için Neighbor-Joining (Saitou ve Nei, 1987) metoduna göre oluşturulan dendogram Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Alleller arasındaki toplam genetik çeşitlilik oranı %0.1 olmuştur. Analizler sonucu elde edilen dendogram ilk olarak dendogram üzerinde 1 ve 2 şeklinde numaralandırılmış iki ana kola ayrılmıştır. 1 numaralı ana kolda yalnızca Tuzcu Kleopatra mandarin yer almıştır. 2 numaralı ana kol ise kendi içerisinde tekrar 2.1 ve 2.2 şeklinde numaralandırılmış iki gruba bölünmüştür. 2.1 grubu içerisinde Shekwaska mandarini, Yuvarlak kamkat, Yerli mandarin, Eureka limonu genotipleri yer almıştır. 2.2. grubu ise tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. Bu iki alt grup dendogram üzerinde 2.2.1 ve 2.2.2 şeklinde numaralandırılmıştır. 2.2.1 alt grubu içerisinde Corsican, *Citrus micrantha*, Mandarin kleopatra, nasnaran mandarini, Kaba Limon, Volkameriana, Rangpur laymı, Meksika laymı, Gou tou turuncu, sunki mandarini ve Alemow genotipleri kümelenmiştir. 2.2.2 alt grubu ise tekrar A ve B şeklinde numaralandırılmış iki kola ayrılmıştır. A kolu dendogram üzerinde A1 ve A2 şeklinde numaralandırılmış iki alt kola ayrılmıştır. A1 alt kolu içerisinde *P. trifoliata*, Duncan altıntopu, C35 sitranjı, Alanya dilimli portakalı, Carrizo sitranjı, Citrumelo 4475 (WN), Poncirus flying-dragon ve Poncirus rubidoux üç yapraklısı genotipleri yer almıştır. A2 alt kolu içerisinde ise Bigarade Maroc turuncu, changsha mandarini, Tuzcu 31 31 genotipi yer almıştır. B kolu ise dendogram üzerinde B1 ve B2 şeklinde numaralandırılmış iki alt kola ayrılmıştır. B1 alt kolu içerisinde Klemantin mandarini, Fuzhu mandarini, Mandarin kleopatra X *P. trifoliata*, Bintangor Sarawak genotipleri yer almıştır. B2 alt kolu içerisinde ise yalnızca pink şadok genotipi yer almıştır.

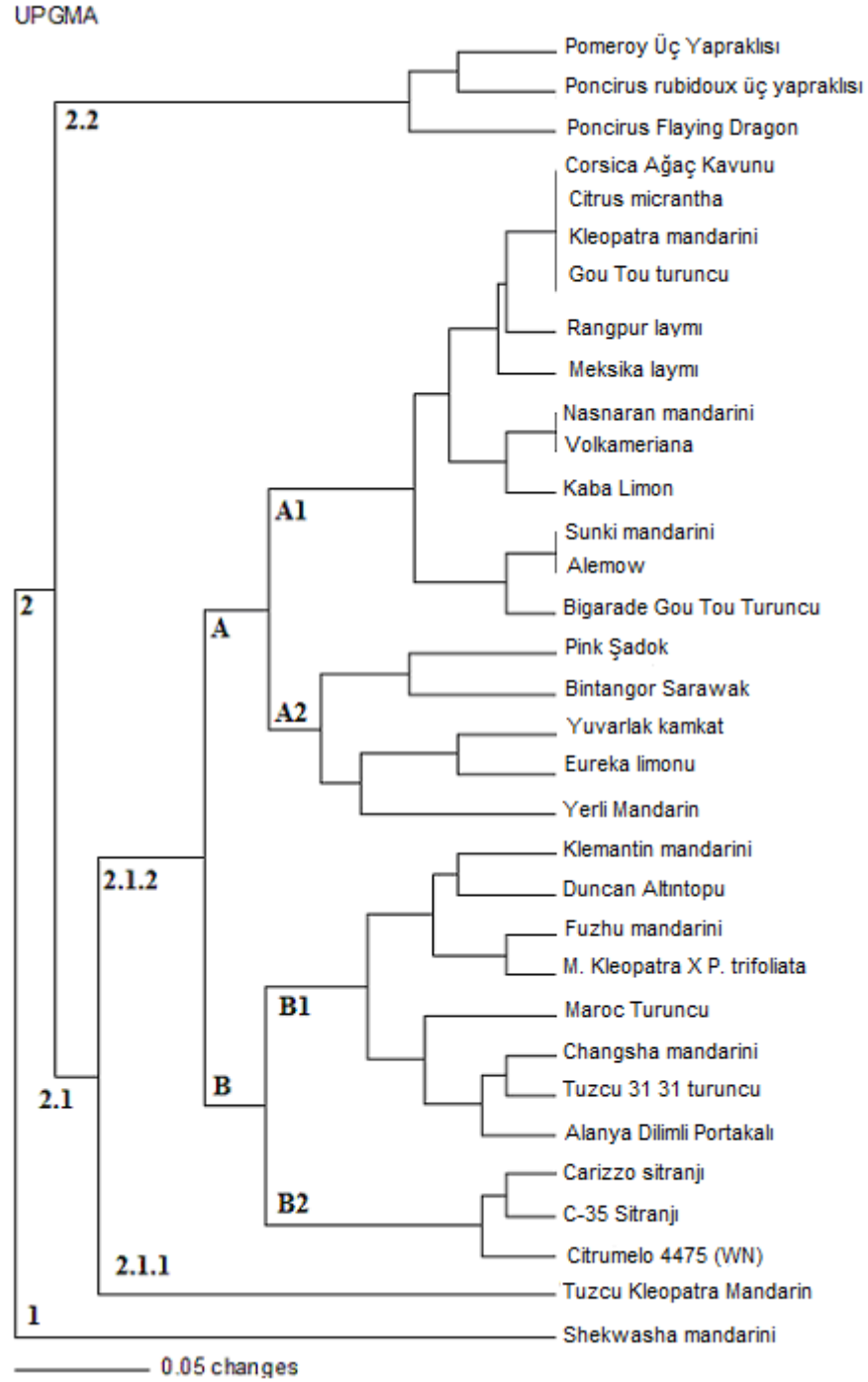
UPGMA



Şekil 4.3. SSCP analizleri sonucunda IRT1 geni için elde edilen dendrogram

4.3.1. SSCP Analizleri Sonucunda Fe-S geni ve IRT1 Geni için Elde Edilen Verilerin Birleştirilmesiyle Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi

SSCP analizleri sonucunda Fe-S geni ve IRT1 geninin tüm verilerinin birleştirilmesiyle Neighbor-Joining (Saitou ve Nei, 1987) metoduna göre oluşturulan dendogram Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. İki gen açısından Alleller arasındaki toplam genetik çeşitlilik oranı %0.5 olmuştur. Analizler sonucu elde edilen dendogram ilk olarak dendogram üzerinde 1 ve 2 şeklinde numaralandırılmış iki ana kola ayrılmıştır. Bir numaralı ana kol içerisinde yalnızca Shekwaska mandarini genotipi yer almıştır. İki numaralı ana kol ise kendi içerisinde dendogram üzerinde 2.1 ve 2.2. şeklinde numaralandırılmış iki gruba ayrılmıştır. Dendogram üzerinde 2.2 şeklinde gösterilmiş grup içerisinde demir klorozuna karşı duyarlı oldukları bilinen *P. trifoliata*, *Poncirus rubidoux* ve *Poncirus flying-dragon* üç yapraklı genotipleri yer almıştır. Dendogram üzerinde 2.1. şeklinde gösterilmiş grup ise kendi içerisinde 2.1.1 ve 2.1.2 şeklinde numaralandırılmış iki alt gruba bölünmüştür. 2.1.1 alt grubu içerisinde yalnızca Tuzcu Kleopatra mandarini yer almıştır. 2.2.2 alt grubu ise dendogram üzerinde A ve B şeklinde numaralandırılmış iki bölüme ayrılmıştır. B bölümü ise B1 ve B2 şeklinde, A bölümü ise A1 ve A2 şeklinde gösterilmiş iki alt bölüme ayrılmıştır. A1 alt bölümü içerisinde Corsica ağaç kavunu, *Citrus micrantha*, Mandarin kleopatra, Gou Tou turuncu, Rangpur laymı, Meksika laymı, Nasnaran mandarini, Volkameriana, Kaba limon, mandarin Sunki, alemow ve bigarade gou tou turuncu yer almıştır. A2 alt bölümü içerisinde ise pink şadok, bingantor sarawak, yuvarlak kamkat, eureka limonu, ve yerli mandarin genotipleri kümelenmiştir. Dendogram üzerinde B1 olarak gösterilmiş alt bölüm içerisinde ise mandarin Klemantin, Duncan altıntopu, Fuzhu mandarini, M. kleopatra X *P.trifoliata*, Maroc turuncu, Changsa mandarini, Tuzcu 3131 turuncu, Alanya dilimli portakalı genotipleri yer almıştır. B2 alt bölümü içerisinde ise demir klorozuna duyarlı olarak bilinen Carrizo sitranjı, C35 sitranjı ve Citrumelo 4475 (WN) genotipleri kümelenmiştir.



Şekil 4.4. SSCP analizleri sonucunda Fe-S ve IRT1 genlerine ait verilerin birleştirilmesi sonucu elde edilen dendrogram.

Turunçgil taksonomisi oldukça karmaşıktır ve günümüze kadar turunçgil taksonomisini anlamak, turunçgil tür ve çeşitlerinin kökenini anlamak amacıyla bir çok taksonomik çalışma yapılmıştır. Ancak günümüze kadar turunçgillerde demir

klorozundan sorumlu aday genlerde, genlerin allelik çeşitliliğini belirlemek ve turuncgillerin bu genler bakımından orijinlerini tespit etmek amacıyla herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Tez kapsamında turuncgil anaçlarında demir klorozundan sorumlu 3 farklı aday genin allelik çeşitliliğini tespit etmek amacıyla SSCP markırları dizayn edilmiş ve bu primerlerle SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir. Fe-S geni ve IRT1 geni için elde edilen veriler değerlendirilerek dendogramlar oluşturulmuş ancak Nramp3 geni için PCR ürünü akrilamid jel içerisinde ayırlamadığından bu gen için cluster analizleri gerçekleştirilmemiştir.

Çevik ve Moore, (2007)'un bildirdiğine göre, turuncgillerde 9 adet haploid kromozom bulunduğunu ve toplam genom uzunluğunun 1500–1700 cM (santimorgan) olduğunu bildirmiştir. Tez kapsamında 3 aday genin allelik çeşitliliğini tespit etmek için analizler yapılmış ve çalışmada kullanılan turuncgil anaçlarının allelik ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak toplam olarak 3 aday gen turuncgil genomunun çok küçük bir kısmına karşılık geldiği için çalışmada kullanılan turuncgil anaçlarının genetik ilişkileri konusunda bazı farklı sonuçlar da elde edilmiştir.

SSCP analizleri sonucunda Fe-S geni için elde edilen dendogramlar incelendiğinde demir klorozuna duyarlı oldukları bilinen üç yapraklı genotiplerinin aynı grup içerisinde yer aldıkları görülmüştür. IRT1 geni için oluşturulan dendogramlar da ise benzer sonuçlar görülmüştür, demir klorozuna duyarlı oldukları bilinen üç yapraklılar aynı alt gruplarda yer almışlardır. Fe-S geni ve IRT1 geninin verileri birleştirilerek elde edilen dendogramlar da ise üç yapraklı genotipleri 2.2 kolu içerisinde yer almışlardır. **Fang ve ark., (1997)**, izoenzim, RFLP ve ISSR markırlarını kullanarak üç yapraklılar arasındaki varyasyonu araştırdıkları çalışmalarda, RFLP ve ISSR markırlarında %10 oranında polimorfizm tespit etmişlerdir. Araştırmacılar üç yapraklılar arasında düşük düzeyde bir varyasyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacıların bildirdiğine göre, **Komatsu ve ark., (1993)**, RFLP markırları ile üç yapraklılar içerisinde düşük düzeyde varyasyon bulmuşlardır. Allelik çeşitliliği araştırmak için yaptığımız çalışmada ile araştırmacıların tespit ettiği bulgular uyum göstermektedir.

Tez kapsamında kullanılan ve demir klorozuna hassas oldukları bilinen üç yapraklı melezleri ise her iki gen için elde edilen dendogramlarda aynı gruplar içerisinde yer almışlardır. Fe-S geni ve IRT1 geninin verileri birleştirilerek elde edilen dendogramlar da ise üç yapraklı melezleri B2 kolu içerisinde yer almışlardır. Ancak analiz sonuçlarında her iki gen ve her iki genin birlikte sonuçlarında üç yapraklılar ve üç yapraklı melezleri ayrı bölümlerde tespit edilmiştir. **Schafer ve ark., (2004)**, RAPD markırları ile yaptıkları çalışmada, üç yapraklılar içerisinde düşük bir polimorfizm saptamışlar, sitranj, sitrumelo ve üçyapraklıları farklı gruplarda bulmuşlar ve bu üç grup arasındaki benzerlik düzeyini 0.73 civarında belirlemişlerdir. **Pang ve ark., (2007)**, AFLP markırları ile elde ettikleri dendogramda üç adet *Poncirus trifoliata* çeşidi arasında yüksek oranda benzerlik tespit etmişlerdir.

Çalışmada allelik çeşitliliğin tespit edilmesiyle amacıyla kullanılan mandarin genotiplerine ait sonuçlar incelendiğinde yüksek oranda farklılıklar tespit edilmiştir. Fe-S ve IRT1 genleri için mandarinler açısından benzer sonuçlar bulunmuştur. Cluster analizleri sonucunda elde edilen dendogramların tamamında mandarin genotipleri yüksek oranda polimorfizm göstererek dendogram içerisinde diğer genotiplerin arasına yayılmışlardır. Turunçgil taksonomisini anlamak amacıyla yapılan bir çok çalışmada mandarin genotipleri için yüksek polimorfizm varlığı tespit edilmiştir. Mandarin turunçgil türleri içerisinde en yüksek çeşitliliğin görüldüğü gruptur. Çeşitler arasında morfolojik olarak benzerlik olmasına rağmen genetiksel olarak büyük farklılıklar vardır (**Koehler-Santos ve ark., 2003**). **Luro ve ark., (1995)**, mandarin tür ve çeşidinde minisatellit analizi kullanarak yapmış olduğu çalışmada mandarinler arasında genetiksel olarak büyük bir çeşitliliğin olduğunu bildirmişlerdir. **Koehler-Santos ve ark., (2003)**, mikrosatellit analizleriyle yaptıkları çalışmada *Citrus sunki* ve *Citrus reticulata* var. Ortanique ayrı alt gruplarda yer almıştır. Mandarinlerde yapılan kloroplast DNA çalışmalarında mandarinlerin tek bir bant verdiği belirlenmiştir. Bu da mandarinlerin tür statüsünü desteklemektedir (**Moore, 2001**). Tez kapsamında kullanılan *C. depressa* genotipi Fe-S ve IRT1 genlerine ait verilerin birleştirilmesi sonucu oluşturulan dendogramda 1 numaralı kolda yalnız başına yer alarak diğer tüm genotiplere bu genin allelleri açısından uzak

bulunmuştur. Shekwasha mandarini (*Citrus depressa*) meyveleri çok küçük ve turuncu renktedir, meyve kutupları yassılaştırmış şekildedir. Ayrıca tez çalışmasında demir klorozuna tolerant olarak bilinen, Türkiye’den örneklenen Tuzcu Kleopatra mandarin ve İspanyadan örneklenen Kleopatra mandarini arasında demir klorozundan sorumlu aday genler açısından farklılık tespit edilmiştir ve dendogramlar üzerinde farklı kollarda yer almışlardır. **Ağar, (2007)**, SSR markırları ile turuncgil ve akrabalarında yaptığı çalışmada mandarinler arasında yüksek oranda polimorfizm olduğunu belirtmiştir.

Çalışmada kullanılan ve demir klorozuna genelde dayanıklı olduğu bilinen limon ve laym genotipleri arasında kullanılan Fe-S aday geni açısından allelik seviyede farklılık tespit edilmiştir. Kaba limon, volkameriana, Meksika laymı, Rangpur laymı ve Eureka limonu dendogram üzerinde farklı kollar içerisinde yer almışlardır. IRT1 geni için ise limon ve laym genotipleri aynı grup içerisinde yer almışlardır ancak eureka limonu farklı bir grup içerisinde yer almıştır. Fe-S geni ve IRT1 geninin verileri birleştirilerek elde edilen dendogramda ise limon ve laym genotiplerinin aynı grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. **Gülşen ve Roose, (2001b)**, ISSR markırları ile yaptıkları çalışmada, 39 limon çeşidinde 0.97 ve üzeri düzeyde benzerlik saptamışlar ve bu sonuçların yaptıkları SSR ve izoenzim çalışmalarında da benzer şekilde olduğunu bildirmişlerdir **Aka-Kaçar ve ark., (2005)**, RAPD yöntemiyle yaptıkları çalışmada kullanılan limon genotiplerinin birbirinden farklı olduğunu belirtmişlerdir. SSCP analizleri sonucu IRT1 geni için oluşturulan dendogramda Corsica ağaç kavunu limon ve laym genotipleri ile birlikte yer alırken Fe-S geni için oluşturulan dendogramda farklı kol içerisinde yer almıştır. **Moore (2001)**, Limonların laym’lar gibi kompleks bir hibrit olduğunu fakat daha fazla citron (Ağaç kavunu) genlerini taşıdığını bildirmektedir. Moleküler veriler limonun citron ve turunc hibriti olduğunu ve turuncun ana ebeveyn olduğunu göstermiştir. Limon ve laymların atası ile ilgili yapılan birçok çalışmada benzer ve farklı sonuçlar vardır. **Federici ve ark., (1998)**, limon ve laym’ların hepsini ağaç kavunu içerisinde gruplamışlardır. **Barret ve Rhodes (1976)**, ve **Scora (1975)**, limonların laym ve ağaç kavununun doğal hibridi olduğu belirtmiştir. **Gülşen ve**

Roose (2001), limonun ağaç kavunu ve turuncun doğal hibridi olduğunu belirtmişlerdir.

Tez çalışmasında kullanılan ve demir klorozuna dayanıklı olduğu bilinen turunç genotipleri arasında allelik seviyede polimorfizmler tespit edilmiştir ve turunç genotipleri her iki gen içinde aynı kollarda toplanmamıştır. **Barrett ve Rhodes (1976)**, laym, turunç, limon, altıntop ve portakal içerisindeki varyasyonların genelde bir tek orijin bitkiden meydana gelen mutasyonlarla oluştuğunu bildirmişlerdir. **Torres ve ark., (1978)**, yaprak izoenzimleri ile yaptıkları çalışmalarda, 15 turunç genotipi arasında herhangi bir farklılık tespit edememişlerdir. **Luro ve ark., (2000)**, SSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda 10 adet turunç çeşidi arasında herhangi bir polimorfizm tespit edememişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler turunç genotipleri ile daha önceden yapılan çalışmalarla uyumlu çıkmamıştır ancak tez kapsamında yalnızca allelik çeşitliliği belirlemek üzere demir klorozundan sorumlu 3 farklı aday genle çalışılmıştır ve genomun çok küçük bir bölümü dizayn edilen SSCP primerleri ile taranmış ve cluster analizleri yapılmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında bazı turunçgil anaçlarında, belirlenen demir klorozundan sorumlu 3 farklı aday genle allelik çeşitliliği tespit etmek amacıyla DNA sekans çalışmaları ve SSCP analizleri yapılmıştır. DNA sekans analizleri sonucunda polimorfizm ve mutasyonlar tespit edilmiş ve bu polimorfik bölgeleri çoğaltacak SSCP primerleri dizayn edilerek SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir. SSCP analizleri sonucu cluster analizleri yapılarak dendogramlar oluşturulmuş ve turunçgil anaçlarında allelik çeşitlilik tartışılmıştır. Nramp3 aday geni için dizayn edilen SSCP primerleri ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilen akrilamid jellerde PCR ürününün ayrılmadığı gözlenmiştir ve bu gen için cluster analizleri yapılmamıştır.

SSCP analizleri sonucunda elde edilen dendogramlar incelendiğinde tez kapsamında kullanılan turunçgil anaçlarının dendogramlardaki dağılımı geçmiş yıllarda yapılan bazı çalışmalarla uyum içerisinde bulunmakla beraber elde edilen bazı sonuçlar önceki çalışmalarla uyumlu çıkmamıştır. Bunun en büyük nedeni çalışmada yalnızca 3 farklı aday gen kullanılarak genomun yalnızca çok küçük bir bölümünün taranmasıdır. Her aday gen için 2 farklı SSCP primeri dizayn edilmiştir. Daha fazla SSCP primerinin kullanılması ile genotiplerin birbirinden daha düzgün bir şekilde ayrılması sağlanacaktır ancak SSCP primerleri dizayn edilirken elimizde ki mevcut polimorfizm ve mutasyon bilgisine göre dizayn edildiği için elimizdeki mevcut verilerle daha fazla SSCP primerinin dizaynı mümkün olmamıştır. Bu nedenle ileride yapılacak allelik çeşitlilik çalışmaları için farklı aday genlerin seçimi ve yüksek polimorfizm bilgisi içeren primerlerin dizaynı oldukça önemlidir.

İleride yapılacak çalışmalar için doğru aday genlerin tespiti de büyük önem taşımaktadır. Demir klorozu için aday genlerin belirlenmesinde bazı moleküler teknikler (cDNA-AFLP, Mikroarray) kullanılarak bu genlerin tolerant ve hassas genotiplerdeki ifade farklılığı kesin olarak ortaya konulmalı ve bu sonuçlar eş-zamanlı PCR analizleri ile doğrulanmalı, bununla beraber aday genlerin seçiminde ilgili proteinin fonksiyonu da araştırılmalıdır.

Tez kapsamında kullanılan SSCP tekniğinin ko-dominant bir markır sistemi olması, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi ve otomasyona uygun olması gibi birçok

avantajı mevcuttur ancak bu avantajlara rağmen allelik çeşitliliğin araştırılabileceği farklı tekniklerinde kullanılması önerilmektedir. Bu teknikler arasında RFLP, dDHPLC ve EcoTilling gibi teknikler sayılabilir.

Demir klorozundan sorumlu aday genlerin farklı turunçgil genotiplerinde ifade edilme farklılıklarının tespit edilmesi ve allelik çeşitliliğin araştırılması çalışmalarının ardından bu genlerin turunçgillerde haritalanması ve bu genlere ulaşılması da büyük önem taşımaktadır. Demir klorozundan sorumlu aday genlerin haritalanması ile birlikte bu genler için spesifik markırlar belirlenerek ileride erken seleksiyon çalışmalarında kullanılabilecektir ayrıca GDO çalışmalarında da bu genlerden faydalanarak demir klorozuna dayanıklı anaç eldesi için ıslah çalışmaları yapılabilecektir.

Ülkemizin de içinde yer aldığı Akdeniz Havzasındaki meyve ağaçlarının %20-50'si demir klorozu ile ilgili sıkıntı yaşamaktadır (**Pestana ve ark., 2005**). Turunçgil tarımının yoğun olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesinde Dünya toplam turunçgil üretiminin % 22'si karşılanmaktadır ve Türkiye'nin bu üretimdeki payı % 2.5 dır (**FAO, 2006**). Turunçgiller demir klorozuna hassas olarak bilinirler ve yüksek miktarda kireç içeren topraklarda, turunçgil bitkilerinde en sık görülen beslenme problemi demir klorozudur (**Choliaras ve ark., 2004**).

Akdeniz Bölgesi turunçgiller yetiştiriciliği abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin tehdidi altındadır. Trizteza virüsünün ve bunun vektörü olan *Toxoptera citricida* zararlısının yayılması halinde tuzluluk ve kireçliliğe yeterli toleransı gösteren turunç anacının kullanımı sınırlı hale gelecektir. Bu nedenle turunca alternatif olabilecek yeni anaçların seçimine ihtiyaç duyulmaktadır (**Ollitrault ve ark., 2006**). Bu sebeplerden dolayı turunçgiller için yeni anaç ıslahı zorunlu hale gelmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında demir klorozuna dayanıklılıktan sorumlu aday genlerde allelik çeşitliliğin araştırılması amacıyla SSCP analizleri yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar tartışılmıştır.

KAYNAKLAR

- ABADIA J, MORALES F, ABADIA A., 1999 Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. Plant Soil 215, 183-192.
- ABKENAR, A. A., ISSHIKI, S., TASHIRO, Y., 2004. Phylogenetic relationships in the “true citrus fruit trees” revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Scientia Horticulturae 102: 233–242
- AÇIKALIN, E., PEKMEZCİ, M., YEŞİOĞLU, T., 2008. Yerli Turunç, Carrizo Ve Troyer Sitranjı Anaçlarının Antalya Koşullarında Yetiştirilen Marsh Seedless Altıntopunun Meyve Verimi, Kalitesi Ve Ağaç Gelişimi Üzerine Etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2008, 21(1), 105–116.
- AĞAR, A., 2007. Aurantioideae Alt Familyasındaki Cinslerde Yer Alan Bazı Türlerin SSR markırlarıyla Moleküler Karakterizasyonu. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans Tezi, Adana, 104 s.
- AKA-KACAR, Y., DEMİREL, A., TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., ULAŞ, M., YILDIRIM, B. 2005. Preliminary Results on Fingerprinting Lemon Genotypes Tolerant to Mal Secco (*Phoma tracheipfhila*) Disease by RAPD Markers. Biologia, Bratislava 60 (3): 295-300
- ANONİM, 2009a. <http://peyzaj.org/bitki-besin-elementleri/>
- ANONİM, 2009b. <http://www.bahcesel.com/forumsel/toprak-bilgisi/>
- ANONİM, 2009c <http://www.citruspages.com/>
- ANONİM, 2007. <http://www.fao.org>
- ANONİM, 1975. *Citrus* Ciba Geigy Agrochemicals. Ciba- Geigy Kld. Basle, Switzerland. 88 p.
- ANONİM, 2002. http://www.tuba.gov.tr/files_tr/yayinlar/yayin_data/genetikKaynalaralani.doc
- BALOĞLU, S., 2001. Turunçgillerde Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıklar ve Entegre Mücadelesi. Türkiye Turunçgil Bahçelerinde Entegre Mücadele. TARP Yayınları. 157 p.
- BARKLEY, N. A., ROOSE, M. L., KRUEGER, R. R., FEDERICI, C. T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm

- collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112: 1519-1531.
- BARRETT, H.C., RHODES, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1: 105–136.
- BİÇEN, B., 2008. Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Eksplant Kaynağı Ve Besi Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. Yüksek Lisans Tezi. S: 104.
- BLONDEL, W.P., 1967. Quelques Aspects du Remplacement du Bigaradier et de l'utilisation de Porte – Greffe Nouveaux. *Fruit.* 22 (1): 2 – 26.
- BOZKURT G. VE ALGÜNEŞ Ç., 2000. Tıpta moleküler genetik uygulamaları genel prensipleri. Edirne: Trakya Üniversitesi Matbaa Tesisleri, ss:42-46, 66-69.
- CASTLE, W.S. AND MANTHEY, J.A., 1998. Screening Citrus Rootstocks for Iron-Deficiency Tolerance. *Proc. Fruits* 53:375-381.
- CHOULIARAS V., DIMASSI, K., THERIOIS I., MOLASSIOTIS, A., DIAMANTIDIS, G., 2004. Root-reducing capacity, rhizosphere acidification, peroxidase and catalese activities and nutrient levels of Citrus taiwanica and Citrus volkameriana seedlings, under Fe deprivation conditions, *Agronomie* 24 (2004) 1-6.
- CHOULIARAS V, THERIOIS I., MOLASSIOTIS, A., PATAKAS, A., DIAMANTIDIS, G., 2004. Effect of iron deficiency on gas Exchange and catalese and peroksidase activity in citrus. *Journal of Plant Nutrition* 27(12):2085-2099
- COLBERT, T., TILL, B., TOMPA, R., REYNOLDS, S., STEINE, M., YEUNG, A., MCCALLUM, C., COMAI, L., HENIKOFF, S., 2001. High-Throughput Screening For Induced Point Mutations. *Plant Physiology*, Vol. 126, pp. 480-484.
- ÇEVİK, M.S., MOORE, G.A., 2007. Construction of a genetic linkage map of Citrus with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers using a progeny population from a complex intergeneric cross. *Turkish Journal of Botany.* 31:79-86

- DAŞGAN, Y., 1999. Domateste Demir Eksikliğine Dayanıklılığın Morfolojik, Fizyolojik ve Genetiksel Açidan İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. Doktora Tezi.
- DAVIES, F.S. AND ALBRIGO, L. G., 1994. Rootstocks. In: Athern,J., Rees. A. (Eds.), Citrus. CAB International, Wallingford, UK, 254p.
- EDWARDS, K., C. JOHNSTONE, AND C. THOMPSON. 1991. A Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nuc. Acids Res. 19(6):1349.
- ERGÜL, 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) genomic DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- FANG, D.Q., ROOSE, M.L., 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95: 408-417.
- FAO, 2006. www.fao.org.
- FEDERICI, C.T., FANG, D.Q., SCORA, R.W., ROOSE, M. L., 1998. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 96: 812 - 822.
- FORD, H.W. 1966. Rootstocks for Spreading Decline Araes. Citrus station Mimeo Report CES. Lake Alfred, Florida. 66 (11): 1 – 7.
- GARDNER, F.E. AND G.E. HORANİC, 1961a. A Comparative Evaluation of Rootstocks for Valencia and Parson Brown Oranges on Lakeland Fine Sand. Proc. Florida Sta. Gardner.
- GIANNETTO, S., VELASCO, R., TROGGIO, M., MALACARNE, G., STORCHI, P., CANCELLIER, S., NARDI, B., CRESPAN, M., 2008. A PCR Diagnostic tool for distinguishing grape skin color mutants. Plant Science 175, pp: 402-409.
- GÖKSEL, Ç., 1999. RAPD Markerleriyle Bazı Mandarin Çeşitlerinin Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- GÜLŞEN, O and ROOSE, M.L, 2001. Lemons: Diversity and Relationships with Selected *Citrus* Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers.Amer. Soc. Hort. Sci. 126(3):309-317.

- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- HOISINGTON, D., 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Lab. Mexico, D.F. CIMMYT.
- HENIKOFF, S., BRADLEY, J., LUCA, C., 2004. Plant Physiology: TILLING. Targeting Mutagenesis Meets Functional Genomics. Vol. 135, pp. 1-7
- HODGSON, R.W., 1965. Taxonomy and Nomenclature in *Citrus* Fruits. ‘‘Advances in Agricultural Sciences and Their Applications’’. Madras Agric. J. 317-331.
- HONGYO, T., BUZARD, S., CALVERT, R., WEGHORST, C., 1993 Cold SSCP’: a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. Nucleic Acids Research, **1993**, Vol. 21, No. 16 3637-3642.
- JACKSON, L . K., 1985. Citrus Rootstocks. The Citrus Industry. 66 (9): 18 – 23.
- KARAHOCAGİL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.
- KJOLLER, R., ROSENDAHL, S., 1999. Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales) In Roots by Nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). Plant and Soil 226: 189-196
- KOCATÜRK SEL, S., 2004. Spinal Müsküler Atrofi Hastalarında Smn Geni Ekzon 7 Ve 8’in Moleküler Analizi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Adana. Doktora Tezi. s: 12-13
- KONG, P., RUBIO, L., POLEK, M., FALK, B., 1999. Population Structure and Genetic Diversity within California Citrus Tristeza Virus (CTV) Isolates. Kluwer Academic Publisher, Virus Genes 21:3, 139-145.
- LURO, F., LAIGRET, F., BOVE, J. M., OLLITRAULT, P., 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to Citrus genetic and taxonomy. Proc. Int. Soc. Citricult.VII. Congr. 225-228.
- LURO, F., RIST, D., OLLITRAULT, P., 2000. Sequence tagged microsatellites polymorphism: An alternative tool for cultivar identification and evaluation of genetic relationships in Citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture IX. Congr. 170-171.

- NICOLOSI, E., DENG, Z.N., GENTILE A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., and TRIBULATO, E., 2000. Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Invetigated by Molecular Markers. TAG Theoretical and Applied Genetics. 100 (8): 1155-1166.
- NOVELLI, V.M., CRISTOFANI, M., and MACHADO, M.A., 1998. Evaluation of Microsatellite Markers in Cultivars of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Proceedings of First International Symposium on Citrus Biotechnology, 47-50.
- OLLITRAULT P., LOTFY S., SNOUSSI H., BELZILE C., DIGNAT G., ALARIO T., COLMENERO JM, TALON M., NAVARRO L. and MORILLON R. 2009. CIBEWU projesi 3. arayıl raporu.
- OLLITRAULT., P, TALON., M, LOTFY., S, BELFALAH, Z, MIMOUN, M. B., YEŞİLOĞLU., T, 2006. Genomic And Molecular Physiology Of Citrus Tolerance To Abiotic Stresses; A Strong Component Of The Euro-Mediterranean Initiative CIBEWU 6th PCRD INCO MPC Project On Rootstock Breeding For The Mediterranean Basin, Plant & Animal Genomes XV Conference.
- OLLITRAULT, P., 1990. Isozymes and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP's) as Genetic Markers in Citrus Selection. Proc. 4th Int. Asia Pasific Conference on Citrus Rehabilitation, 57-68.
- ÖNER C., 2002. Genetik kavramlar. 6. baskı. Ankara Palme Yayıncılık, s: 517,744, 746
- ÖZCAN, M., ULUBELDE, M., 1984. Turunçgil Anaçları. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Proje ve Uygulama Genel Müdürlüğü. Ege Bölge Zirai Araş. Ens. Yayınları No:50, Menemen, 37s.
- ÖZSAN, M., 1979. Turunçgiller Yetiştiriciliğinin Ana Sorunları.
- PANG, X. M., HU, C. G., DENG, X. X., 2007. Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 429-436.

- PAZARBAŞI A., 2003. Ovaryum Ve Endometriyum Kanserlerinde Kromozom Düzensizlikleri Ve Sık Rastlanan p53 Geni 7. Ekzon Mutasyonları. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana,
- PESTANA, M., VARENNES, A., ABADIA, J., FARIA, E.A., 2005. Differential Tolerance to Iron Deficiency of Rootstocks Grown in Nutrient Solution. *Scientia* Volume 104, Issue 1, pp 25-36.
- PESTANA, M.;DAVİD, M., VARENNES, A., ABADIA, J., FARIA, E.A., 2001. Responses of “Newhall” Orange Trees to Iron Deficiency in Hydroponics: Effects on Leaf Chlorophyll, Photosynthetic Efficiency, and Root Ferric Chelate Reductase Activity. *Journal of Plant Nutrition* 24(10):1609-1620.
- REECE, P.C., 1969. Classification of Citrus. *Proc. of First International Citrus Symposium*. 1: 429-434, University of California Riverside, USA.
- ROOSE, M.L., 1988. Isozymes and DNA restriction fragment length Polymorphism in citrus breeding and systematics, in: Goren, R. And Mendel, K. (eds) *Proc. 6th Int. Citrus. Cong. Vol: 1*, Balaban Publishers, Rehovot, Israel.
- ROZEN S, SKALETSKY H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- RUBIO, L., ANGELES AYLLONI, M., GUERRI, H., PAPPU, H., NIBLETT, C., MORENO, P., 1996. Differentiation of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV) isolates by Single-strand Conformation Polymorphism Analysis of the coat protein gene, *Association of Applied Biologists*.
- SAUNT, J., 2000. *Citrus Varieties of the World*. Sinclair Int. Limited, Norwich, England.
- SCHAFER, G., BASTIANEL, M., DORNELLES, A.L.C., 2004. Genetic diversity of citrus rootstocks based on RAPD marker analysis. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34: 1437-1442.
- SCORA, R.W., ENGLAND, A.B., CHANG, D., 1969. Taxonomic Affinities within the Rough Lemon Group (*Citrus jambhiri* Lush.) as Aided by

- Gaschromatography of Their Essential Leaf Oils. Proc. First Int. Citrus Symp. Vol 1: 441-450.
- SWOFFORD, D.L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sineauer Assoc., Sunderland, Mass., 1998.
- SWINGLE, W.T., 1943. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: Reuther W, Webber H.J, Batchelor L.D. (eds). The Citrus Industry, vol. 1. University of California, Berkeley, 129–474.
- SWINGLE, W.T., REECE, P.C., 1967. The Botany of *Citrus* and Its Wild Relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) The *Citrus* Industry, vol 1, 2nd edn. University of California, Berkeley, pp 190-430.
- ŞEKER, M., 1999. Aurantioideae alt familyasındaki önemli turunçgil genotiplerinin tanılanmasında genom büyüklükleri ve izoenzim analizlerinden yararlanma olanakları. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 206 s.
- TANAKA T., 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. Stud. Citrol. 14:1-6
- TANAKA, T., 1969. Taxonomic Problem of Citrus Fruits in the Orient . Bull. Univ. Pres. Serie B. 21: 133-138.
- TECHAPRASAN, J., KLINBUNGA, S., JENJITTIKUL, T., 2007. Genetic releationships and species authentication of Boesenbergia (Zingiberaceae) in Thailand based on AFLP and SSCP analyses. Biochemical Systematics and Ecology Vol. 36 pp: 408-416.
- TILL, B., ZERR, T., COMAI, L., HENIKOFF, S., 2006. A Protocol For TILLING and ECOTILLING in Plants and Animals, Nature Protocols, Vol. 1, No:5.
- TORRES, A. M., SOOST, R. K., DIEDENHOFEN, U., 1978. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. American Journal of Botany, 65:8 869–881.
- TULI A., 2001. Single Stranded Comformational Polymorphism. *Tanıda DNA Teknikleri*. Adana- Türkiye, Eylül s:52-61.
- TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., YILDIRIM, B., 2001. Citrus 2001 Reports : Turkey. Florida Grower Annual Edition. Mid.
- UZUN, A., 2009. Turunçgillerde Genetik Çesitliliğin Srap Markırları İle Karakterizasyonu. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 369 s.

- WHITKUS, R., DOEBLEY, J., WENDEL, J.F., 1994. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: Philips RL, Vasil IK (eds.) DNA Based Markers in Plants. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 116–141.
- YAMAMOTO, M., KOBAYASHI, S., and NAKAMURA, Y., 1993. Phylogenetic Relationships of Citrus Revealed by RFLP Analysis of Mitochondrial and Chroloplast DNA. Japanese Journal of Breeding, 43(3): 355-365,
- YEŞİLOĞLU T., F. EMEKSİZ, Ö.TUZCU, T. ALEMDAR, 2007. National Citrus SectorAnalysis:Turkey. [www2.spi.pt/euromedcitrusnet/sector_analysis_report .asp](http://www2.spi.pt/euromedcitrusnet/sector_analysis_report.asp).
- YEŞİLOGLU, T., 2002. Turunçgil Cins, Tür ve Akrabalarının RAPD Markırlarıyla Tanımlanması. TARP-2010 no’lu TÜBİTAK Projesi Sonuç Raporu. (Yayınlanmamış).
- YILDIRIM B., 1996. Değişik turunçgil anaçlarının Washington navel, valencia, moro ve yafa portakal çeşitlerinin meyve verim ve kalitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi.
- ZABEAU, M and VOS, P., 1993. Selectice restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number: 92402629.1: Publication number 0534 858 A1.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 2006 yılında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

EK. 1. ÇALIŞMADA 8 FARKLI TURUNÇGİL GENOTİPİ İLE DEMİR KLOROZUNDAN SORUMLU ADAY GENLERİN DNA DİZİLERİNE AİT SONUÇLAR

NRAMP3' Primeri DNA Sekans Sonuçları

Poncirus Pomeroy Forward Primer DNA Sekansı

NNNNNTGNACATGGCACTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTGGCT
CTGAGCTTCTTATTGGTAGGACGTCTGCTTTGCTGATTTAAATTTTTTGTTAATGTTCTAA
TTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTTCATCGAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTGTTG
CAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGTGG
GCTGTATTATTATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGATAT
TGATAACAGTAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCTAC
TCTTGCCCTTGTTGTTTCATTCATGATCAATCTTTTTGTTACAACCTGTTTTTGCAAAGGGGT
TTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTTGTAATGCTGGCCAGTACCTTCAAG
AGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTGTATATCTGGGGTATTGGGTATTAGCAG
CTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCCTTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTTTCC
TAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGCTGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATTGTC
CCAACCTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAAATG
AATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCCCTTTTGCTCTTATCCCACTTTTATATTT
GGCCTCCCAGGAA

Poncirus Pomeroy Reverse Primer DNA Sekansı

NNNNNNNNNCNANNNNNNNGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTCATTTAAAACATCT
AACATGTCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACA
GCTCCGTGTTATCAGTGCCCTCAGCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATG
ATAAACTGCCCAGCATAAGTGCCGGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCA
ATACCCAGATATACAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGG
CCAGCATTTACAAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTTCAGTACCATAAAACCCCTTTGCAAAA
ACAGTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAAGAGTAGACTCAAT
GGAATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACTGCCTTTCTTACTGTTATCAATATCTCTTGAT
TGCACAATAGCGGACTGCAAAAACACATTATGAGGTATAATAATACCTCCCACAACCTCCT
ACAGCCTGCTGTATTGTTATAGAATAATTAATTGGAACCAAAATGNCTGCAATCCATAA
TATCTTCACTACACACCTTTATGAAATCAATCTTCTTGATCT

Corsica Ağaç Kavunu Forward Primer DNA Sekansı

NNNNNTNNTGNACATGGCACTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTGG
CTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGAAGTCTGCTTTGCCGATGTAAATTTTTTGTTAATGTTCT
AATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTTCATCTAATGTCTAGTGAAATGCATTATCTGTT
GCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGTG
GGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGATA
TTGATAACAATAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCCA
CTCTTGCCCTTGTTGTTTCATTCATGATCAATCTTTTTGTTACAACCTGTTTTTGCAAAGGGG
TTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTTCAA
GAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGGTATTAGCA
GCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCCTTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTTTC

CTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGCTGAGGGCACTGATAACACNGAGCTGTGCCATTGT
CCCAACTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAACACATGTTAGATGTTTTAGAT
GAATGGCTAAGTGTGCTACCAGTCAGTTCNATTNNNNNNNGCNNNNATCCCAATAAAAT
ATTTGGTCTCCCAGGAAAA

Corsica Ağaç Kavunu Reverse Primer DNA Sekansı

NNNNNNNNANNGNACTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTCATTTAAAACATCTAAC
ATGTCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAGCT
CCGTGTTATCAGTGCCCTCAGCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGATA
AACTGCCCAGCATAAGTGCCGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAATA
CCCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGGCCA
GCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTCAGTACCATAAAACCCCTTTGCAAAAACA
GTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAAGAGTGGACTCAATGGA
ATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACGGCCTTTCTTATTGTTATCAATATCTCTTGATTGC
ACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCCACAACCTCCAAC
AGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTTGGAACCAAAATGCCTGCAACAGATAATGC
ATTTCACTAGACATTAGATGAAATGAGCATTCTTGTTCTTATACAAATTAGAACATTAAC
AAAAAAATTTACATCGGCAAAGCAGACTTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTTGG
CTTGGTCTCACCAAACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATTGTTGCAATGAGAAGTGC
AAACAGCTTCCAAATTTTCTGAA

Citrus micrantha (Microcitrus) Forward Primer DNA Sekansı

NNNNNNNNNTGNACATGGCACTTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTG
GCTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGAAGTCTGCTTTGCTGATGTAAATTTTTTTGTTAATGTT
CTACTTTGTATAAGAACAAGAACGCTCATTTTATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCT
GTTGCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTT
GTGGGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAG
ATATTGATAACAATAAGAAAGGCCATGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGT
CTACTCTTGCCCTTGTGTTTCATTTCATGATCAATCTTTTTGTTACAAGTGTGTTGCAAG
GGGTTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTT
CAAGAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGGTTATTA
GCAGCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCACTTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGT
TTCCTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGCTGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATT
GTCCCAACTATTATTGTTGCGCTTGTGTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAA
ATGAATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCCCTNTTGCTCTTATCCCACCTTTTATA
TTTGGTCTCCCCAGGAAA

Citrus micrantha (Microcitrus) Reverse Primer DNA Sekansı

NNGNANNNNNNNGNANTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTCATTTAAAACATCTAA
CATGTCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAGC
TCCGTGTTATCAGTGCCCTCAGCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGAT
AACTGCCCAGCATAAGTGCCGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAAT
ACCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGGCC
AGCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTCAGTACCATAAAACCCCTTTGCAAAAAC
AGTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAAGAGTAGACTCAATGG
AATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACATGGCCTTCTTATTGTTATCAATATCTCTTGATTG
CACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCCACAACCTCCA
CAGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTTGGAACCAAAATGCCTGCAACAGATAATG
CATTTCACTACACATTAGATAAAATGAGCGTTCTTGTTCTTATACAAAGTAGAACATTA
CAAAAAAATTTACATCAGCAAAGCAGACTTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTTG
GCTTGGTCTCACCAAACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATTGTTGCAATGANAACTGCA
AAAACAGCTTCCAATTTTCTGA

***Citrus reticulata* (Klemantin) Forward Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNTTGCACNNGGCACCTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTGG
CTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGACGTCTGCTTTGCTGATTTAAATTTTTTTGTTAATGTTCT
AATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTCATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTGT
TGCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGT
GGGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGAT
ATTGATAACAGTAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCT
ACTATTGCCCTTGTGTTTTCATTCATGATCAATCTTTTTGTTACAACCTGTTTTTGCAAAGGG
GTTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTTCA
AGAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGGTATTAGC
AGCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCACCTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTTT
CCTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGATGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATTG
TCCCAACTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAAA
TGAATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCCCTTTTGCNCTTATCCCACCTTTTATAT
TTGGCNTCCCAGGAA

***Citrus reticulata* (Klemantin) Reverse Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNAANNNGNACTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTTCATTTAAACATCTA
ACATGTCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAG
CTCCGTGTTATCAGTGCCCTCATCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGA
TAAACTGCCCAGCATAAGTGCCGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAA
TACCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGTACTGGC
CAGCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTTCACTACCATAAAAACCCCTTTGCAAAAA
CAGTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAATAGTAGACTCAATG
GAATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACGGCCTTTCTTACTGTTATCAATATCTCTTGATT
GCACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCACAACTCCA
ACAGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTGGAAACCAAAATGCCTGCAACAGATAAT
GCATTTCACTACACATTAGATGAAATGAGCATTCTTGTCTTATACAAATTAGAACATTA
ACAAAAAAATTTAAATCAGCAAAGCAGACGTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTT
GGCTTGGTCTCACCAACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATTGTTGCAATGAGAACTGC
AAAAACAGCTTCCAATTTTTCTGAA

***Citrus reshi* (Mandarin kleopatra) Forward Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNTTGCACANGGCACCTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTG
GCTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGACGTCTGCTTTGCTGATTTAAATTTTTTTGTTAATGTTT
TAATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTCATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTG
TTGCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTG
TGGGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGA
TATTGATAACAGTAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTC
TACTATTGCCCTTGTGTTTTCATTCATGATCAATCTTTTTGTTACAACCTGTTTTTGCAAAGG
GGTTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTTC
AAGAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGGTATTAG
CAGCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCACCTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTT
TCCTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGATGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATT
GTCCCAACTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAA
ATGAATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCCCATTTGCTCTTATCCCACCTTTTATA
TTTGGTCTCCCAGGAA

***Citrus reshi* (Mandarin kleopatra) Reverse Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNANNNNNCTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTTCATTTAAAACATCTAAC
ATGTCCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAGCT
CCGTGTTATCAGTGCCCTCATCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGATA
AACTGCCCAGCATAAGTGCCGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAATA
CCCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGGCCA
GCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTCACTACCATAAAACCCCTTTGCAAAAACA
GTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAATAGTAGACTCAATGGA
ATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACGGCCTTTCTTACTGTTATCAATATCTCTTGATTGC
ACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCCACAACCTCCAAC
AGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTGGAAACCAAATGCCTGCAACAGATAATGC
ATTTCACTACACATTAGATGAAATGAGCATTCTTGTCTTATACAAATTAGAACATTAAC
AAAAAAATTTAAATCAGCAAAGCAGACGTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTTGG
CTTGGTCTCACCAAACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATTGTTGCAATGAGAAGTGGCA
AAACAGCTTCAAATTTTCTCTGAA

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNNACATGGCACTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTGG
CTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGACGTCTGCTTTGCTGATTTAAATTTTTTTGTTAATGTTCT
AATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTCATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTGT
TGCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGT
GGGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGAT
ATTGATAACAGTAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCT
ACTATTGCCCTTGTGTTTCATTCATGATCAATCTTTTTGTTACAAGTGTTTTGGCAAGGG
GTTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTTCA
AGAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGGTTATTAGC
AGCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCCTTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTTT
CCTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGATGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATTG
TCCCAACTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAAA
TGAATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCNNNNTTGNTCTTATCCCACTTTTATAT
TTGGTCTCCCAGGAAA

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNNNGGACTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTTCATTTAAAACATCTAAC
ATGTCCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAGCT
CCGTGTTATCAGTGCCCTCATCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGATA
AACTGCCCAGCATAAGTGCCGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAATA
CCCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGGCCA
GCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTCACTACCATAAAACCCCTTTGCAAAAACA
GTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAATAGTAGACTCAATGGA
ATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACGGCCTTTCTTACTGTTATCAATATCTCTTGATTGC
ACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCCACAACCTCCAAC
AGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTGGAAACCAAATGCCTGCAACAGATAATGC
ATTTCACTACACATTAGATGAAATGAGCATTCTTGTCTTATACAAATTAGAACATTAAC
AAAAAAATTTAAATCAGCAAAGCAGACGTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTTGG
CTTGGTCTCACCAAACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATNGTTGCAATGAGAAGTGGCA
AAACAGCTTCCAATTTTCTGAANAN

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNTGCACATGGCACTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCAAGTGGC
TCTGAGCTTCTTATTGGTAGGAAGTCTGCTTTGCTGATGTAAATTTTTTTGTTAATGTTCTA

ATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTTCATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTGTT
GCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGTG
GGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGATA
TTGATAACAATAAGAAAGGGCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCTA
CTCTTGCCCTTGTGTTTTCGTTTCGTGATCACTCTTTTTGTTATAAATGCTTTTGCATAGGGG
TTTTAAGCTACTTGGAAAGGCCCTCTCTTATTGCTACAATATATCTTGATTGCACAACANC
AGAGATAAGGAGGACGATATGAGGCACGATAATACATATATCTGGTGCATTGGCTTACT
GTCTGCTGGACTAAGTACCATCATTACCCGGCCTAAGGGTGGGCAGTATATCATGTGTG
GGTTTCCTAAATTTTGGAGATGGAAAATTGGGCTGATGGCAATGATAACAACAAAAAGA
GACATTTGTCCCAACAAATAATAGAGCCCCCTGGTTTTTAAACCCCCCGAACACATGTTT
GAATGGTTTNAAGGAAGGGGCAAAAGTGCCACAATCTATTTTCGANACACATANANA
CTCAAAACCCCATTTTTTATTGGGGCCCAAC

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNNNAANGGACTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTCATTTAAAAACATCT
AACATGTCTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACA
GCTCCGTGTTATCAGTGCCCTCAGCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATG
ATAAACTGCCCAGCATAAGTGCCGGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCA
ATACCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGG
CCAGCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTTCAAGTACCATAAAACCCCTTTGCAAAA
ACAGTTGTAACACAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAAGAGTAACTCACT
GTAATANAGTCTGAGAGCTTTTTGGAGACGGGGCCTCTCATAGTGTCTCAATCTCTTGT
GCCTGCACCAGAGCAGAAAGAAACGGACGTGGACTTATCCAAAATAAATATACCCGCAA
CTACTGCCGTTATTGGCATCTGGATTGAGAACCACCATTAGCGACCACTAATGCTGGGAA
GTTTTATTATGTGTGGTTTCTATTTTTAGGGGTGAAAAATGGGGTTAGGGCANAGATA
AAAAGAAAAGAGACAATTTTCCTACCATTAATGAAAACCTTCTNCTTTTTAAAAAACCCCA
AACACCGGTTGNCTGGTTTAAATTAACACGGTCCAGGGTAGCCACAATTTNCTTTTTTGT
ANACCTTNGANAAANTGAAACCACNTTTTCAATTTGGCCNAAAA

***Citrus maxima* (Sadok pink) Forward Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNGCACATGGCACTTTCGTTTGCCTGGATGTTTGGTGAGACCAAGCCGAGTGG
CTCTGAGCTTCTTATTGGTAGGAAGTCTGCTTTGCTGATGTAAATTTTTTGTAAATGTTCT
AATTTGTATAAGAACAAGAATGCTCATTTTCATCTAATGTGTAGTGAAATGCATTATCTGT
TGCAGGCATTTTGGTTCCAAAACCTCAGTTCCAAAACAATACAGCAGGCTGTTGGAGTTGT
GGGCTGTATTATCATGCCTCATAATGTGTTTTTGCCTCCGCTCTTGTGCAATCAAGAGAT
ATTGATAACAATAAGAAAGGCCGTGTCCAAGAAGCTCTCAGATACTATTCCATTGAGTCT
ACTCTTGCCCTTGTGTTTCATTTCATGATCAATCTTTTTGTTACAACTGTTTTTGCAAAGGG
GTTTTATGGTACTGAACAGGCCAATAACATTGGCCTCGTAAATGCTGGCCAGTACCTTCA
AGAGAAGTACGGAGGTGGACTTTTCCCAATTTTATATATCTGGGGTATTGGATTATTAGC
AGCTGGACAGAGTAGCACCATTACCGGCCTTATGCTGGGCAGTTTATCATGGGAGGTTT
CCTAAATTTGAGGTTGAAAAAATGGCTGAGGGCACTGATAACACGGAGCTGTGCCATTG
TCCCAACTATTATTGTTGCACTTGTTTTTGATACCTCTGAAGACATGTTAGATGTTTTAAA
TGAATGGCTAAATGTGCTACAGTCAGTTCAGATCCCTTTNCTCTTATCCCACNTNTATAT
TTGGNNNCCCAGNAA

***Citrus maxima* (Sadok pink) Reverse Primer DNA Sekansi**

NNNNNNNNNNNANNCTGACTGACTGTAGCACATTTAGCCATTCATTTAAAAACATCTAAC
ATGCTTTCAGAGGTATCAAAAACAAGTGCAACAATAATAGTTGGGACAATGGCACAGCT
CCGTGTTATCAGTGCCCTCAGCCATTTTTTCAACCTCAAATTTAGGAAACCTCCCATGATA
AACTGCCCAGCATAAGTGCCGGTAATGGTGCTACTCTGTCCAGCTGCTAATAACCCAATA
CCCCAGATATATAAAATTGGGAAAAGTCCACCTCCGTACTTCTCTTGAAGGTACTGGCCA
GCATTTACGAGGCCAATGTTATTGGCCTGTTTCAAGTACCATAAAACCCCTTTGCAAAAACA

GTTGTAACAAAAAGATTGATCATGAATGAAACAACAAGGGCAAGAGTAGACTCAATGGA
ATAGTATCTGAGAGCTTCTTGGACACGGCCTTTCTTATTGTTATCAATATCTCTTGATTGC
ACAAGAGCGGAGTGCAAAAACACATTATGAGGCATGATAATACAGCCCACAACCTCCAAC
AGCCTGCTGTATTGTTTTGGAAGTGAAGTTTTGGAACCAAAATGCCTGCAACAGATAATGC
ATTTCACTACACATTAGATGAAATGAGCATTCTTGTCTTATACAAATTAGAACATTAAAC
AAAAAAATTTACATCAGCAAAGCAGACTTCCTACCAATAAGAAGCTCAGAGCCACTCGG
CTTGGTCTCACCACATCCAGGCAAACGAAAGTGCCATTGTTGCAATGAGAACTNNNN
AACAGCTTCNAATTTTTNCTGAANN

Fe_S 3' Primeri DNA Sekans Sonuçları

Poncirus Pomeroy Forward Primer DNA Sekansı

AAAAAACTGATTTTCGTCCAAAAAAGCTCAGGTATCAGATTTTCCTTGCGGTTGTTTTGG
ATGTTATGGACATGTAGACAACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATA
TTGTTACTTAACTATTAACAAGTATTAATTGACATCGTTAGGTGGTTCTGTAAAGCTGAA
ATGGGCTTCAAATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTTCAAACAAACACCATATTGA
ATTGAATTCTCATGTAACAAAATAAAGAAAAAAGTTTGCTGAGTTATTGCGAAGAGGTT
TACTGACTTCTGCGGCTGTGCAGTTTTCTACCACTGCATGCAATTTGCCATTGGCCTAAAC
TATTGTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGGTAC
CAGGCCATTTTCAACTAATAATTTGTCTACCAATGACATGTCTTCAATGTAGATCATAATC
ACTTCCTTTCTATTTTAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTCTACTACATAGAGCAA
AACAGAAGTAGGAGATCCATTTGCTTTTTATGTTAGATTTCTTGGCTTGACATATTTTGCC
ATCACCAGCATATGGGACATTTGTCAATTGCTTTCTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCT
GCATGCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTTGGTATTGCCTATTACTTCAAATCAT
TCTAAATAAAACTACATTCTTGCGCTTCTGCAGTTTTAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGT
CTATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAAGTGTGGAGTATTTGCATCCCTG
TTACTCCTTGATGCTTCTTAATTTGGCCTTTTCATGGAAGGATTGAAACGTAACTTTTATTC
TTTTACCCCTCTACTTTTTTACAAATCAAAGTAAGAAATAAA

Poncirus Pomeroy Reverse Primer DNA Sekansı

AGACATAGGGGATGGAGAAGAACCGAAAGCAAGCAGTTGCTCCCGCTGCCTTTGGTGCT
CACCGAGGATGTCTACCTTTCATCCACAACCTTCAGACAAGTGCGTAATGCTTGGCCAGC
CAGGGAAAAGAATCATCTACGTTCAATTCTTCATGTACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAG
CTTCCACCCTGCTTAGACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTCACCACAACCA
CACTGCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAACACAAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAAGGT
AATATAAATTAACAGAAGCAAAGTCAAGCCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAA
ATACATGCCATCAACAAGATTTAGCACAATAAAAAAGATTAATAAGGATCACCACCAGCC
ATACAGATATCTCGCCCATAAGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTT
GATATGTAAGGGCTGTTGACTCTTTCTAACCCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGATA
AAGCAACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTACCTCTGATTTGTAAAAAGTAG
ATGGGTAATAGAATAAAAGTTACGATTTCACTCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGC
ATCAAGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATA
CAGGTACATTATAGACAAAAATGACTAAGAGTAAATTAATAAACTGCAGAAGCGGCAAGA
ATGTAGTTTTATTTAGAATGATTGCAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCAGCAGG
ATCAATCCATAAGCATGCAGAAGGTGGATGTTAAGGCTAAATAAAGAAAGCAATGACAA
ATGTCCCATATGCTGGTGATGGCAAAATATGTCCAGCCAAGAAATCTAACATAAAAAGC
AAATGGATCCC

Corsica Ağaç Kavunu Forward Primer DNA Sekansı

AAAAGAACGTTATCGTGCAGATAGCTCAGGTCATAAATTTTCTTGCAAGTTGTTTTGGAT
GTTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATATT
GTTACTTAACTATTAACAAGTATTAAGTACATCTTTAGGGTTCTGTAAAGTTGAAATG

GGCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAATT
GAATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTCAGAAGAGGTTTA
CTGACTTCTGCAGTTGTGCAGTTTCTACCAGTGCATGCAATTCATTGGCCTAAACTATT
GTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCGGG
CCATTTTCAACTAATACACTGTCTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCACTT
CCTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAGAGCAGAACA
GAAAGTAGGAGATCCATTTGCTTTTTATGGTAGATTTCTTGGTTTGACATACTTTGCCATC
ACCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTTCTTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCTGCA
TGCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTGGTATTGCCTATTACTTTGAATCATTCT
AAATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCAGTTTAAATTTTACTCTTAGTCATTGTTGTCT
ATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAAGTGTGGAGTATTTGCATCCATGTT
ACTCCTTGATGCTTTCTAATTTGGCCTTTCATGGAGGATTGAAATCGTAACCTTTATTCTA
TTACCCATCTACTTTTACAAATCAGAGGGCAAAAT

Corsica Ağaç Kavunu Reverse Primer DNA Sekansı

AGACCAGGGGGCCGAAGACACACAGAAGCACCTGATTGCTCCCCTGCCATTAAAGCTCAC
CGAGGATGTCTACCTTTTCATTACAACTTCAGACAAGTGCGTCATGCTTGGCCAGCCAG
GGAAAAGAATCATCGACGTTTCATTCTTCATGCACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTT
CCACCCTGCTTAGACGCTCCCCTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTCCCCCAACCCCCCT
GCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAAGGTAATT
TAAATTAACAGAAGCAAAGTCAAGCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATAC
ATACCATCAACAAGATTTAGCACAATAAAAAGATTAATAAGGATCCCCACCAGCCATAC
AGATATGTCGCCATAAGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGATA
TGTAAGGGCTGTTGACTCTTTCTAACCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGATAAAG
CAACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCTGATTTGTAAAAAGTAGATGG
GTAATAGAATAAAAAGTTACGATTTCAATCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATCA
AGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATACAGG
TACATTATAGACAACAATGACTAAGAGTAAATTAATACTGCAGAAGCGGCAAGAATGT
GGTTTTATTTAGAATGATTCAAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCAGCAGGATCA
ATCCCTAAGCATGCAGAAGGTGGATGTTAAGGCTAAATAAAGAAAGCAATGACAAATGT
CCCATATGCTGGTGATGGCAAAGTATGTCAAACCCAGGAAATCTACCATAAAAAG

Citrus micrantha (Microcitrus) Forward Primer DNA Sekansı

AAAGAAAGGATTTCGTGCACATAGCTCAGGTATCAAATTTTCTTGCAGTTGTTTTTGGATG
TTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATATTG
TACTTAACTATTAAACAAGTATTAAGTACATCTTAGGGTTCTGTTAAGTTGAAATGG
GCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAAAAACACTATATTGAATTG
AATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTCGGAAGAGGTTTAC
TGACTTCTGCAGCTGTGCAGTTTCTACCAGTGCATGCAATTCATTGGCCTAAACTATTG
TGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCTGCTAGCATTATTGTTGCTACCAGGC
CATTTTCAACTAATACACTGTCTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCACTTC
CTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAGAGCAGAACAG
AAAGTAGGAGATCCATCTGCTTTTTATGGTAGATTTCTTGGTTTGACATATTTGCCATCA
CCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTTCTTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCTGCAT
GCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTGGTATTGCCTATTACTTCGAATCATTCTA
AATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCAGTTTAAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGTCTAT
AATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAAGTGTGGAGTATTTGCATCCATGTTAC
TCCTTGATGCTTCTTAATTTGGCCTTTCATGGAGGATTGAAATCGTAACCTTTTATGCTATT
ACCCATCTACTTTTTACAAATCCGAGGCAGAAATTA

Citrus micrantha (Microcitrus) Reverse Primer DNA Sekansı

AAAAAGGGGGAGTGGAAAGAAACAAGCACCATGTTGCTCCACTGCCATTAAAGCTCACC
 GAGGATGTCTACCTTTTCATTCACAACCTTCAGACAAGCGCGTAATGATTGGCCAGCCAGG
 GAAAAGAGTCATCTACGTTTCATTCTTCATGTACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTTCC
 ACCCTGCTTAGACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTACACCACAACCACACTG
 CCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAAGGTCATTT
 AAATTAACAGAAGCAAACCTAGGCAATCAAGCCCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATACA
 TGCCATCAACAAGATTTAGCACAATAAAAAAGATTAATAAGGATCACCACCAGCCATACA
 GATATGTCGCCCATAGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGATAT
 GTAAGGGCTGTTGACTCTTTCTAACCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGATAACGC
 AACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCGGATTTGTAAAAAGTAGATGG
 GTAATAGCATAAAAGTTACGATTTCAATCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATCA
 AGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATACAGG
 TACATTATAGACAAAAATGACTAAGAGTAAATTAATACTGCAGAAGCGGCAAGAATGT
 GGTTTTATTTAGAATGATTGGAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCAGCAGGATCA
 ATCCATAAGCATGCAGAAGGTGGATGTTAAGGCTAAGTAAAGAAAGCAATGAACAATGT
 CCCATATGCTGGTATGGCAAAATATGTCAAACCAAGAAATCTACAATAAAAAAGCAGAT
 GGATC

***Citrus reticulata* (Klemantin) Forward Primer DNA Sekansi**

AGAAAAGGGATTGCGAATACATAAGCTCAGGTATCAGATTTGCTTGCAGTTGTTTTTGGGA
 TGTTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATAT
 TGTTACTTAACTATTAAACAAGTATTAAGTACATCTTTAGGGTTCTGTGAAATTGAAAT
 GGGGTTCAAATATTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAAT
 TGAATTTCTCAAGCACCAAAATAAAGAAAAAAATTTGCAGAGATATACGGAAAAAGTTT
 ACTGACTTCTGCACCTGTGCACTTTCCTACCAAAGCACGCAAATTCATTGGTTCGAAACTA
 TTGTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCA
 GGCCAGTTTCTACTAATACACTGACTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCA
 CTTCTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAAAGCAGA
 ACAGAAAGTAGGAGATTCATTTGCTTTTTATGGTAGATTTCTTGGTTTGACATATTTTGCC
 ATCACCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTTCTTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCT
 GCATGCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTTGATTGCCTATTACTTCAAATCAT
 TCTAAATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCACCTTTAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGT
 TTATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAACTGTTGGAGTATTTGCATCCATG
 TTAATCCTTGATGCTTCTTAATTTTGCTTTTCATGGAGGATTGAAATCATAACTTTTTTTCT
 ATTACCCATCTACTTTTTACAAAACCGAAGAAAAAAATTAAAAAA

***Citrus reticulata* (Klemantin) Reverse Primer DNA Sekansi**

AAAGGGGGGGGAAAAAATAGAAAAAGCACACTGTTGTTCCACCTGCCATTAAAGCTCAC
 CGAGGATATCTACCTTTTCATTCACAACCTTCAGACAAGTGCGTAAGGCTTGGCCGGCCAG
 AGAAAAGAATCATCTACGTTTCATTCTTCATGTAATATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTTC
 CACCCTGCTTAGACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTACACCACAACCACACT
 GCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCACACCTGCACGCCAAAAAAGGTAATT
 TAAATTAACAGAAGCAAACCTAGGCAATCAAGCCCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATAC
 ATGCCATCAACAAGATTTACCACAATAAAAAAGATTAATAAGGATCACCACCAGCCATAC
 AGATATGTCGCCCATAGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGATA
 TGTAAGGGCTGTTGACTCTTTCTAACCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGATAAAG
 CAACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCGGATTTGTAAAAAGTAGATG
 GGTAATAGAATAAAAGTTACGATTTCAATCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATC
 AAGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAAATAATTAATTAATACAG
 GTCCTTTATAAACAAAAATGACTAAAAGTAAATTAATACTGCGGACGCGGCGAGAATG
 TGGTTTTATTTAGAATGATTGGAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCAGCAGGATC
 AATCCATAAGCATGCAAAAGGTGGATGTTAAGGCTAAATAAAGAAAGACAATGACAAAT

GTCCCATATGGCTGGTGTATGGCAAAATATGTCCAACCCAAGAAATCTACCCATAAAAAA
CAA

***Citrus reshi* (Mandarin kleopatra) Forward Primer DNA Sekansi**

AAAAAGGGGTTGTGCGCAGAAAAGCTCAGGTATCAAATTTTCTTGCACTTGTTTTGGAT
GTTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATATT
GTTACTTAACATATTAACAAGTATGAACTGACATCTTTAGGGTTCTGTAAAGTTGAAATG
GGCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAATT
GAATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTCGGAAGAGGTTTA
CTGACTTCTGCAGCTGTGCAGTTTCCTACCAGTGCATGCAATTTTCATTGGCCTAAACTATT
GTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCAG
CCATTTTCAACTAATACATCACTTCCTTTTTATTCAAACCTTCGTTAGTAGTGCCATCATT
ACTTTTACTACCTAGAGCAGAACAGAAAGTAGGAGATCCATTTGCTTTTTATGGTAGATT
TCTTGGTTTGACATATTTTGCATCACCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTTCTTTAGTT
AGCCTTAACATCCACCTTCTGCATGCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTGGTAT
TGCCTATTACTTCGAATCATTCTAAATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCAGTTTTAAT
TTTACTCTTAGTCATTTTTGTCTATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAAGTG
TTGGAGTATTTGCATCCATGTTACTCCTTGATGCTTCTTAATTTGGCCTTTCATTGACGATT
GAAATCGTAACCTTTTATTCTATTACCCATCTACTTTTTACAAATCAGAGGCAGAAATTAG
AAATAGCTTGAGTTGAGCTTAAGTTGCTTTATCAGAATA

***Citrus reshi* (Mandarin kleopatra) Reverse Primer DNA Sekansi**

AAAAGGGTGGATGATGAAATAAGAAAGCCACCTGTTGCTCCAAGTCCATTAAAGCTCA
CCGAGGATGTCTACCTTTCATTCCACAACCTTCAGACAAGTGCGTAATGCTTGCCAGCCA
GGGAAAAGAATCATCTACGTTCACTTCTTCATGTACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTT
CCACCCTGCTTAGACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTCACCACAACCACAC
TGCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAAGGTAAT
ATAAATTAACAGAAGCAAACTAGGCAATCAAGCCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATA
CATGCCATCAACAAGATTTAGCACATAAAAAAGATTAATAAGGATCACCACCAGCCATA
CAGATATGTCGCCATAAGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGAT
ATGTAAGGGCTGTTGACTCTTTCTAACCCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGATAAA
GCAACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCTGATTTGTAAGAAAGTAGATG
GGTAATAGAATAAAAGTTACGATTTCAATCGTCAATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATC
AAGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATACAG
GTACATTATAGACAAAAATGACTAAGAGTAAAATTAAGAACTGCAGAAGCGGCAAGAATG
TGGTTTTATTTAGAATGATTCGAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCAGCAGGATC
AATCCATAAGCATGCAGAAGGTGGATGTTAAGGCTAACTAAAGAAAGCAATGACAAATG
TCCCATATGCTGGTGTATGCAAAATATGTCAAACCAAAAAATCTACAATAAAAAGCAAAT
GGA

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

AAAAAAGTGGGTTTCGCCGCTCAATGCTCAGGTAATAAATTTTCTTGCACTTGTTTTGG
ATGTTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATA
TTGTTACTTAACATATTAACAAGTATTAAGTACATCTTTAGGGTTCTGTAAAGTTGAAAT
GGCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAAT
TGAATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTCGGAAGAGGTTT
ACTGACTTCTGCAGCTGTGCAGTTTCCTACCAGTGCATGCAATTTTCATTGGCCTAAACTAT
TGTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCAG
GCCATTTTCAACTAATACACTGTCTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCACT
TCCTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAGAGCAGAAC
AGAAAGTAGGAGATTCATTTGCTTTTTATGGTAGATTTCTTGGTTTGACATATTTTGCCAT
CACCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTTATTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCTGC

ATGCTTATGGATTGATCCTGCTGGCAACTTTTGTGGTATTGCCTATTACTTCGAATCATTC
TAAATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCAGTTTTAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGTTT
ATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGAAACTGTTGGAGTATTTGCATCCTTGTT
ACCCCTTGATGCTTCTTAATTGGGCCTTTCATGAAGGATTGAAAATCTAACTTTTATTCTA
TTACCCTTCTACTTTTTTTACAACCCCAAGCAGA

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

AGGGGGGGGGGAAAGGGGAATGAATGGGAGTGTCTTCCGGGCGAAGCCTGGAACCCAC
TGCCGGGAAAATCTCGGCGAGGACCTGCGCCATTTGGTGAACAGGCCAGCTCGGAACCG
CCCGTCCCAACCGCACCTGCTGAAGTGAATGTGGAGGATCGAATACCCCGACCGATTGT
CCCATTGAGCTGCGCGGGGGCGACCTTATCGCCAGAAAAGACCGACATTCACCAGGA
GGGGGAGCGTGAGAGTGTGGCTCTGCGTTGCACTACTAAAACAGAAGAAAGCCGCGGGC
TAATATCTCTGGGGAAAAATCCCTCAGCCCAGCCCAAGAGAAATCTACTAATCCCCCGC
CATCGGGGCGCGGTGATCGAGCGTGTGACGAGCAAAGAAGTCTGCGCCGCGCCCTTAC
CCCGAGCGATAACAGCGCCTGCAATCTACTACTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATT
GACTGCCTTTATGCCCCAGATCGACAACCACGTCACCCGCCTTGACTGCTGGGAAACGGA
ACTGAATGATGCACTTCCCTGCTACGCCCCGAACACCACTACCCCGGCCACCATGGCCGC
GACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGAGTCTGAGCGACCGTTCTCTACGGCTCCTAAT
GCAATGGATGGTGGACCATCAGGTCGCCGGACCGTTGATGCGCTCCCTGCTGCCACGGG
CTTTATTAACCCCAATAACACCCGAAGTGTGATCTAGTTGCTCACGGGATTGTCACCCT
GCTTGGCCCGAATAACAAAACAGAGCGCCATTGTGGTAATTTATCTGGGGGAAAACCCC
CGCAAACATGTGCAACAAATCAACAAATCTCCCGGAACGGCACCGCCTTAACCACGCCC
GAAACCACTAAAAAAC

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

AAAAAGGGGATTTCGTTAAGAAAGCTCAGGTATCAAATTTTCTTGAGTTGTTTTTGGATG
TTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACCTTGATGGCTGTGATATATTG
TACTTAACTATTAAACAAGTATTAAGTACATCGTTAGGGTTCTGTTAAGTTGAAATGG
GCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAATTG
AATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTTCGGAAGAGGTTTAC
TGACTTCTGCAGCTGTGCAGTTTCTTACCAGTGCATGCAATTTTCATTGGCCTAAACTATTG
TGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCAGGC
CATTTTCAACTAATACACTGTCTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCACTTC
CTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAGAGCAGAACAG
AAAGTAGGAGATCCATTTGCTTTTTATGGTAGATTCTTGTTTGACATATTTTGCCATCA
CCAGCATATGGGACATTTGTCATTGCTTCTTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCTGCAT
GCTTATGGATTGATCCTGGTGGCAACTTTTGTGGTATTGCCTATTACTTCGAATCATTTCTA
AATAAAACCACATTCTTGCCGCTTCTGCAGTTTTAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGTTTAT
AATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAAGTGTGGAGTATTTGCATCCATGTTAC
TCCTTGATGCTTCTTAATTTGGCCTTTCATGGAGGATTGAAATAGTAACCTTTTATTCTATT
ACCATCTACTTTTTTACAAATCCGAGGCAAGAAATAGAA

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

AAAAAGGGGGTGGAGAAAAAACAAAAGCACCTGATTGCTCCACTGCCATTAAAGCTCAC
CGAGGATGTCTACCTTTCATTCACAACCTTCAGACAAGTGCGTAATGCTTGGCCAGCCAG
AGAAAAGAATCATCTACGTTTCTTTCATGTACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTTC
CACCTGCTTAAACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTCACCACAACCACACT
GCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAGGTAATTT
AAATTAAACAGAAGCAAACCTGGGCAATCAAGCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATACA
TGCCATCAACAAGATTTAGCACAATAAAAAGATTAATAAGGATCACCAACAGCCATACA
GATATGTCGCCCATAGGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGATAT
GTAAGGACTGTTGACTCTTTCTAACCCAGATTGCGCTGTCACCTCATATACTGAGAAAGC

AACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCGGATTGTGAAAAAGTAGATGG
GTAATAGAATAAAAAGTTACTATTTCAATCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATCA
AGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATACAGG
TACATTATAAAACAAAAATGACTAAGAGTAAAATTA AAACTGCAGAAGCGGCAAGAATGT
GGTTTTATTTAGAAATGATTCGAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCACCAGGATCA
ATCCATAAGCATGCAGAAAGTGGATGTTAAGGCTAAGTAAAAAAGCAATGACAAATGT
CCCATATGCTGGTGATGGCAAAATATGTCAAACCAAGAAATCTACCATAAAAAGCA

***Citrus maxima* (Şadok pink) Forward Primer DNA Sekansı**

AAACAAAGGGATTGCGCGTAATACGCTCAGGTAATCAATTTTCTTGCAGTTGTTTTTGA
TGTTATGGATATGTGGACGACCTTTTTGTTCTTAATGACCACTTTGATGGCTGTGATATAT
TGTTACTTAACTATTAACAAGTATTAAGTACATCGTTAGGGTTCTGTAAAGTTGAAAT
GGGCTTCAGATTTTTTATTCTTTTTATTTCTGGATGTGTACAAACAAACACTATATTGAAT
TGAATTCTCATGCAACAAAATAAAGAAGAAAAGTTTGCAGAGTTATTTCGAAGAGGTTT
ACTGACTTCTGCAGCTGTGCAGTTTCTTACCAGTGCATGCAATTTTCATTGGCCTAAACTAT
TGTGTCCTTCATGACCTTAGCTGCTACATGTAACCTCCGCTAGCATTATTGTTGCTACCAG
GCCATTTTCAACTAATACACTGTCTACCAATGACATGTCTTTAATGTAGATCATCATCACT
TCCTTTCTATTCAAACCTTCGTTGGTAGTGCCATCATTACTTTTACTACCTAGAGCAGAAC
AGAAAGTAGGAGATCCATTTGCTTTTTATGGTAGATTTCTTGGTTTGACATATTTTGCCAT
CACCAGCATATGGGACATTTGTCAATTGCTTTCTTTACTTAGCCTTAACATCCACCTTCTGC
ATGCTTATGGATTGATCCTGGTGGCAACTTTTGTGGTATTGCCTATTACTTCGAATCATTC
TAAATAAAACACATTTCTGCCGCTTCTGCAGTTTAAATTTTACTCTTAGTCATTTTTGTTT
ATAATGTACCTGTATTAATTACTTATCTACTTGGAACTGTTGGAGTATTTGCATCCATGTT
ACTCCTTGATGCTTCTTAATTTGGCCTTTTCATGGAGGATTGAAATAGTAACCTTTTATTCTA
TTACCCATCTACTTTTTACAAATCCGAGGCAGAAATTAA

***Citrus maxima* (Şadok pink) Reverse Primer DNA Sekansı**

AGACAAATGATGGATGAAGACATAAAGAACTAGTTGCTCCAAGTGCATTAAGCTCAC
CGAGGATGTCTACCTTTTCATTCACAACCTTCAGACAAGTGCGTAATGCTTGGCCAGCCAG
AGAAAAGAATCATCTACGTTTCTTTCATGTACTATTAGTTTGTAAGAATCCCTAGCTTC
CACCCTGCTTAGACGCTCCACTACTGCTGGTTGTCATAAAGGATTCACCACAACCACACT
GCCCTTTAGAGTTTGGATTAATGAATACAACTCAGACCTGCACGCCAAAAAGGTAATTT
AAATTAACAAAAGCAAAGTGGGCAATCAAGCCCCTTGGCAGTTGTTACAGTAAATACA
TGCCATCAACAAGATTTAGCACATAAAAAGATTAATAAGGATCACCACCAGCCATACA
GATATGTCGCCCATAGGCAACAATGTTATTAAGAGGTCCGAAGGAAGGAGACTTGATAT
GTAAGGACTGTTGACTCTTTCTAACCCAGATTGCGCTGTACCTCATATACTGAGAAAGC
AACTTAAGCTCAACTCAAGCTATTTCTAATTTCTGCCTCGGATTGTGAAAAAGTAGATGG
GTAATAGAATAAAAAGTTACTATTTCAATCCTCCATGAAAGGCCAAATTAAGAAGCATCA
AGGAGTAACATGGATGCAAATACTCCAACAGTTCCAAGTAGATAAGTAATTAATACAGG
TACATTATAAAACAAAAATGACTAAAAGTAAAATTA AAACTGCAGAAGCGGCAAGAATGT
GGTTTTATTTAGAAATGATTCGAAGTAATAGGCAATACCACAAAAGTTGCCACCAGGATCA
ATCCATAAGCATGCAGAAGGTGGATGTTAAGGGTAAGTAAAAAAGCAATGACAAATGTC
CCATATGCTGGTGATGGCAAAATATGTCAAACCAAAAAATCTACCATAAAAAGCAAAGG
GTC

IRT1 5' Primeri DNA Sekans Sonuçları

***Poncirus Pomeroy* Forward Primer DNA Sekansı**

GGGCCGGAACGGGCTATGCACACTGATAGAACCTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGCAG
CTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTTAC
CTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTCGGGATTGTTGCCATG

TTGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGAAA
TGCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAAAGAGCCGTAAAA

Corsica Ağaç Kavunu Forward Primer DNA Sekansı

CGGAGCGGACCGAGATATGCCTACTGATAGAAACCTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGC
AGCTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTT
ACCTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCA
TGTTGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGA
AATGCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAGAGAGCCGTAAAA
NC

Citrus micrantha (Microcitrus) Forward Primer DNA Sekansı

CCGGGCGGGACGAGCTCTGCACATGATAGAACCTTTTCGTTGTCGTCGAAGGCTTTTCGCAG
CTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTTAC
CTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCATG
TTGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGAAA
TGCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAGAGAGCCGTAAATCTG

Citrus reticulata (Klemantin) Forward Primer DNA Sekansı

GCAACGGGATCCGGCTCTGCCCCTAGAAGAACCTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGCAG
CTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTTAC
CTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCATG
TTGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGAAA
TGCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAAAGAGCCGTAAAA

Citrus reshi (Mandarin kleopatra) Forward Primer DNA Sekansı

CAGGGGCATCGAGCTCTGCTACTAGAAGAACCTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGCAGC
TGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTCACC
TCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCATGT
TGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGAAAT
GCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAGAGAGCCGTAAAA

Citrus reticulata (Klemantin) 1x Forward Primer DNA Sekansı

GGCGCCGGGATCGGGGTCAGATACTGATAGAACTTCTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGA
AGCTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTC
ACCTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCA
TGTTGTCTGCCATCGCACCCCTAATGGTGGACTCATTGCCCACCAGTATTTATAGCAAGA
AATGCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAAAAA

Citrus maxima (Sadok chandler) 1x Forward Primer DNA Sekansı

GGCCGGGGACCGGCTCTGAATATGATAGAACCTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGCAGC
TGGAATTATTCTAGCCACTGGATTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTTACC
TCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCATGT
TGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGAAAT
GCAATTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAGACCAAGAAAGAGCCGTAAAA

Citrus maxima (Sadok pink) Forward Primer DNA Sekansı

CCACCCGAAAACACGCATACAAGCAAGATAGAAACTTTTTCGTTGTCGTTAAGGCTTTTCGA
AGCTGGAATTATTCTAGCCACTGGATTTCATGCACGTGTTGCCTGATTCATTTGACATGCTT
ACCTCTAGTTGCTTGAAAGATAATCCTTGGCACAAAGTTCCCGTTTTTCGGGATTTGTTGCCA
TGTTGTCTGCCATCGCAACCCTAATGGTGGACTCATTGGCCACCAGTATTTATAGCAAGA
AATGCATTTCTGGGGTTATTCCTGAAGCCGGCGAGCGAAACCAAAAAAGAGCAAAATNT
T

IRT1 3' Primeri DNA Sekans Sonuçları

Poncirus Pomeroy Forward Primer DNA Sekansı

AAAAGGTATTGTGGATAGTACTAACTTCGTTATCGTGTTATCGCCATGGTTAGTCCTTCAA
TTTGCACCTTCGACTTATCGTTCAGACTTGTTAATGATTTTTCTTAATTTAAGACTTTATTA
TTTACTAATGCTTCTACCGTACCGTACTTCATGATGATAGTTTAATTTAATTAAGGGTCAA
GTACCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCACGTTACGTGCCTTATGACTG
ATTATGCACATATATAATTAATTACTTTGTCTAATTAATAATGATGACATCTTGTTTAT
TTATTTATTTTTGTTTTTTAAAATGTTAAAATGCTTGAATGGAACTTGGAATTGTGGATC
TTTCGTTTGTTATATTACTCTAAGTTGCACCCACAAACCATACTTGCACCTTAAACGTCT
CATTGCTGCCCTTTGCCCCCTTCCTACGTTCAAAGGAATGAACCAAGGGGCTTACATTCTT
CCGTTCTTACACCATATCCCTTAATTATGTAACAAGAGATCAAAAAATAAAAAATGATTT
AGGGGTTCGAAGATATTATTTTATATTTATTTGTTGTTTAGGAGATGGGTGTGTATATGA
GGATATTTACTTGATTCTTACAAGCATAAAAGAATGAAAGAAAAATGAACAATGCAACC
TGACCAACTAAGACTTTTCTCATAATCCATTATCACATCACTTGATCAGGCGTTGAGACA
AAGTAACTTACTCCTCTCATCTGCAATGATATGATCAAACGCATTATCTTTCCCAAATATC
ACTTTCTCACACCCAATTACAAAATTCCTCAGTTTCTTATAATTTTTAACTTAAGAAT
TGAAAAAATAATAATTCTAAAAAAATTTGTTTCTTTTTAAAATTTCAAATTGCCGGC
GGAAAACAAATTTAAAAAAAAGCCT

Poncirus Pomeroy Reverse Primer DNA Sekansı

GGGGGGGTTGGCATGGAGAGATGAAGTTACAAGCTTCTTCATCAACTTGTACTCCGCCTG
CAATTTGATAATTTCAAATGATAACAACTTTTGTGTTAGAATTTAATATTTATCAATTCAT
AAGCTACAAAATTAATATGAACTGAGTGTTTATTGTAATTAGAACGTATAAAGTCTTAA
ATGGAAAAATTAATGGACATAGCTCCTCTCATCCCACATGTAATTTTTATTTAGTTTGTCC
CCCTGCCTCAACAAGTGATTGGATAATGATAAAGACAAAACCTCTTCGCTGCTCACTGAT
CATTGTTCATTTTTCTTCATTCTTGCTAGATGCATGATTCAATCATTTATCACACCCCCC
TCTCCCAAACACCAAAACACCAAAAAATAAAATTTAATATTTTCGGAACACCTTCAACAT
TTTTTAATCTCTGATCCCTTGAACCATTATTAAGGAGTTTGGCGTAAAAACTGAAAACCTC
AACCCCTTTCCCCCTTCCTTCTAACGTTTGATGGAGGCAAAGGGCAGCCCTTAAACCTT
GAATGTTGCGTTTGTGGTTCGTGCCTCCAACCCAACTCCTTTCACAGATCAACAATCCCC
AGTTCCAATACCCGCTGCCTGCCGTTTTCTTTTCCATAAACCATAATAAATAAATAAACC
AGATGGCCTCCTTTTTTTAATTAAAAAAATAATTAATTATTTTTTGCATAATCAGTCAA
TAGGCAGGGAACGGGGCAAAGTTTTTTTCCCCACAAAGTTGAACCTTGGAACCTTGACCC
CTATTTAAATTAACCTTTACCCCTGAAAACACGGACCGAGAAACCATAAAAAAATATA
AACTCTTAATTAAAAAAAACCATAACCAATTCCAACGATAACCCAATTGGAATTGAA
GGATTACCTGGGCAATACACCATAACCAAGCATTTCTGGCTAGAT

Corsica Ağaç Kavunu Forward Primer DNA Sekansı

GGAAAGGTAATTGGGAATAGCACTGACTTCGTTATCGTGTTATCGCCATGGTTAGTCCTT
CAATTTGCACTTCGACTTATCGTACGTTTCAGACTTGTTAATGATTTTTCTTAATTTAAGA
CTTTATTATTTACTAATGCTTCTGCCGTACCGTACCTCATGATGATAGTTTAATTTAATTA
AGGGTCAAGTACCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCACGTTACGTACCT
TATGACTGACTATGCATATATAATTAATTACTTTGACTAATTAATAATGATGACATCTT
GTTTATTTATTTATTTATTTTGGTTTATTAAAATGGTTTAACTGCAGGTATTGGAACCTGG
AATTGTTGTTTCAATTGTGATAGGACTCTCAGTTGGAGCCACAAACAATACTTGCAC

CATTAAAGGTCTCATTGCTGCCCTTTGCTTCCATCAAATGTTTGAAGGAATGGGCCTAGG
 TGGTTGCATTCTTCAGGTATTACACCAAATTCATTAATAATGGTATAAGAGATCATAAAC
 TAAAGAATGTTTTTGGTGTTCCTAAAATATTTTTTATTTATTTATTTGGTGTATTATATG
 GGTGTGTATATTATGATAATTACTTCAATCATACATGTAGTAATGAATGAATGAAAACCT
 AACAGTGGTAACTGAGCAGCTAAGAGTTTTCTCATAAACTATTATCATATCACTTGTGGA
 GGCAGTGTGACAACTAAATTAATCCTCACATGTGGGATGATATGATTAATCTCATTCAA
 TTTCCCATATAAGACTTTCTCTGACCAAATTACATTAATCACTCAGTTTAATATTAATTTT
 ATAGCTTATGAATTGATAAAATTCTAACAAAAGTTTGTATCATTTAAAATTATCAAATTT
 GCAGGCGAGTACAAGTTGATGAAGAGGCTTGTAATGGTGTCTTCTTCTCTG

Corsica Ağaç Kavunu Reverse Primer DNA Sekansı

GGGGGGTGAGCAGGAGAAGACACCATTACACGCCTCTCTATCAACTTGTACTCCGCCTGC
 AATTTGATAATTTTAAATGATAACAACTTTTGTTTAGAAATTTATCAATTCATAAGCTATA
 AAATTAATATTTAACTGAGTGATTAATGTAATTTGGTCAGAGAAAGTCTTATATGGGAAA
 TTGAATGAGATTAATCCTATCCTCCCCCATGTGAGGATTAATTTAGTTTGTCCCACTGCCT
 CAACAAGTGATATGATAATAGTTTATGAGAAAACCTTAGCTGCTCAGTTACCACTGTTA
 AGTTTTCATTCACTTACTACATGTATGATTCAAGTAATTATCATAATATACCCACCCA
 TATAATAAACACCAAATAAATAAATAAAAAATATTTTAGGAACACCAAAAACATTCTTT
 AGTTTATGATCTCTTATACCATTTAATGAATTTGGTGTAATACCTGAAGAATGCAACC
 ACCTAGGCCCCATTCTTCAACATTTGATGGAAGCAAAGGGCAGCAATGAGACCTTTAAT
 GGTGCAAGTATTGTTTGTGGCTCCAACCTGAGAGTCTATCACAATTGAATGAACAACAAT
 TCCAAGTTCCAATACCTGCAGTTAAACCATTTTAATAAACCAAAAATAAATAAATAA
 ACAAGATGTCATCATTATTTTAATTAGTCAAAGTAATTAATTATATATGCATAGTCAGTC
 ATAAGGTACGTAAACGTGCCAAAGTTTTTTTCTCCAACAAAGTTGATCATTGGTACTTGAC
 CCTTAATTAATAAATACTATCATGAGGTACGGTACGGCAGAAGCATTAGTAAATAAT
 AAAGTCTTAATAAAGAAAAATCATTAACCAAGTCTGAACGTACGATAAGTCGAAGTGC
 AAATTGAAGGACTAACCCCTGGCGATAACACGATAACAAACCGTTGCTGG

***Citrus micrantha* (Microcitrus) Forward Primer DNA Sekansı**

GAAAGGTATTGTAGACTAGCACTGACTTCGTTATCGTGTTATCGCCATGGTTAGTCCTTCA
 ATTTGCACTTCGACTTATCGTACGTTACAGACTTGGTTAATGATTTTTCTTAATTTAAGACT
 TTATTATTTACTAATGCTTCTGCCGTACCGTACCTCATGATGATAGTTTAATTTAATTAAG
 GGTCAAGTACCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCACGTTACGTACCTTA
 TGACTGACTATGCATATATAATTAATTACTTTGACTAATTAATAAATGATGACATCTTAT
 TTATTTATTTATTTTGGTTTATTAATAATGGTTTAACTGCAGGTATTGGAACCTTGAATTGT
 TGTTCAATCAATTGTGATAGGACTCTCAGTTGGAGCCACAAACAATACTTGCACCATTA
 AGGTCTCATTGCTGCCCTTTGCTTTCATCAAATGTTTGAAGGAATGGGCCTAGGTGGTTGC
 ATTCTTCAGGTATTACACCAAATTCATTAATAATGGTACAAGAGATCATAAACTAAAGAA
 CGTTTTTGGTGTTCTTAAATATTTATTTTTTATTTATTTGGTGTTAGTATATGGGTGTGTA
 TATTATGATAATTACTTGAATCATACATGTAGTAATGAATGAATGAAAAATGAACAGTGC
 TAACTGAGCAGCTAAGAGTTCTCTCATAAACCATTATCATATCACTTGTGAGGCAGTGT
 GACAACTAAATTAATCCTCACATGTGGGATGATATGATCAATCTCATTCAATTTCCCAT
 ATAAGACTTTCTCTGATCAAATTACATTAATCACTCAGTTTAATATTAATTTTATAGCTTA
 TGAATTGATAAATTCTAAACAAAAGTTTGTATCATTTAAAATTATCAAATTGCAGGCGG
 AGTACAAGTTGATGAAGAGGCTTGTAATGGTGTCTTCTTCTCTGTAACAACCTCATAGT

***Citrus micrantha* (Microcitrus) Reverse Primer DNA Sekansı**

GGGGGATGTAGCATGAGGAGACACCATTACAAGCCTCTTCATCAACTTGTACTCCGCCTG
 CAATTTGATAATTTTAAATGATAACAACTTTTGTTTAGAAATTTATCAATTCATAAGCTAT
 AAAATTAATATTTAACTGAGTGATTAATGTAATTTGATCAGAGAAAGTCTTATATGGGAA
 ATTGAATGAGATTGATCATATCATCCACATGTGAGGATTAATTTAGTTTGTACACTGC
 CTCAACAAGTGATATGATAATGGTTTATGAGAGAACTCTTAGCTGCTCAGTTAGCACTGT

***Citrus reticulata* (Klemantin) Forward Primer DNA Sekansı**

***Citrus reticulata* (Klemantin) Reverse Primer DNA Sekansı**

Citrus reshi (Mandarin kleopatra) Forward Primer DNA Sekansı

89

GGTCAAGTACCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCACGTTACGTACCTTA
 TGACTGACTATGCATATATAATTAATTACTTTGACTAATTAATAATGATGACATCTTGT
 TTATTTATTTATTTATTTTGGTTTATTAAAAATGGTTAACCGCGGGGATTGGAACCTTGAAT
 TGGTTTTCCCTCCATTTGGAAAAAGAATCCTCATTGGAACCCCCAAAAAACTTTGGCCCCCT
 TAAAGGGCCCCCTTTGGCGCCCCCTTTGCTTCCCTCCAAAGGTTGAAAGAATGGGCCCAAGGGG
 TTGCCTTCCCTCCAGGATTACCCCCAATTTCTTAAAAAAGGGACCAAAAAACAAAACTAA
 AAAAAGGTTTTGGGGGTCCCAAAAAAATAATTTTTTAATTAATTGGGGGTAAATAAAAGG
 GTGGGGAATTTAAGAAAATTACCTTAATCCAACTGGAATAAAGAAAGAAAGAAAAAA
 GAACCAGGGTAAATGAACCACCAAAAAATTTCCCATAAACCCTTAATCTAACCTTGGTG
 AAGGCGTGGGACCAATAAATTAATCCTCACCTGGTGAAGAATAGATCCATCCTCATCC
 ATTTCCCCTAATAAACTTTCTCGGACCAATAACCTTAATCCATTGAGTTAATAATAATTT
 TAAAGCTTATGAATTTGATAATTCCAAACCAAGTTTGGTATTGATTGAAAATATCAAAT
 TGCAGGCGAATACAAGTGATGAAGAAGCTTGAATGGTGTTCCTCTCCTCGTAACACTCCA
 TTGAGAACCCCTTGAGAAATAAAAAA

***Citrus reshi* (Mandarin kleopatra) Reverse Primer DNA Sekansi**

GGGGGGTTAGGCAGGGGAAGAGACATTACACGCCTCTTCATCAACTTGTACTCCGCCTGC
 AATTTGATAATTTCAAATGATAACAACTTTTGTTTAGAAATTTATCAATTCATAAGCTATA
 AAATTAATATTAAGTGAAGTGAATTTGGTCAAGAGAAAGTCTTATATGGGAAA
 TTGAATGAGATTGATCATATCATCCCACATGTGAGGATTAATTTAGTTTGTACACTGCCT
 CAACAAGTGATATGATAATGGTTTATGAGAAAACCTTAGCTGCTCAGTTAGCACTGTTT
 ATTTTTCATTTCATTACTACATGTATGATTCAAGTAATTATCATAATATACACACCCA
 TATACTAAACACCAAAATAAATAAAAAAATAATATTTTAGGAACACCAAAAAACATTCTTTAG
 TTTATGATCTCTTGTAACCATTTAATGAATTTGGTGTAAATACCTGAAGAATGCAACACC
 TAGGCCCATTCCTTCAAACATTTGATGGAAGCAAAGGGCAGCAATGAGACCTTTAATGGT
 GCAAGTATTGTTTGTGGCTCCAAGTGAAGAGTCTATCACAATTGAATGAACAACAATTCC
 AAGTTCCAATACCTGCAGTTAACCTTTTATAAACCCAAAAAAATAAATAAATAAACC
 AAAGGCCTCCTTTTTTAAATTTATCAAAATAATTTATTTATTTTTCCTTATCCGTCCTAAGG
 GACCTAACCGGCCAAAATTTTTTCTCCACCAAAATTCGACCTTGGCACCTGACCTTAAT
 TAAATTAATAATTTCTCCACAGGGACCGGACCGCCAAAGCCTTAATAAAATATAAAGTCT
 TAAATTAATAAATAATCCATAACCAAGTCCGAACCTTCCAAAAGTCAAAATGGAAATTGA
 AGGAATAACCCTGGCCATAAACCCAAAACCAACCAATTG

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

GGGAGGGGTATTGGGGATAGAACATACTTCGTCATCGTGTTATCGCCATGGTTAGTCCTT
 CAATTTGCACTTCGACTTATCGTTCAAACCTTGGTTAATGAATAGTACTACACATCTCAAAT
 TTTTATCCCAAAAAATTATCCCAAATGATGTGTCATTAATTGGGTAGTTGATAATTTTTT
 ACAAGATCCAAGTAAATTAATTGTATTATCTCACCAACCACTCAATTAATGACACATCAT
 TTAGAATAATTTTTTAAGATAAAAAATTTGTGATGTGCAGCATTACTCTTTTCTTAATTT
 AAGACTTTATTATTTACTAATGCTTCTGCCGTACCGTACCTCATGATGAAAGTTTAATTTA
 ATTAAGGGTCAAGTAGCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCACGTTACGT
 ACCTTATGACTGACTATGCATATATAATTAATTACTTTGACTAATTAATAATGATGAC
 ATCTTGTTTATTTATTTATTTTGGTTTATTAAAAATGGTTAACTGCAGGTATTGGAACCT
 TGGAATTGTTGTTCAATTGTGATAGGACTCTCAGTTGGAGCCACAAACAATACCTG
 CACCATTAAAGGTCTCATTGCTGCCCTTTGCTTCCATCAAATGTTTGAAGGAATGGGCCT
 AGGTGGTTGCATTCTTCAGGTATTACACCAAAATTCATTAATAATGGTACAGGAGATCATA
 AACTAAAGAATGTTTTTGGTGTTCCTAAAAATATTATTTTTTATTTTGGTGTTTAGTATA
 TGGGGGTGTATATTATGATAATTACTTGAATCATACATGTAGAAATGAATGAATGAAAAA
 TGAACAGTGCTACCTGAACAGCTAAAAATTTTCTCATAAACCTTTATAATATCCCTTGTG
 AAGGAGGGTGAAAAAACTAAATAAATCCTCCCATGTGGGAAGA

***Citrus reticulata* (Klemantin) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

GAGAAAGTATGGCCAGAGGATACGCAGTTACAGGCCTCTTCATCAACTTGTACTCCGCCT
GCAATTTGATAATTTCAAATGATAACAACTTTTGTGTTAGAATTTATCAATTCATAAGCTA
TAAAATTAATATTAACCTGAGTGATTAATGTAATTTGGTCAGAGAAAGTCTTATATGGGA
AATTGAATTAATGAGATTGATCATATCATCCACATGTGAGGATTAATTTAGTTTGTAC
ACTGCCTCAACAAGTGATATGATAATGGTTTATGAGAAAACCTTAGCTGCTCAGTTAGC
ACTGTTCAATTTTTCATTCATTCTACTACATGTATGATTCAAGTAATTATCATAATATAC
ACACCCATATACTAAACACCAAATAAATAAAAAATAATATTTTAGGAACACCAAAAAACA
TTCTTTAGTTTATGATCTCCTGTACCATTATTAATGAATTTGGTGTAAACCTGAAGAATG
CAACCACCTAGGCCCATTCCTTCAAACATTTGATGGAAGCAAAGGGCAGCAATGAGACC
TTTAATGGTGCAGGTATTGTTTGTGGCTCCAAGTACGAGTCTATCACAATTGAATGAAC
AACAAATCCAAGTTCCAATACCTGCAGTTAACCATTTTAATAAACCAAAATAAATAAATA
AATAACAAGATGTCATCATTATTTAATTAGTCAAAGTAATTAATTATATATGCATAGT
CAGTCATAAGGTACGTAACGTGCCAAAGTTTTTTCTCCAACAAAGTTGATCATTGCTAC
TTGACCCTTAATTAATAAATACTTTTCATCATGAGGTACGGTACGGCAGAAGCATTAGTAA
ATAATAAAGTCTTAATTAATAAAAAAAGAGTAATGCTGCACATCCCAATTTTTATCTTAA
AAAATTATTCTAAATGATGTGTCATTAATTGAGGGGTTGGTGAAATAATAA

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Forward Primer DNA Sekansi**

GAGAAGTATTGTGACTACAACCTGACTTCGTTATCGTGTTATCGCCATGGTTAGTCCTTCAA
TTTGCACCTTCGACTTATCGTTCAGACTTGGTTAATGATTTTTCTTAATTTAAGACTTTATTA
TTTACTAATGCTTCTGCCGTACCGTACCTCATGATGATAGTTTAATTTAATTAAGGGTCAA
GTACCAATGATCAACTTTGTTGGAGAAAAAACTTTGGCAGGTTACGTACCTTATGACTG
ACTATGCATATATAATTAATTACTTTGACTAATTAATAAATAATGATGACATCTTGTTTATTT
ATTTATTTATTTTGGTTTATTAATAATGGTTTAACTGCAGGTATTGGAACCTTGGAAATTGTTG
TTCATTCAATTGTGATAGGACTCTCAGTTGGAGCCACAAACAATACTTGCACCATTAAG
GTCTCATTGCTGCCCTTTGCTTCCATCAAATGTTTGAAGGAATGGGCCTAGGTGGTTGCAT
TCTTCAGGTATTACACCAAATTCATTAATAATGGTACAAGAGATCATAAAATAACGAATG
TTTTTGGTGTTTCTTAAATATTTATTTTTATTTCTTTGGTGTTTAGTATATGGGTGTGTATA
TTATGATAATTACTTGAATCATACATGTAGTAATGAATGAATGAAAAATGAACAGTGCTA
ACTGAGCAGCTAAGAGTTTTCTCATAAACCATTATCATATCACTTGTTGAGGCAGTGTA
CAAATAAATTAATCCTCACATGTGGGATGATATGATCAATCTCATTCAATTTCCCATAT
AAGACTTTCTCTGACCAAATTACATTAATCACGCAGTTTAAATTAATTTTATAGCTTATG
AATTGATAAATTCTAAACAAAAGTTTGTTATCATTTAAATTAATTAATTTTATAGCTTATG
TACAAGTTGATGAAGAGGCTTGTAATGGTGTCTTCTTCTCTGTAACA

***Citrus maxima* (Sadok chandler) 1x Reverse Primer DNA Sekansi**

GGAGTGAGGATGAAGAAGAACCATTACAAGCCTCTTCATCAACTTGTACTCCGCCTGCAA
TTTGATAATTTTAAATGATAACAACTTTTGTGTTAGAATTTATCAATTCATAAGCTATAAA
ATTAATATTAACCTGCGTGATTAATGTAATTTGGTCAGAGAAAGTCTTATATGGGAAATT
GAATGAGATTGATCATATCATCCACATGTGAGGATTAATTTAGTTTGTACACTGCCTC
AACAAAGTGATATGATAATGGTTTATGAGAAAACCTTAGCTGCTCAGTTAGCACTGTTCA
TTTTTCATTCATTCTACTACATGTATGATTCAAGTAATTATCATAATATACACACCCAT
ATACTAAACACCAAAGAAATAAAAAATAATATTTTAGGAACACCAAAAAACATTCGTTAT
TTTATGATCTCTTGTTACCATTATTAATGAATTTGGTGTAAATACCTGAAGAATGCAACCACC
TAGGCCCATTCCTTCAAACATTTGATGGAAGCAAAGGGCAGCAATGAGACCTTTAATGGT
GCAAGTATTGTTTGTGGCTCCAAGTACGAGTCTTATCACAATTGAATGAACAACAATTCC
AAGTTCCAATACCTGCAGTTAAACCATTTTAATAAACCAAAATAAATAAATAAATAA
AAGATGTCATCATTATTTTAATTAGTCAAAGTAATTAATTATATATGCATAGTCAGTCATA
AGGTACGTAACGTGCCAAAGTTTTTTCTCCAACAAAGTTGATCATTGGTACTTGACCCTT
AATTAATAAATACTATCATCATGAGGTACGGTACGGCAGAAGCATTAGTAAATAAATAA
GTCTTAATTAAGAAAAATCATTAACCAAGTCTGAACGATAAGTCGAAGTGCAAATTGA
AGGACTAACCATTGGCGATAACACGATAACCAAGCAGTTGCTGGTTAA

***Citrus maxima* (Sadok pink) Forward Primer DNA Sekansı**

GAGGAGGATCTTGGAGATAGTAAATATATCGATTACGTGTTGTCGCCCTGGTTGGTCCTT
CGTTTTAGCCTCCGACTTATCGCACCGACAGGGTTGGTGAATGCTCTTACTTAAACAATT
ACTTATTTATTAATAAGTGCGCCGGCCGGCCCTCATGCAGATAGATTTTTTAATTTAATG
GAAGGGCACCTACGAATGATCTTCTTGCTTGAAAAAAATAGCTCCGCAACGTTCCATAT
GAAAGGCGAGCATAGGGGAAAAACATTATTTACCTCGAAAAAAAAGAAAGAGAGCAC
GGCTGGTTAATTAATTTTTTTATTTTGATAAAAAAAATAGACTTCCGAAAGGGAAAGAAG
ATGGGATGGGTATTCCAGTGGAATGGGAATCGACAGGTGGGGGACCCCAAAAAAAGG
ATACGTAAAGGATCGCTGAGCGGGCCTCCCGCTTCTCAACACGATGAAGAAAGGGCCG
GGGGAGGTGGTGTGCTTTCCGGACTACCCGCCATCATTTCTTGATGGACGAGAAGAACCA
ACAAAAACAAGAGGGTGGGGGGGGGGGACAAACAAAAATATTATTTAATTCCTTGGAGAC
ATCCAGGGGGGGCGGGTACAAGATGAAAGACACTGCGATCCATGAGTGAATGAAGGAA
GAAAAAATAAAAAAACGCCCTAGACCCACCAAAAATACCTATAAAAAACACAAA
TACATTCACAGGGGGGGGGGGGGGAGAAAAAAATCACACCCCGGGGGGGGGGGG
AAGAAACCATCCCCATTCCCCACCCAAAAAATACTTTCCCCAGAAAAAATAAATCCACC
CCACTAAAATTAATAATTTTTTTATATCAAAAGAAAAGACAAAAAATAAATTTTCTT
ATTTTTTAATTTTTTTTCATGGCGGGGAAAAATAAATTAAAAAACAAGGATGGAGGGG
TTTTT

***Citrus maxima* (Sadok pink) Reverse Primer DNA Sekansı**

AGGGGGGTAGGCATGGGGAGATGAGGTATGTAGCCCTCTTCATCAATTTGTACTCCGCC
TGCACTTTAATAAATTCCAAATGATAACAACCTTTTGTAGAAATTTATCAATTCATAAGCT
ATAAAATTAATATTAAACTGAGTGATTAATGCACTTTGGTCAGAAAAAGTCTTATATGGG
AAATTGAATGAAATTGATCATATCATCCACATGTGCGGATTAATTTACTTTGTCCCACTG
CCTCAACAAGTGATATGATAATGGTTTATGAGAAAACTCTTAGCTGCTCAGTTACGCACT
GTTCATTTTTCATTCAATTCCTTACTACATGTAGGATCCCCGTAATTATCATAATATACACA
CCCATATACTAAACACCAAATAAATAAAAAATAATTTTTAGGAACACCAAACCCACTCT
TTAGTTTATGATCTCCTGTACCATAATTAATGAATTTGGTGTACTACCGGAAGAATGCAC
CCACCTAAGCCCATTCCTTCAAACATTTGATGGAAGAAAAGGGACCCAAAGAGACCTTT
AATGATGCAAGCATTGTTTGGGGCTCCAATTATAGCCCTACCACAATTGAATGAACAAC
AATCCAAGTTCCTACCTGCAGATAACCATTTTTATAAACCCAACAAAATAAAAAAAT
AAACAACATGGCGCCACTTTTTTAATTTGCCCAAATAATTTATTTACATCTCTATATCACC
TACAACGGACCAAAACTGGCTAAATTTTTTTCTCCATAAAAGGTGACCTTTGGCCCTCG
CCCCCATCAACTTAACTAGCATCAAGAGGTACGGGACCGCGAAATACTTAATAAAT
AAAAAATTTTAATTTTAAAAAAACCATTAACCCAGCCAAAAACAACAACATCCGAA
AATAAATGACTAGCTTACCGTGAGACTAACAACCAAACAGTTCTTTGCTGAAAA