

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
2014-YL-

NAGAMİ KAMKATI AŞI KALEMLERİNİN KOBALT-60
İŞİNLAMASINA DAYANIMININ BELİRLENMESİ VE
FARKLI GENOTİPLERİN RAPD BELİRTEÇLERİ İLE
TANIMLANMASI

Cennet KARA



Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Cennet KARA tarafından hazırlanan ‘Nagami Kamkatı Aşı Kalemlerinin Kobalt-60 Işınlamasına Dayanımının Belirlenmesi ve Farklı Genotiplerin RAPD Belirteçleri ile Tanımlanması’ başlıklı tez, 05.12.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. Zeynel DALIKILIÇ	ADÜ	
Üye	: Doç. Dr. Zöhre POLAT	ADÜ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇELİK	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun.....Sayılı kararıyla..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallarının gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

05/12/2014

Cennet KARA

ÖZET

NAGAMI KAMKATI AŞI KALEMLERİNİN KOBALT-60 İŞINLAMASINA DAYANIMININ BELİRLENMESİ VE FARKLI GENOTİPLERİN RAPD BELİRTEÇLERİ İLE TANIMLANMASI

Cennet KARA

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2014, 47 sayfa

Çalışmada Nagami kamkatı aşısı kalemi (*Fortunella margarita* L.) ve üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) anaç olarak kullanılmıştır. Çöğürler Aralık 2012'den itibaren 4 farklı harç ortamında (kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+solucan gübresi) büyütülmüştür. Temmuz 2013'te anaçlarda en fazla boy artışı kontrol grubunda olurken, çap kalınlığı mikorizalı grupta, yan dal sayısı ise solucan gübresi grubunda daha fazla bulunmuştur. Temmuz 2013'te Nagami kamkatının aşısı kalemleri 0, 15, 30, 45, 60 Gy ⁶⁰Co gama ışınına tabi tutulmuşlardır. Işınlanan gözler naylon yüksek tünelde saksı içerisinde yetiştirilen iki yaşındaki üç yapraklı portakal anaçları üzerine T göz aşısı ile aşılanılmışlardır. 248 bitkiden 48 adedinin aşısı tutmuştur. Böylece M₁V₁ bitkileri elde edilmiştir. Ancak meyve tutumuna kadar geçen zamanda hayatta kalan bitki sayısı 30'a düşmüştür. Yüksek tünel şartlarında büyütülen bitkilerde aşından 21 gün sonra aşısı tutma oranı %18.8 60 Gy-%43.8 15 Gy arasındadır. Aşından yaklaşık 16 ay sonra sürgün boyu 20.98 cm 45 Gy-39.02 cm 0 Gy, sürgün çapı 4.78 cm 30 ve 45 Gy-5.72 cm 60 Gy, yaprak sayısı 26 adet 30 ve 45 Gy-47 adet 0 Gy, meyve sayısı 2.40 adet 60 Gy-5.50 adet 45 Gy, meyve çapı 16.20 mm 60 Gy-18.99 mm 0 Gy arasında değişmiştir. Klorofil miktarı yaprak üst ve alt yüzeylerinde sırasıyla 0.6254 30 Gy-0.6735 0 Gy ve 0.4003 30 Gy-0.4224 0 Gy arasında değişmiştir. 12 nolu bireyin (S-26-45) diğer bireylerden farklı olduğu RAPD primerleri ile belirlenmiştir. Farklılığı ispat eden PM2, PM3, PM4, PM5, PM7, PM8 primerleri ile 4 polimorfik, toplam 14 bant elde edilmiştir. Nagami kamkatı aşısı kalemlerinin 60 Gy ⁶⁰Co gama ışınına dayanabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle daha yüksek dozların denenmesi tavsiye edilebilir.

Anahtar sözcükler: *Fortunella margarita*, *Poncirus trifoliata*, ⁶⁰Co ışınlaması, fidan özellikleri, RAPD belirteçleri, PCR

ABSTRACT

DETERMINATION OF TOLERANCE OF NAGAMI KUMQUAT BUDWOODS TO COBALT-60 IRRADIATION AND IDENTIFICATION OF DIFFERENT GENOTYPES WITH RAPD MARKERS

Cennet KARA

M.Sc. Thesis, Department of Horticulture
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2014, 47 pages

Nagami kamquat (*Fortunella margarita* L.) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) were used as scion and rootstock, respectively, in this study. Seedlings have been grown in four different groups of potting mixtures such as control, mycorrhiza, vermicompost, and mycorrhiza+vermicompost since December 2012. While the highest increase in seedling length was in control group, that of in seedling diameter was in mycorrhiza group and that of in side-branches was in vermicompost in July 2013. Nagami kamquat scionwoods were treated with 0, 15, 30, 45, 60 Gy ⁶⁰Co gamma irradiation in July 2013. Irradiated budwoods were T-budded on two-year-old trifoliolate orange rootstocks grown in high plastic tunnel. Total of 248 budded plants, only 48 were bud-taken. Thus, M₁V₁ plants were obtained. However, only 30 plants survived until fruit set time. Bud take ratio in plants grown in high plastic tunnel was between 18.8 60% Gy and 43.8 15% Gy 21 days after budding. The morphological measurements were ranged as follows: shoot length 20.98 cm 45 Gy-39.02 cm 0 Gy, diameter 4.78 cm 30 and 45 Gy-5.72 cm 60 Gy, leaf number 26 no. 30 and 45 Gy-47 no. 0 Gy, fruit number 2.40 no. 60 Gy-5.50 no. 45 Gy and diameter 16.20 mm 60 Gy-18.99 mm 0 Gy in approximately 16 months after budding. Chlorophyll contents were changed in the upper and lower side of the leaf as 0.6254 30 Gy-0.6735 0 Gy and 0.4003 30 Gy-0.4224 0 Gy, respectively. Plant no: 12 (S-26-45) was determined as different from other plants using RAPD primers. PM2, PM3, PM4, PM5, PM7, and PM8 primers gave four polymorphic and 14 total bands proving the difference. It was observed that Nagami kamquat scionwood resist to 60 Gy ⁶⁰Co gamma irradiation. Therefore, it is advisable to apply higher doses of ⁶⁰Co.

Key words: *Fortunella margarita*, *Poncirus trifoliata*, ⁶⁰Co irradiation, nursery characteristics, RAPD markers, PCR

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca gerek arazi gerekse de laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Solucan gübresinin sağlanmasında Doç. Dr. Ayhan YILDIZ'a, PCR çalışmalarına imkan sağlayan ve yardımcı olan ADÜ-TARBİYÖMER Müdürü Prof. Dr. İbrahim CEMAL'e ve personeline teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında bana olan katkılarından dolayı değerli Bahçe Bitkileri Bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Nagami kamkatı aşısı kalemlerinin gama ışınlanmasında yardımcı olan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim dal'ndan sayın Prof. Dr. Durmuş ETİZ ve Fizik Mühendisi Sayın Kerem DURUER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin arazi çalışmaları sırasında hiçbir desteğini ve yardımını esirgemeyen Emre Fidancılık sahibi Sayın Yusuf EMRE ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Yaşamım ve tez çalışmam sırasında maddi-manevi olarak gösterdikleri fedakârlıklardan dolayı annem Ümmü KARA ve babam Muzaffer KARA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmasını ZRF-13057 numaralı proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİN	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Turunçgillerde Mutasyon Islahı ile İlgili Çalışmalar.....	5
2.1.1. Altıntop (<i>Citrus paradisi</i> Macf.).....	5
2.1.2. Limon (<i>Citrus limon</i> L.).....	7
2.1.3. Mandarin (<i>Citrus reticulata</i> Blanco).....	8
2.1.4. Portakal (<i>Citrus sinensis</i> Osbeck.).....	9
2.2. Turunçgillerde Mikoriza ile İlgili Çalışmalar.....	9
2.3. Solucan Gübresi (Vermikompost) İle İlgili Çalışmalar	11
2.4. Bazı Turunçgil Türlerinde RAPD Belirteçlerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Üç yapraklı portakal (<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.) anacı.....	15
3.1.2. Nağami kamkatı (<i>Fortunella margarita</i> L.).....	16
3.1.3. Kullanılan diğer maddeler.....	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Üç yapraklı portakal anacının hazırlanması	18
3.2.2. Saksı harcının hazırlanması.....	19
3.2.3. Aşı gözlerinin ⁶⁰ Co ışınlamasına tabi tutulması	19
3.2.4. Aşılama.....	21
3.2.5. Fidanlarda yapılan ölçümler.....	23

3.2.6. RAPD analizi yapılması.....	24
3.2.6.1. DNA çıkartılması (Ekstraksiyon).....	24
3.2.6.2. PCR.....	26
3.2.6.3. Gel elektroforezi.....	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. Üç Yapraklı Portakal Anacında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	29
4.2. Kamkatta Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....	31
4.2.1. Aşı sürgünlerine ait ölçümler	31
4.2.2. Yaprak klorofil miktarı	32
4.2.3. Meyve ölçümleri	33
4.3. RAPD Analizi.....	34
5. TARTIŞMA SONUÇ	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

SİMGELER DİZİNİ

ADÜ BAP	: Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
bp	: Base Pair (baz çifti)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ddH ₂ O	: İki kez destile Su
dNTP	: Deoksiribonükleosid Trifosfat
gDNA	: Genomik DNA
Gy	: Gray
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PM	: Primer
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	: Single-Strand Conformation Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris borat etilendiamintetra asetik asit
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Çalışmada kamkat aşısı kalemlerinin aşılmasında kullanılan üç yapraklı portakal anacı.	16
Şekil 3.2.	Aşısı kalemi olarak kullanılan Nagami kamkatı.	17
Şekil 3.3.	Üç yapraklı portakal anacının (a) kök budaması, (b) ve (c) tepe budaması, (d) kök yıkaması.	18
Şekil 3.4.	(a) Köklerin mikorizaya bandırılması, (b) anaçların 4 gruba ayrılması.	19
Şekil 3.5.	(a) Üç yapraklı portakal boy, (b) çap ölçümü, (c) (d) Nagami kamkatından aşısı kalemi alınması.	20
Şekil 3.6.	(a) ‘Theratron Elite 80’ isimli ⁶⁰ Co gama cihazı, (b) kamkat aşısı kalemlerinin şeffaf plastik şişede sabitlenmesi, (c) ⁶⁰ Co gama ışını uygulaması, (d) izleme odası.	21
Şekil 3.7.	(a) T şeklinde kabuğun kaldırılması, (b) ışınlanmış Nagami kamkatı kaleminden alınan gözün üç yapraklı portakal anacına yerleştirilmesi, (c) aşısı yapılan yerin aşısı bandıyla sarılması, (d) üzerine etiketinin konulması.	22
Şekil 3.8.	4 gruba ayırarak etiketlerinin takılması.	23
Şekil 3.9.	(a) Tüplerin içerisine sıvı azotun dökülmesi, (b) tüplerin santrifüj edilmesi, (c) vorteks işleminin yapılması.	26
Şekil 3.10.	PCR cihazındaki RAPD programı ayarlanması.	27
Şekil 3.11.	(a) PCR cihazından çıkan jelle yüklenecek ürünler, (b) DNA yüklemeye hazır katılan jel, (c) tüplerden 10 µl karışımın PCR ürününün pipetle alınması, (d) alınan ürünlerin jelin kuyucuklarına yüklenmesi, (e) elektroforez cihazının ayarlanması, (f) jelin UV ışık altında gözlenmesi.	28
Şekil 4.1.	PM1 ve PM3 DNA bant profili.	36
Şekil 4.2.	PM2 ve PM4 DNA bant profilleri.	37
Şekil 4.3.	PM5 primeri DNA profili.	38
Şekil 4.4.	PM7 ve PM8 DNA Profili.	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve baz dizilimi.	18
Çizelge 4.1.	Gövde çap ölçüm değerleri.....	29
Çizelge 4.2.	02.07.2013 tarihinde aşılamaadan önceki boy uzunluğu, gövde çapı, yan dal sayısı verileri.....	30
Çizelge 4.3.	12.12.2012 tarihinde kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+ solucan gübresi uygulanan, 05.07.2013 tarihinde T göz aşısı ile aşılanaan Nagami kamkatının 26.07.2013 tarihindeki aşısı canlılığı.....	31
Çizelge 4.4.	Aşısı sürgünlerine ait boy, gövde çapı, yaprak sayısı değerleri	32
Çizelge 4.5.	Yaprakların klorofil miktarları 17.12.2013.	33
Çizelge 4.6.	Meyve sayısı ve meyve çapı değerleri 02.11.2014.....	33
Çizelge 4.7.	PCR amplifikasyonları sonucu elde edilen bant sayıları, polimorfik bant sayıları yaklaşık bant büyüklükleri.....	35

1. GİRİŞ

Turunçgiller, *Citrus* spp., $2n=18$, Rutaceae familyası içerisinde herdem yeşil bitki türleridir. Turunçgillerin birinci derecede anavatanı Güneydoğu Asya'dır. İkinci derecede anavatanı ise Kuzeydoğu Hindistan, Kuzey Burma, Çin'in Yunnan eyaletidir (Davies ve Albrigo, 2005).

Turunçgiller toplam 123.755.751 ton üretim ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur. Dünyada en büyük üretici ülkeler Çin ve Brezilya olup bunları sırasıyla Hindistan, ABD, Meksika ve İspanya izlemektedir (FAO, 2012). Dünya çapında ekonomik öneme sahip beş turunçgil grubu vardır. Bunlar; portakallar (*C.sinensis*), mandarinler (*C.reticulata*), altıntoplar (*C.paradisi*), limonlar (*C.limon*) ve laymlar (*C.aurantifolia*)'dır. Kamkatlar (*Fortunella* spp.) da sınırlı miktarda yetiştirilir (Davies ve Albrigo, 2005). Dünya üretiminin % 56'sı portakal, %17'si mandarin, %12'si limon %6'sı altıntop ve %9'u turuncun da bulunduğu diğer turunçgillerdir (FAO, 2012). Ülkemizin de içerisinde yer aldığı Akdeniz havzasında dünya turunçgil üretiminin %22'si gerçekleştirilmektedir. Ülkemizdeki ekolojik şartlar, Akdeniz ve Ege bölgelerinde turunçgil yetiştiriciliğinin son derece başarılı şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır (Seday ve Eti, 2011).

Kamkat, "turunçgiller ailesinin küçük mücevheri" olarak isimlendirilmektedir (Hocagil, 2012). Morfolojisindeki farklılıklardan dolayı bazı sistematikçiler tarafından *Citrus* cinsi yerine *Fortunella* cinsi içerisine yerleştirilmektedir (Davies ve Albrigo, 2005). *Fortunella* adını, 1812-1880 yılları arasında yaşamış İskoçyalı bahçecilik uzmanı Robert Fortune'un soyadından almaktadır. Robert Fortune, Çin'de yaşadığı yıllarda sürekli ilginç bitkileri toplamış ve İngiltere'ye dönüşünde de bu koleksiyonunu beraberinde götürmüştür. Batı dünyası, bu birikimin içinde yer alan kamkatla, Fortune sayesinde tanışmış ve onu onurlandırmak amacıyla bu bitkilerin cins adına 'Fortunella' denmiştir. "Kumquat ya da komquot" adlarıyla anılan meyveye "altın portakal" da denilmektedir (Hocagil, 2012).

XIX. yüzyılda Avrupa ve Kuzey Amerika'ya giren kamkat, seralarda ve dışarıda yetiştirilmiştir. Hatta günümüzde süs bitkisi olarak balkonlarda, bahçelerde bitkisel tasarımlarda da kullanılmaktadır. Dünyada Çin, Japonya, ABD'de yaygın olarak; daha küçük ölçekte Porto Riko, Guatemala, Kolombiya, Brezilya, Güney Hindistan'da da sadece deniz seviyesinden belirli yükseklikteki yerlerde yetiştirilmektedir. Avustralya ve Güney Afrika'da sınırlı olarak yetiştirilmektedir.

Doğu Asya ve Çin’de doğal olarak yayılış gösterip çalı biçimindedir (Hocagil, 2012). Bütün meyvenin genellikle kabuğu da dahil yenmesi kendisine ayrı bir özellik kazandırır. Ağaç, dikine büyüme gösteren habitüsüyle orta derecede kuvvetli büyür. Yapraklar, mızraktan elipse kadar değişen yaprak ayasıyla küçüktür ve oldukça indirgenmiş yaprak ayasına sahiptir. Yaprak ayasının alt yüzeyi, karakteristik gümüşü renktedir. Kamkatlar, diğer ticari turunçgillerden çok daha geç çiçeklenmeye eğilim gösterir. Tam olarak kışa alıştığı zaman, yapraklar ve odun dokusu dona oldukça dayanıklıdır (Davies ve Albrigo, 2005).

Genel olarak turunçgillerde varyasyon sınırlıdır. Turunçgillerde varyasyonu sınırlayan temel sebepler apomiksis ve poliembriyoni olaylarına olan yüksek eğilimdir. Ticari açıdan önemli dört turunçgil türü olan portakal, mandarin, limon ve altıntoplar başlangıçta doğada şans çöğürü olarak ve sonrasında ise doğal melezlemeler sonucu meydana gelmiştir. Tür içerisindeki varyasyonlar ise çoğunlukla doğal mutasyonlar sonucu oluşmuştur (Gökçe, 2011). Turunçgiller doğal melezlemeye ve mutasyona eğilimli bitkiler olmasından dolayı yeni çeşitler ortaya çıkarmaya elverişlidir (Davies ve Albrigo, 2005). Geleneksel ıslah yöntemleri ile çok sayıda yeni çeşit üreticilerin hizmetine sunulmuştur. Ancak bu yöntemlerle çeşit geliştirmede uzun zamana, fazla emeğe ve kaynağa gerek duyulmaktadır. Bu nedenle bitki ıslahçıları daha kolay ve daha hızlı varyasyon sağlayacak yeni yaklaşımlar üzerinde durmaktadırlar. Bunlardan biri de mutasyon ıslahıdır (Başer vd., 2007).

Mutasyon oluşturma ve mutant tiplerden yararlanma düşüncesi ilk kez 1901 yılında Hugo de Vries isimli araştırmacının “Mutasyon Teorisi” adlı eserinde ortaya atılmıştır. Araştırmacı, bu eserde mutasyon yoluyla bitki ve hayvanlarda yeni tiplerin ortaya çıkabileceğini savunmuş ve 1904 yılında ABD’de verdiği bir konferansta röntgen ışınlarının mutasyon yaratmak amacıyla kullanılmasını önermiştir (Değirmenci, 2006). Mutagen (mutasyona neden olan madde) kullanılarak seleksiyonla kombine edilen bu ıslah tipine “mutasyon ıslahı” adı verilmektedir. Mutasyon ıslahında temel nokta iyi özelliklere sahip çeşitlerin 1-2 olumsuz özelliğinin, olumlu özellikler korunarak iyileştirilmesidir. Bu noktada önem kazanan ise yaratılacak mutasyon frekansıdır. Yapay mutasyonla bu frekans doğal yolla görülme oranına göre önemsenecek kadar arttırılabilmektedir. Mutasyon ıslahı, özellikle monogenik (tek gen ile kontrol edilen özellik kalıtımı) olarak yönetilen ve basit kalıtım gösteren karakterlerin geliştirilmesinde etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Meyvecilikte mutasyon ıslahından mevcut varyasyonu

genişletmek amacıyla birçok türde yararlanılmaktadır. Özellikle vejetatif olarak üretilen meyve türlerinde, *in vitro* mutasyon uygulamalarında bu yöntem tercih edilirken, tohum uygulamalarıyla anaç ıslahında, melezleme çalışmaları için birey elde edilmesinde ve çiçek tozu (pollen) ışınlanmasıyla da melezleme ıslahında kullanılmaktadır. Mutasyonlar çoğunlukla resesif ve öldürücü olmaktadır. Mutagenler (mutasyona neden olan etmenler) popülasyonlara uygulandığında büyük çapta varyasyon ortaya çıkarmaktadır. Bu varyasyondan ıslah amaçlarına uygun, değişimi istenen özellikler yönünde sonuçlar veren bitkiler seçilebilmektedir (Çiftçi ve Şenay, 2005). Günümüzde mutasyon ıslahı çalışmalarında genetik çeşitlilik (variability) açısından çok sayıda kimyasal ve fiziksel mutagenler kullanılabilir. Mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılan bazı kimyasal mutagenler; sülfat sülfonatlar, etilen aminler ve nitroz bileşikleridir (Değirmenci, 2006).

Fiziksel mutagenler yavaş ve hızlı iyonize olmalarına göre ikiye ayrılır. Mutasyon meydana getirmek için UV ışınları ile birlikte iyonize radyasyon olarak da adlandırılan X ve gama ışınları, alfa ve beta parçacıkları, proton ve nötronlar da kullanılmaktadır. Bunların ortak özelliği enerjilerini vermeleri olup bu olay da “iyonize radyasyon” denmektedir. Yavaş iyonize olanlar ultraviyole ışık kaynağından elde edilen ultraviyole radyasyon, X ışın kaynağından elde edilen X ışınları, Cobalt-60 (^{60}Co) veya Cesium-137 (^{137}Cs) gibi radyoaktif izotoplardan elde edilen gama ışınlarıdır. Bu mutagenler, bitki dokusuna kolay girebilirler (penetre). Doğrudan DNA üzerinde etkili olmalarıyla birlikte gen (nokta) mutasyonlarını ortaya çıkarmaktadırlar. Gama ışını uygulamada kolay yapılabilmesi, geçirgenliğinin yüksek olması sonucu hedef hücrelere ulaşabilmesi ve toksik herhangi bir etki ve zararının olmaması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Değirmenci, 2006). Hızlı iyonize olanlar ise temel ya da yavaş nötronlar ve beta parçacıklarıdır (^{32}P , ^{35}S). Bu mutagenler de bitki bünyesinde belirgin derecede değişiklik yaparlar ki, bunlar kromozom kırılmalarıdır. Ancak bitkilerin hayatta kalma şansı büyük ölçüde azalmaktadır (Çoban, 2003).

Fiziksel mutagenlerden en çok gama ışını tercih edilmektedir. Çünkü gama ışınlarının uygulamada kolay yapılabilmesi ve geçirgenliği yüksek olması sonucu hedef hücrelere kolay ulaşabilmekte, toksik bir etki bırakmamaktadır (Değirmenci, 2006). Gama ışınları kullanılarak meyve türlerinden elma (*Malus domestica*), fındık (*Corylus avellana*), ceviz (*Juglans regia*), vişne (*Prunus cerasus*), badem (*Amygdalus communis*), zeytin (*Olea europaea*), muzda (*Musa*

cavendishii) ve turunçgillerde (*Citrus* spp.) olumlu sonuçlar alınmıştır (Kunter vd., 2009). Bugün dünyada yetiştiriciliği yapılan önemli turunçgil tür ve çeşitlerinin büyük bir bölümü doğal melezlemeler ve mutasyonlar sonucu ortaya çıkmıştır. Turunçgillerde yaygın olarak rastlanan bu durum, ülkemize has yerli çeşitlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Gökçe, 2011).

Çok geniş bir familyaya sahip olan turunçgiller, tür ve çeşit bazında birbirleri ile genetik olarak çok yakın akrabalık ilişkilerine sahiptir. Turunçgillerde tür ve çeşitlerin kısa sürede tanımlanması, turunçgil ıslahçısına, üreticisine ve yetiştiricisine merak ettiği konularda bilgi vermesi yönünden oldukça önem arz etmektedir. Turunçgil tür ve çeşitlerini DNA düzeyinde belirlemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Tür ve çeşit ayrımlarında, önceleri izoenzim analizleri kullanılmış, ancak bu yöntem mutasyon ile oluşan farklılıkları belirlemede yetersiz kalmıştır (Göçmen vd., 2003). Farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkan moleküler belirteçler, melezlemeye (hibridizasyon) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı olmak üzere ikiye ayrılır. Melezlemeye dayalı olan moleküler belirteç RFLP (Kesilen Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)'dir. PCR'a dayalı moleküler belirteçler arasında RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), SCAR (Baz Dizisi Belirlenen Çoğaltılmış Bölgeler), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), SSR (Basit Dizi Tekrarı), ISSR (Kısa Dizi Tekrarları Arası) ve SRAP (Baz Dizilimine Bağlı Çoğaltılmış Polimorfizm) bulunmaktadır (Gulsen vd., 2007; Turunç, 2010). RFLP'de DNA'ların enzim ile kesilme gerekliliği, radyoaktif esaslı olması, uygulamadaki zorluğu ve pahalılığı alternatif bir metot olan PCR esaslı RAPD moleküler tekniğinin geliştirilmesine neden olmuştur. RAPD turunçgillerde tür ve çeşit ayrımlarında RFLP'ye göre daha kısa sürede etkili sonuçlar verebilmektedir (Göçmen vd., 2003).

Bu çalışmada, Nagami kamkatı aşısı kalemlerinin hayatta kalabileceği en uygun kobalt-60 (^{60}Co) gama ışını LD_{50} dozunun belirlenmesi ve elde edilen mutant bireylerdeki morfolojik değişiklerin tespit edilerek yaşayan bireylerin moleküler düzeyde RAPD belirteçleri ile tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Turunçgillerde Mutasyon Islahı ile İlgili Çalışmalar

‘Nagami’ (*Fortunella margarita*) kamkatında konu ile ilgili çalışma olmadığından altıntop, limon, mandarin ve portakallarda yapılan çalışmaların önemli olanları özetlenmiştir.

2.1.1. Altıntop (*Citrus paradisi* Macf.)

En önemli pembe ve kırmızı altıntop çeşitleri için iki gelişme noktası vardır. İlki tomurcuklarda LD₅₀ dozu 9 krad olarak bulunmuştur. Sonuçta ticari olarak tohumuz klonlara uygulanan ışın, tohuma uygulanandan daha az zaman almıştır Walters’tan (beyaz etli bir çeşit) köken alan ‘Foster’ ‘Hudson’ ve ‘Star Ruby’ grubu ve ikincisi ‘Thompson’dan (‘Pink Marsh’) köken alan ‘Redblush’, ‘Ruby Red’, ‘Ray Ruby’, ‘Rio Red’, ‘Flame’ (‘Henderson’) ve ‘Burgundy’ grubudur. ‘Foster’, pembe etli mutasyonların ilki, 1907’de Manatee, Florida yakınlarında Atwood bahçesinde ‘Walters’ın bir dal mutasyonu olarak ortaya çıkmıştır. Pulp, açık pembedir. ‘Foster’ın meyve suyu neredeyse renksizdir. Çekirdekli olduğu için ‘Foster’ geniş olarak dikilmemektedir. Ancak ‘Foster’ diğer daha önemli kırmızı etli çeşitlerin kaynağıdır (Davies ve Albrigo, 2005). Olgun ‘Foster’ tomurcuklarına 30, 50, 70, 90 ve 110 Gy dozlarında gama ışını uygulanmıştır. Serada aşılana tomurcuklarda LD₅₀ dozu, 50 Gy olarak bulunurken fidanlıkta aşılana ‘Hudson’ 1930’larda San Benito, Teksas’ta ‘Foster’ın bir tomurcuk mutasyonu olarak meydana gelmiştir (Hearn, 1986). ‘Hudson’, ‘Foster’dan oldukça koyu kırmızı et ve kabuk rengine sahiptir, fakat o da çekirdekli (Davies ve Albrigo, 2005). 1969’da Teksas A & M Üniversitesi’nden R.A. Hensz ‘Hudson’ tohumlarını 10, 15, 20, 25 Gy dozunda radyasyona maruz bırakmış, tohumları ekmiş ve hemen ardından çöğürleri incelemiştir. 1970’te ‘Star Ruby’ diye kendisi isimlendirdiği çok koyu kırmızı etli bir çöğürü seçmiş ve dağıtmıştır (Hensz, 1977). ‘Star Ruby’, günümüzde mevcut olan altıntopların içerisindeki en koyu kırmızı kabuk, et ve meyve suyu rengine sahip bulunanıdır. Kırmızı renklenme, genç dalların kabuklarında bile fark edilebilmektedir. ‘Star Ruby’nin yaprak rengi, bazı bahçelerde hemen hemen beyaza yakın klorotik hal alan rengi ile diğer kırmızı etlilerden farklılık göstermektedir. ‘Star Ruby’ yaprakları, bazı herbisit uygulamalarına tepki olarak da klorotikleşir. Ağaçlar fitoftora gövde çürüklüğüne çok hassastır. Ancak, bu problemlere rağmen verim, meyve kalitesi ve ekonomik

getirisi çok iyidir. Davies ve Albrigo (2005). ‘Marsh’tan kaynaklanan diğer bir kırmızı etli altıntop grubu, 1913’te Oneco, Florida (ABD)’da W. B. Thompson’un bahçesindeki bir dal mutasyonu olan ‘Thompson’ (‘Pink Marsh’) ile başlar. ‘Thompson, en uygun koşullarda bile açık pembe et ve kabuk rengine sahiptir. Ancak çekirdeksiz olması sebebiyle ‘Foster’dan daha avantajlıdır. ‘Thompson’un ağaç özellikleri, ‘Marsh’inkilerle benzerdir. Çoğu kırmızı etli çeşitler, ‘Thompson’ın mutasyonudurlar. ‘Ruby Red’ (‘Ruby’), 1929’da McAllen, Teksas yakınlarında A. E. Henninger tarafından ‘Thompson’un bir dal mutasyonu olarak keşfedilmiştir. 1931’de ‘Redblush’ (‘Webb Redblush’) olarak çoğaltılan, Donna, Teksas’ta J. B. Webb tarafından seçilen ‘Thompson’un diğer bir dal mutasyonudur. Meyve ve ağaç özellikleri bakımından bu çeşitler hemen hemen aynıdır. Her birinde de, meyveler ‘Pink Marsh’tan daha koyu kırmızıdır ve buna ek olarak başka belirgin kırmızı kabuk renklenmesi vardır (Davies ve Albrigo 2005).

Teksas’ta bulunan koyu kırmızı renkli üç çeşidin kaynağı ‘Ruby Red’ dir. ‘Henderson’, ‘Ray Ruby’ ve ‘Rio Red’, ‘Henderson’, 1973’te Edinburg, Teksas civarında Henderson bahçesinde ‘Everhard’ altıntopunun bir dal mutasyonu olarak ortaya çıkmıştır. Kırmızı et ve kabuk rengi ‘Ruby Red’den daha koyudur. ‘Ruby Red’in mutasyonu ‘Ray Ruby’dir. ‘Henderson’unkine yakın kabuk rengi vardır. Ancak ‘Henderson’dan daha koyu kırmızı et rengine sahiptir. ‘Rio Red’, 1953’te dikilen ‘Ruby Red’in bir mutasyonu sonucu ortaya çıkmıştır. 1959’da tercih edilen verim ve meyve özellikleri nedeniyle seçilmiştir. Bu seleksiyonun aşısı kalemleri radyasyona tabi tutulmuş ve turuncu anacı üzerine aşılmıştır. 1976’da koyu kırmızı renklenmesiyle bir mutasyon seçilmiş ve ‘Rio Red’ ismiyle 1984’te tescil edilmiştir. Kabuk rengi, ‘Ray Ruby’ye benzemekte, ancak et rengi daha kırmızıdır (Davies ve Albrigo 2005).

Davies ve Albrigo (2005), dördüncü diğer bir kırmızı çeşit ‘Flame’, USDA tarafından, 1987’de Florida’da çoğaltım amacıyla dağıtılmıştır. ‘Flame’, 1973’te dikilen ‘Henderson’un tohumlarından meydana gelmiştir. Kabuk rengi ‘Ray Ruby’ninkine benzer şekildedir. Florida’nın bazı bölgelerinde ağaçlar, ‘Star Ruby’ninkine benzer yaprak klorotik belirtileri göstermektedirler. Fakat içsel renklenme, Florida koşullarında yetiştirilen ‘Rio Red’inkinden daha karardır.

‘Ray Ruby’, ‘Rio Red’, ‘Flame’ ve ‘Star Ruby’nin, ‘Ruby Red’de bulunmayan en belirgin özelliği, derim mevsiminin geç dönemlerine kadar koyu içsel kırmızı

rengini muhafaza etmeleridir. Bu durum, pazarlama periyodunu uzatmıştır. Oldukça sıcak, düşük rakımlı tropikal bölgelerde dahi oluşmasına rağmen renklenmedeki varyasyonlar iklime bağlı olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir (Davies ve Albrigo 2005).

2.1.2. Limon (*Citrus limon* L.)

Spiegel-Roy vd. (2007)'nin araştırmasında, 'Villafranca' ve 'Euraka' limonlarından çekirdeksiz limonlar elde etmek için 300 tomurcuğa ⁶⁰Co gama ışını uygulamışlardır. Daha sonra ışınlanan tomurcuklar Troyer anacı üzerine aşılanmıştır. 'Villafranca' limonundan 'Ayalet' limonu elde edilmiş ve 'Villafranca' ve 'Ayalet'te şeker/asit oranı aynı bulunmuştur. 'Euraka' limonundan 'Galya' limonu elde edilmiştir. 'Galya'da 'Euraka'ya göre şeker/asitlik oranı daha fazla bulunmuştur.

Gülşen vd. (2007)'nin çalışmasında, Feminnello limon çeşidinin aşı kalemlerine 0, 30, 50, 70, 90 Gy dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanmıştır. Elde edilen 'Gülşen', 'Alata' ve 'Uzun' çeşitlerinde 50 Gy dozunda uçkurutana hassas bulunmuş ve çekirdeksizlik elde edilmiştir. 70 Gy dozunda ise elde edilen 'Eylül' çeşidinin erken olgunlaşan, uçkurutana karşı toleranslı ve çekirdekli olduğu tespit edilmiştir.

Uzun vd. (2008), Gulsen vd. (2007)'de buldukları 4 çeşitle kütdiken limon çeşidinin çekirdek sayısı, meyve suyu içeriği, meyve ağırlığı, kabuk kalınlığı karşılaştırılmıştır. Çekirdeksiz olan 'Alata', 'Uzun', 'Gülşen' çeşitlerinin dikine büyüyen habitusları 'Kütdiken' limonuna benzer, dalları uzun ve güçlü bulunmuştur. Görsel olarak değerlendirildiğinde bu üç çeşit morfolojik açıdan (yaprak şekli, rengi, büyüklüğü ve ağaç özellikleri) farklı olmadığı anlaşılmıştır. 'Kütdiken' limonuna göre bu çekirdeksiz çeşitlerin dalları dikenli bulunmuştur. Ancak 'Eylül' çeşidinin daha küçük, büyüme oranı ve dikenlilik daha az olduğu görülmüştür. Ayrıca 'Eylül' çeşidinin genç yapraklarında antosiyan miktarı diğerlerine göre daha fazla bulunmuştur.

Eryılmaz (2011)'in araştırmasında, 'Femminello Siracusano'na limonunun olgunlaşmamış tohumlarına 0, 20, 40 Gy dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanmış ve uçkurutana toleranslı ve dikensizlik elde edilmiştir.

2.1.3. Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)

Bono vd. (1981)'nin çalışmasında, Clementine mandarin grubundan 'Nules' adlı çeşidin dalında oluşan doğal mutasyon sonucunda büyük meyveli 'Arrufatina' çeşidi elde etmişlerdir. Yine aynı grupta yer alan 'Fina' mandarinin dallarında meydana gelen doğal mutasyon sonucunda 1972 yılında verimi ve iç kalitesi iyi olan 'Esbal', 1973 yılında küçük meyveli ve kırmızımı portakal rengine sahip 'Guillermine' çeşitleri ortaya çıkmıştır.

Iwamasa ve Nishiura (1981)'nin çalışmasında, Satsuma mandarin grubu içerisinde bulunan 'Owari' çeşidinin dallarında meydana gelen doğal mutasyon sonucunda 1958 yılında 'Tachima Wase', 1968 yılında geç meyveye yatan 'Imamura Unshu' ortaya çıkmıştır. Aynı gruptaki bir diğer 'Miyagawa Wase' isimli mandarinin dallarında oluşan doğal mutasyon sonucunda 1976 yılında sıkı kabuk yapısına ve yüksek şeker oranına sahip 'Tachibana Unshu', 1980 yılında pürüzsüz kabuk yapısına sahip 'Morita Unshu' çeşitleri olmuştur.

Ahmad vd. (1992)'in araştırmasında, gama ışınının 'Kinnow' mandarini üzerine etkisini incelemek için 'Kinnow'un tohumlarına 0, 20, 30, 40, 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarında gama ışını uygulanmıştır. Hem ışınlanmış hem ışınlanmamış tohumlar fidanlıktaki toprağa ekilmiş ve laboratuvarında içinde pamuk ve çakıl olan toprağa ekilmiştir. LD₅₀ 50 Gy olarak bulunmuştur. Başka bir deneyde tohum kabuğu ayrılarak aynı dozlardaki gama ışının etkisinin morfolojik parametreleri üzerine çalışılmıştır. Sonuç olarak morfolojik karakterlerde önemli varyasyonlar, fidanların büyüme oranında azalma, tohum kabuğunun uzaklaştırıldığı deneyde tohumun çimlenme süresinde kısalma görülmüştür.

Ollitrault (1992)'un çalışmasında, 'Willofleaf' mandarinin nusellar embriyogenik kallusu MT ortamında 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 Gy dozlarında ⁶⁰Co gama ışınına maruz bırakılmıştır. 90 Gy dozuna kadar farklılık görülmemiştir. Bu kallusların 1-2 alt kültüre alınması 160 ve 180 Gy dozlarında yaşam oranlarını olumlu etkilemiştir.

Vardi vd. (2008)'in çalışmasında, 'Orah' ve 'Murcott' çekirdekli mandarinlerine 32.5 ve 40 Gy dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanarak 'Orri' ve 'Moria' çeşitleri elde etmişlerdir.

Khalil vd. (2011)'nin araştırmasında, 25 ± 5 çekirdek sayısına sahip 'Kinnow'u çekirdeksizleştirmek için Biyoloji ve Tarım Nükleer Enstitüsü'nde dormant haldeki tomurcuklarına 0, 20, 40, 60, 80, 120 Gy dozlarında ^{60}Co gama ışınlaması yapmışlar ve 5 ± 3 çekirdek sayısına sahip mutant 'Kinnow' elde etmişlerdir.

2.1.4. Portakal (*Citrus sinensis* Osbeck.)

Hearn (1984)'nin yapmış olduğu çalışmada 'Pineapple' çeşidinin tohumlarına 10, 15, 20, 25 ve 30 krad dozlarında gama ışını uygulayarak LD₅₀ dozunu, 10-15 krad bulmuş ve çekirdeksiz mutant elde etmiştir.

Latado vd. (2001)'nin çalışmasında, 'Pera' çeşidi portakal (5-6 arasında çekirdek sayısına sahip) tomurcuklarına 40 Gy dozunda gama ışını uygulayarak çekirdeksiz mutant elde etmişlerdir.

Ling vd. (2008)'nin araştırmasında, 'Washington Navel'in tohumlarına uygulanan 0, 10, 20, 30, 40, 50 Gy dozlarında ^{60}Co gama ışınıyla, 50 Gy dozundakinde peroxidase ve protein enzim aktivitesi yüksek bulunurken, hiç uygulama yapılmayan bitkilerde klorofil miktarı daha yüksek bulunmuştur.

Alós vd. (2008)'nin çalışmasında, 'Washington Navel'in dalında oluşan doğal mutasyonla koyu kahverengi kabuk yapısına sahip, et rengi aynı olan fakat meyvesi biraz daha büyük olan 'Navel Negra'yı ortaya çıkarmışlardır.

'Washington Navel'in tomurcuklarında meydana gelen doğal mutasyon sonrasında sırasıyla 1891, 1910, 1935 ve 1948 yıllarında 'Thomson', 'Newhall', 'Lane Late' ve 'Skagg Bononza' meydana gelmiştir. Dallarında meydana gelen bir diğer doğal mutasyon sonucunda ise 1935 ve 1950 yıllarında 'Marss' ve 'Navelina' ortaya çıkmıştır. 'Washington Navel'in tomurcuklarında oluşan doğal mutasyonla daha ince kabuklu ve sulu olan 'Batem Şekeri' ve 'Batem Baharı' elde edilmiştir. 'Valencia'da meydana gelen doğal mutasyon sonucunda daha ince kabuklu ve sulu yapıya sahip 'Batem Fatih'i ortaya çıkarmıştır (Eryılmaz, 2011).

2.2. Turunçgillerde Mikoriza İle İlgili Çalışmalar

Turunçgil yetiştiriciliğinde sertifikasyona uygun fidan üretiminde ilk aranan özellik ekonomik olmasıdır. Mikoriza ile aşıllı fidanlar, araziye dikim esnasında şaşırtma şokuna, su ve diğer stres faktörlerine daha iyi dayanırlar. Az verimli

topraklarda bitki gelişimi daha iyi sağlanır ve fidan üretimi esnasında öncelikle fosfor, çinko ve bakır kullanımını azaltır (Menge vd., 1977; Menge, 1982).

Mikorizanın toprakta bulunuşu, bitki kökleri içindeki oluşumu ve aktivitesi toprak verimliliğine özellikle de ortamın fosfor konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Topraklarda fosfor miktarı yüksek olduğu durumda mikoriza aktivitesi azalış göstermekte, kökler enfekte edilememekte veya enfeksiyon sağlansa bile besin elementi alınımı istenen düzeyde sağlanamamaktadır (Ortaş, 1998).

Farklı mikoriza türlerinin turunç bitkisinde fosfor ve çinko alımına olan etkilerinin incelenmesi; besin elementi alımı yönünden *G.clarium* ile aşıl原因an bitkilerin P ve Zn yönünden diğer mikorizalar ile inokule edilen ve kontrole göre çok daha fazla besin elementi aldığı tespit edilmiştir. Bitki boyu gelişimi bakımından mikorizanın etkisinin son derece önemli olduğu belirlenmiştir. Mikorizayla beraber uygulanan fosfor uygulamaları da istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup aynı zamanda artan dozlarda uygulanan fosfor konsantrasyonları bitki boyları ile negatif bir ilişki göstermiştir. Mikorizasız uygulamalarda ise artan dozlarda uygulanan fosforun bitki boylarını uzattığı belirlenmiştir. Mikorizasız anaçlar fazla oranda fosfor gübresi verilmediği süre zarfında oldukça zayıf gelişmiş veya hiçbir gelişme göstermemiştir. Mikorizanın tek başına ve fosforlu gübre ile birlikte uygulanması, yeşil aksamda yaş ve kuru ağırlığı arttırıcı bir etki gösterirken mikorizanın çinko ile birlikte uygulanmasında ise bu arttırıcı etki görülmemiştir. Farklı mikorizaların bitki gelişimleri üzerine olan etkilerinin araştırılması ve mikoriza uygulamalarının etkinliğinin belirlenmesi açısından *Glomus mosseae* (I), *G.mosseae* (II), *G.clarium*, *G.caledonium* ve *G.etunicatium* mikoriza türleri denenmiş ve bunların içerisinde *G.clarium* türünün turunç anacının gelişimini ilerlettiği görülmüştür. Turunçgil anaçlarının seleksiyonu ya da bahçe tarımı çok yıllık bitkilerin özellikle de turunçgil fidanlarının köklerine dikim sırasında uygulanırsa mikoriza inokulumu hem daha az gübre kullanılabileceği hem de bitkinin yaşamı süresince mikoriza ile enfeksiyonu sayesinde çevre faktörlerine karşı daha dayanıklı olacağı tespit edilmiştir (Ortakçı, 1999).

Arslan vd. (2003)'nin çalışmasında, 3 farklı turunçgil anacını, 2 değişik harç ortamında 5 mikoriza türü ile çalışma yapmışlardır. Araştırmalarında *Glomus fasciculatum* türünün turunç ve kaba limon anaçlarında çöğür gelişiminde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Canhoş (2003)'un araştırmasında, turunçgillerde zamklanma hastalığına (*Phytophthora citrophthora*) karşı kök enfeksiyonlarında *G.clarium* uygulaması sonucunda belirli bir oranda etki ettiğini belirlemiştir. %42.2'lik bu etki, toprak kökenli bir hastalık etmeni olan *P.citrophthora*'nın mücadelesinde çok etkili olmadığını ortaya koymuştur. Fakat mikoriza uygulaması ile birçok araştırmalarda varılan sonuçlara göre, kök yüzeyi ve fosfor absorpsiyonundaki artış ve yer rekabeti, köklerde sağlanan kimyasal ve morfolojik değişimlerle elde edilen kuvvetli gelişmeye bağlı olarak olumlu sonuçların diğer mücadele yöntemleri ile birleştirilmesi önemli bir alternatif olarak görülmüştür.

Özkan vd. (2004)'nin yaptıkları çalışmada, turunç ve Troyer sitranjı anaçlarında mikoriza, fosfor ve mikoriza+fosfor uygulamalarının etkisiyle bitki boyu, kök yaş ve kuru ağırlığı ile gövde kuru ağırlığında ciddi artışlar olduğunu tespit etmişlerdir.

Lin vd. (1987)'a atfen Ortaş (1998), özellikle virüssüz turunçgil fidan yetiştiriciliğinde kullanılan harç karışımında sterilizasyondan sonra ciddi derecede besin elementi eksikliği göstermesi, mikroorganizma faaliyetinin olmaması yanında, topraklarda arzu edilmeyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimler meydana gelmesi sonucu mikoriza kullanımının ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan bir araştırmada, bazı bitkilerin sterilizasyon + mikoriza inokulumun, steril edilmeyene yakın bir bitki büyümesi sağlarken, steril edilen topraklarda ani bir verim düşüklüğü görülmüştür. ABD koşullarında mikorizalı turunçgil fidanları üretmiş ve bu fidanların mikorizasız bitkilerden 6 ay daha erken bahçeye aktarılabilir düzeye geldiklerini rapor etmişlerdir.

Taştekin ve Dalkılıç (2008)'in yaptığı çalışmada, kaba limon ve turunç anaçlarının mikorizaya olan bağımlılığı, mikorizanın en doğru uygulama zamanı, en ideal uygulanacak mikoriza dozu ve fosfor uygulamasının çöğür ve fidan üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki anacada aşı gözü olarak 'Washington Navel' çeşidi kullanılmıştır. Mikoriza uygulaması yapılan turunç kontrol bitkisine göre daha iyi bir saçak kök yapısı ve buna bağlı olarak uygun, sağlıklı bir çöğür elde etmişlerdir.

2.3. Solucan Gübresi (Vermicompost) İle İlgili Çalışmalar

Solucan kompostu (vermicompost) oksijenli ortamda solucanlar tarafından organik maddenin ayrıştırılmaya uğratılması ile elde edilir (kest) (Kara, 2013). Toprak

solucanları Annelida şubesinin Oligochaeta sınıfının Lumbricidae ailesindedir. Kırmızı solucanlar (*Eisenia fetida*) ticari amaçla en çok kullanılır. Ege bölgesinde zeytinin yağa işlenmesi sırasında ortaya çıkan karasu kekinin %20 ve %40 oranında karıştırılması ile elde edilen ortamlarda kokon ve solucan sayısı ile solucan ağırlığı artmıştır (Göçmez, 2013).

2.4. Bazı Turunçgil Türlerinde RAPD Belirteçlerinin Belirlenmesi İle İlgili Çalışmalar

1996'da Continella vd. yaptıkları çalışmada, Comune, Tardive Clementine mandarini seleksiyonlarını tanılamada RAPD belirteçlerini kullanmışlardır ve çalıştıkları 80 primerin 3 tanesi polimorfizm göstermiştir (Yeşiloğlu vd. 2002).

Machado vd. (1996)'da farklı kökenlere sahip 39 Akdeniz (yerli) mandarini genotipinde polimorfizm ve genetik benzerliği RAPD belirteçleriyle araştırmışlar ve genotipler arasında düşük genetik varyasyon olsa dahi RAPD belirteçleriyle genetik polimorfizmin saptanabileceğini ortaya çıkartmışlardır.

Russo ve Cerone 1996'da yaptıkları çalışmada, Clementine mandarinin 20 klonunun tanılanmasında RAPD belirteçleri kullanmışlar ve klonların ayırımında faydalı bilgiler sağlanmıştır (Yeşiloğlu vd., 2002).

Göçmen vd. (2003)'nin araştırmasında, *Citrus* cinsine ait farklı türler ile *Poncirus* cinsi arasındaki filogenetik ilişkiyi saptamak ve bu cins ve türlere ait moleküler belirteçler oluşturmak amacı ile yapılan bu çalışmada RAPD moleküler tekniği kullanılmıştır. Çalışmada, 'Pixie' mandarini (*Citrus reticulata* Blanco), 'Navelina' portakalı (*Citrus sinensis* Osb.), 'Star Ruby' altıntopu (*Citrus paradisi* Macf) ile Flying Dragon (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) materyal olarak kullanılmıştır. 20 değişik tesadüfi nükleotid diziliminden oluşan 10 mer'lik (bazlık) RAPD primerlerinin (Operon F) kullanıldığı çalışmada, primerlerin 4 tanesinde (OF-17, OF-18, OF-19 ve OF-20) hiç DNA amplifikasyonu gerçekleşmemiş, diğer 16 primerde ise monomorfik ve polimorfik bant sayısı sırasıyla 40 ve 125 olarak bulunmuştur. Özellikle anaç olarak kullanılan Flying Dragon farklı olarak oluşturduğu çok sayıdaki polimorfik DNA bantları ile diğer turunçgil türlerinden kolaylıkla ayrılmıştır. Deneme sonuçları, elde edilen polimorfik DNA bantlarının tekrarlanabilir olduğunu, *Citrus* cinsine ait türlerde ve *Poncirus* cinsinde kolay bir şekilde RAPD tekniğinin uygulanabileceğini göstermiştir. Benzerlik oranı

indeksine göre birbirine en uzak (%21) 'Pixie' mandarin çeşidi ile Flying Dragon bulunurken, en yakın (%56) 'Pixie' mandarin çeşidi ile 'Navelina' portakal çeşidi bulunmuştur.

Gülşen vd. (2005)'nin araştırmasında, RAPD tekniği genetik kaynakları arasındaki çeşitlilik, bitki popülasyonunda kullanılan bireyler arasındaki ilişkilerin tespitinde ve genetik haritalama çalışmalarında en fazla kullanılan yöntemlerden birisi olduğunu bildirmektedirler.

Varol (2007)'un çalışmasında, Red Marsh altıntopunun embriyonik kallusları *in vitro* koşullarda büyümenin yavaşlatılması yöntemi ile bir yıl saklamıştır. Somatik embriyolar kontrolden daha kolay rejenerere olmuşlardır (yeniden gelişmişlerdir). Sekiz kallus hattı genetik analizi yapılması için çalışmada kullanılmış, DNA varyasyonunu araştırmak amacı ile RAPD tekniği uygulanmıştır. 102 pirimer kullanılarak yapılan RAPD çalışmasında DNA düzeyinde herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Deng vd. (2000)'a atfen Varol (2007), 14 turunçgil genotipinin olgun meyvelerinin gelişmemiş ovüllerinden (tohum taslakları) embriyogenik kallus elde etmeye çalışmışlar ve embriyogenik kallusları regenerere ederek bu türleri başarı ile koruma altına almışlardır. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada genetik koleksiyonda mevcut olan 253 bireyi koruma ve saklamaya almadan önce RAPD analizleri ile tanımlamışlardır. Bu çalışmada toplam 190 RAPD primeri kullanılmış ve kullanılan primerlerden 12 tanesi ile çok iyi amplifikasyon sağlanmıştır. Araştırmacılar amplifiye olan 12 primerden 7 primerin belirgin türlerin ayrılmasında kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Şimşek (2009)'in çalışmasında, RAPD yöntemi ile uç kurutan (*Phoma tracheiphila*) hastalığına dayanıklı veya tolerant olarak tespit edilen toplam 16 limon genotipin moleküler tanılaması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 100 primer içerisinde 48 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Çalışmada hepsinin farklı özellikleri ortaya konulmuştur. Ancak Tuzcu 896 ve Tuzcu 897 genotipleri RAPD yöntemi ile birbirinden ayırt edilemediği gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Üç Yapraklı Portakal (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) Anacı

Üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata*) Japonya, Çin, Arjantin ve Avustralya gibi dünyanın bazı alanlarında satsuma mandarini ve portakallar için anaç olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır (Davies ve Albrigo, 2005). Kalem özellikleri üzerinde değişik etkilere sahip birçok seleksiyonu olmasından dolayı, üç yapraklı portakal diğer anaçlardan değişiklik gösterir. Üç yapraklı portakal kışın yaprağını döker, kış dormansisi uzundur ve dona dayanımı çok fazladır (Ercişli, 2012). *P.trifoliata* üzerine aşılı ağaçlar CTV ve xyloporosis tarafından etkilenmemektedir. Ancak yanıklığa hassastır. Üç yapraklı portakal genelde turunçgil nematoduna, gövde çürüklüğüne ve diğer zayıf drenajla ilgili toprak problemlerine dayanıklıdır. Ancak gal nematoduna dayanıklı değildir. Üç yapraklı portakal üzerinde üretilen meyvelerin meyve suyu mükemmel kalitededir (Davies ve Albrigo, 2005).

Çalışmada kullanılan 2 yaşındaki 160 tane üç yapraklı portakal anacı İzmir ilinin Ödemiş ilçesine bağlı Bademli Mahallesi'ndeki Semih ATIKAN'ın bahçesinden temin edilmiştir. Temin edilen bitkiler 12.12.2012 tarihinde Ödemiş'teki Emre fidancılık yüksek plastik tüneline getirilmiştir. Mutasyonda kullanılan üç yapraklı portakal anacı Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Çalışmada kamkat aşısı kalemlerinin aşılmasında kullanılan üç yapraklı portakal anacı

3.1.2. Nagami Kamkatı (*Fortunella margarita* L.)

Yetiştiriciliği yapılan kamkatın tanınmış dört türü vardır. Bunlar Hong Kong (*Fortunella hindisii*), Marumi (*Fortunella japonica*), Nagami (*Fortunella margarita*), Meiwa (*Fortunella crassifolia*)'dır (Hocagil, 2012).

Nagami kamkatı Çin'den dünyaya yayılmıştır. 4-5 dilimlik meyvesi olup 2-5 çekirdeği vardır. Meyvesi yuvarlak olup 4-5 cm büyüklüğe erişirir. Mevsimi Ekim- Ocak ayı arasındadır. Ağacı 4,5 m'ye kadar ulaşır. Dünyada, Çin, Japonya, Amerika, Porto Riko, Guatemala, Kolombiya, Brezilya ve Güney Hindistan'da yetişir (Hocagil, 2012). Verime yatması 2 yıl sürer ve periyodisite görülmez. Meyvesi 12 ay ağaç üzerinde kalabilir. -5°C soğuklara kadar dayanabilir.

Çalışmada kullanılan Nagami kamkat aşısı kalemleri İzmir ili Ödemiş ilçesinde bulunan Emre Fidancılık ve Ödemiş'in Bademli Mahallesi'ndeki Mehmet TABAK'tan temin edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Aşı kalemi olarak kullanılan Nagami kamkatı

3.1.3. Kullanılan diğer maddeler

Mikoriza: 1×10^4 (w/w) *Glomus intraradices*, *G. aggregatum*, *G. mosseae*, *G. clarium*, *G. monosporum*, *G. deserticola*, *G. brasilianum*, *G. etunicatum*, *Gigaspora margarita* (ERS® Endo Roots Soluble, BioGlobal, Antalya)

Solucan gübresi: Doç Dr. Ayhan YILDIZ'dan elde edilmiştir.

Taq DNA Polimeraz: 4 çeşit nükleotid (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP) karışımıdır. Taq DNA polimeraz, PCR reaksiyonu esnasında polimerizasyonun gerçekleşmesi için kullanılmıştır.

dNTP: PCR reaksiyonu sırasında polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan nükleotidlerin sağlanması için kullanılmıştır.

DNA Marker: Jelde yürütülen DNA'ların büyüklüklerini belirlemek için GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır.

6X Loading Dye Solution: Jelde yürütülen DNA'nın nereye kadar yürütüldüğünü belirlemek için yükleme solüsyonu olarak kullanılmıştır.

10X TBE Elektroforez Tampon Çözeltisi: Agaroz jeli hazırlamak ve örnekleri jelde yürütmek için 0.5 X TBE tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

Primerler: RAPD analizinde 9 adet (10'merlik) primer kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve baz dizilimi

No	Primer Adı	Primerlerin Baz Dizilimi
1	PM1	5'-GTACCGGTCC-3'
2	PM2	5'-GTACCGGTCCG-3'
3	PM3	5'-GTACCGGTCA-3'
4	PM4	5'-GTACCGGTCT-3'
5	PM5	5'-GTACCGGTGC-3'
6	PM6	5'-GTACCGGTAC-3'
7	PM7	5'-GTACCGGTTC-3'
8	PM8	5'-GTACCGGCC-3'
9	PM9	5'-GTACCGGGCC-3'

3.2. Yöntem

3.2.1. Üç yapraklı portakal anacının hazırlanması

12.12.2012 yılında 2 yaşındaki 248 tane anacı saksıya dikmek için, kök kısaltması ve tepe budaması yapılmıştır. Ortalama boyları 70 cm. olan anaçlar 28-25 cm'e kadar kısaltılmıştır (Şekil 3.3). Kökler çeşme suyuyla yıkandı ve 2 litre hacmindeki saksılara alındı.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.3. Üç yapraklı portakal anacının (a) kök budaması, (b) ve (c) tepe budaması, (d) kök yıkaması

3.2.2. Saksı harcının hazırlanması

12.12.2012 tarihinde her bir grupta 62 adet üç yapraklı portakal anacı olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+solucan gübresi şeklinde hazırlanan karışımlardır. Saksı harcı olarak eşit hacimde bahçe toprağı, torf, curuf, keçi gübresi karışımı kullanılmıştır. Harç 2 litrelik siyah plastik fidan saksılarına doldurulmuştur (62x2=124 litre) (Şekil 3.4).

Kontrol grubu: Sadece harç karışımı bulunmaktadır.

Mikoriza grubu: 500 ml suya 25 gram mikoriza eklenerek karıştırılmıştır (%5 w/v). Anaçlar dikilmeden önce kökleri mikorizaya 1 dakika süreyle bandırılmıştır.

Solucan gübresi grubu: 124 litrelik harcın içine 5 gram solucan gübresi ilave edilerek karıştırılmış ve 2 litrelik saksılara doldurulmuştur.

Mikoriza ve solucan gübresi grubu: Mikoriza solusyonuna bandırılan anaçlar içerisinde solucan gübresi bulunan harca dikilmişlerdir.



(a)



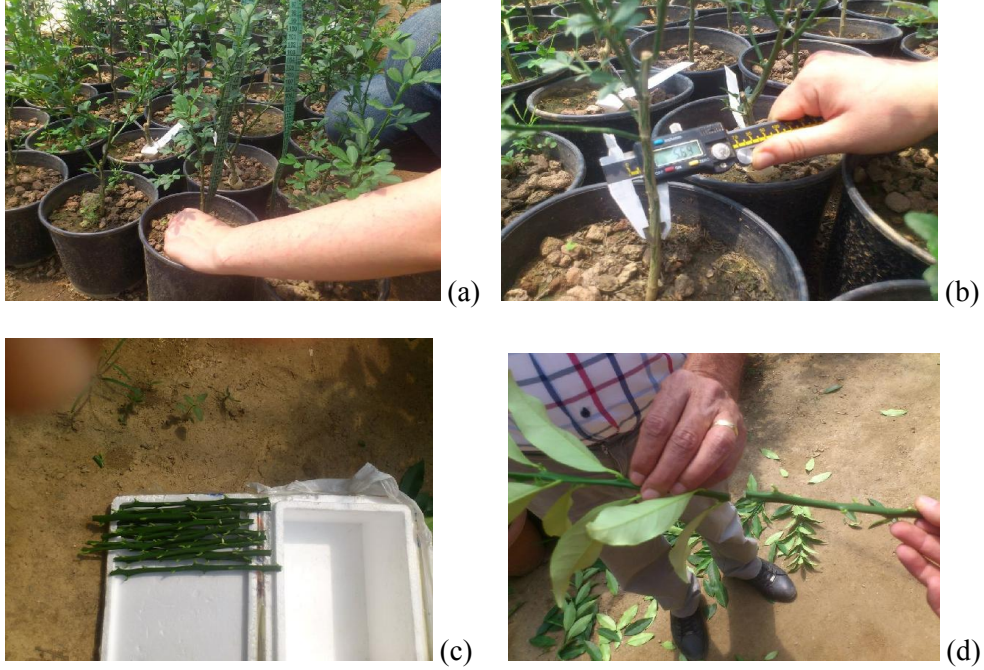
(b)

Şekil 3.4. (a) Köklerin mikorizaya bandırılması, (b) anaçların 4 gruba ayrılması

Bu şekilde 4 gruba ayrılan boyları aynı olan anaçların gövde çapları ölçülmüştür. Anaçlar, aş kalınlığına gelmeleri için büyümeye bırakılmıştır.

3.2.3. Aşı gözlerinin ⁶⁰Co ışınlamasına tabi tutulması

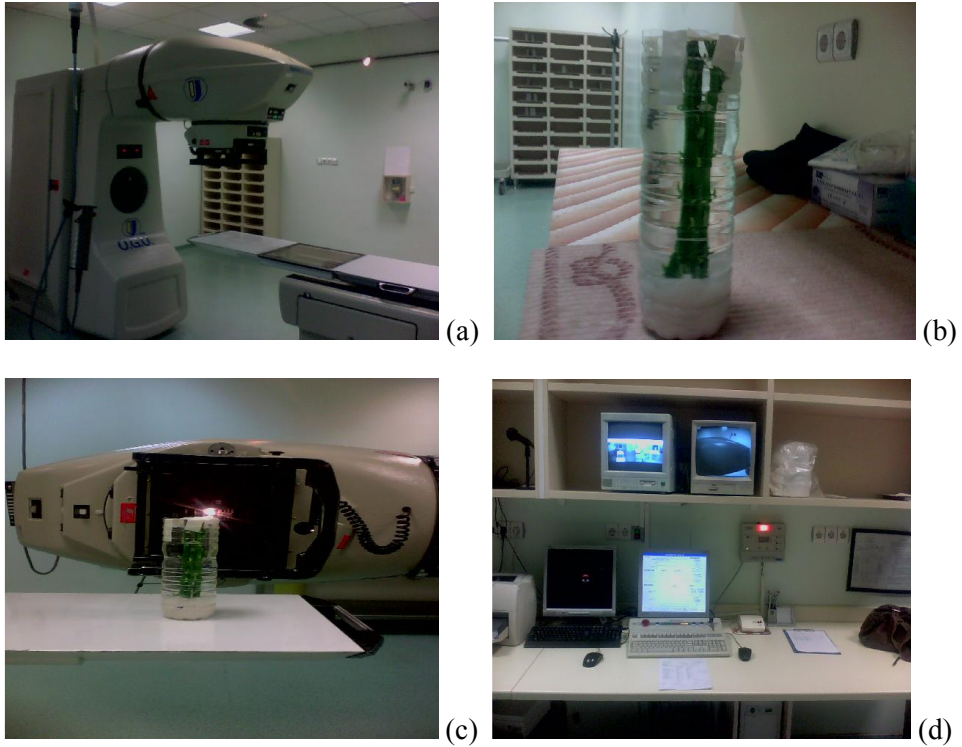
Saksılara dikilen 248 anaçtan 02.07.2013 tarihinde aş kalınlığına gelmiş olan 160 tanesinin, toprak seviyesinden en uzun sürgünün tepe tomurcuğuna kadar olan boyları şerit metreyle ve toprak seviyesinden 5-6 mm'den gövde çapları kumpasla ölçülmüştür (Şekil 3.5). Daha sonra yan dalları sayılmıştır. Aynı tarihte Emre Fidancılık, Ödemiş yüksek plastik tüneline bulunan Nagami kamkatlarından 19 cm ve üzerinde ortalama 8-10 göz bulunan aş kalemleri kesilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. (a) Üç yapraklı portakal boy, (b) çap ölçümü, (c) (d) Nagami kamkatından aşı kalemi alınması

02.07.2013 tarihinde 20 adet aşı kalemi ıslak havluya sarılarak içinde buz olan strofoam köpük kutuya yerleştirilmiştir. Aşı kalemleri 03.07.2013 tarihinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Radyasyon Onkoloji Ana Bilimdalı'na ulaştırılmıştır. 20 adet aşı kalemi rastgele olarak her doza 5'er adet düşecek şekilde 4 gruba ayrılmış ve 15, 30, 45, 60 gray dozlarında ^{60}Co gama ışını uygulaması yapılmıştır. Plastik paket lastiği ile demet haline getirilen aşı kalemleri 1.5 litre hacmindeki su şişesine konup alttan pamukla sabitlenmiştir. İçine geçirgenliği arttırmak için çeşme suyu konulmuştur. Hazırlanan şişe oda sıcaklığında (22-23°C) 'Theratron Elite 80' isimli ^{60}Co gama cihazı önüne yerleştirilmiştir.

15 gray doz: şişenin bir yüzü 11.79 dak, arka yüzü 11.75 dak olmak üzere toplam 23.54 dak ışınlanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. (a) ‘Theratron Elite 80’ isimli ^{60}Co gama cihazı, (b) kamkat aşı kalemlerinin şeffaf plastik şişede sabitlenmesi, (c) ^{60}Co gama ışını uygulaması, (d) izleme odası

30 gray dozu: şişenin ön yüzü 23.58 dak, arka yüzü 23.51 dak olmak üzere toplam 47.19 dak ışınlanmıştır.

45 gray dozu: şişenin ön yüzü 35.37 dak arka yüzü 35.26 dak olmak üzere toplam 70.63 dak ışınlanmıştır.

60 gray dozu: ön yüz 47.16 dak arka yüz 47.02 dak sürerek toplam 94.18 dak ışınlanmıştır.

3.2.4. Aşılama

15, 30, 45, 60 gray dozlarında ^{60}Co gama ışınlaması yapılan Nagami kamkatı aşı kalemleri 05.07.2014 tarihinde Emre Fidancılık, Ödemiş, İzmir yüksek plastik tüneline bulunan üç yapraklı portakal anaçları üzerine T göz aşısı ile aşılanmıştır (Şekil 3.7).



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.7. (a) T şeklinde kabuğun kaldırılması, (b) ışınlanmış Nagami kamkatı kaleminden alınan gözün üç yapraklı portakal anacına yerleştirilmesi, (c) aşı yapılan yerin aşı bandıyla sarılması, (d) üzerine etiketinin konulması

Kontrol dahil her ışınlama grubunda 32'şer adet olmak üzere toplam 160 adet aşı yapılmıştır. Üç yapraklı portakal anacının yetiştirilmesi sırasında yapılan her bir kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+solucan gübresi uygulamalarında 8'er adet aşı bulunacak şekilde etiketleme yapılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. 4 gruba ayırarak etiketlerinin takılması

3.2.5. Fidanlarda yapılan ölçümler

12.12.2012 tarihinde 19 cm boyunda olan 240 adet üç yapraklı portakal anaçları saksıya dikildikten sonra gövde çapları ölçülmüştür. 02.07.2013 tarihinde aşı kalınlığına gelen anacın boy uzunluğu (cm), gövde çapı (mm), yan dal sayısı (adet) ölçülmüştür. Anaçların 7 ay içerisindeki 4 farklı harç ortamındaki büyüme durumları karşılaştırılmıştır.

05.07.2013 tarihinde üç yapraklı portakal anacı üzerine T göz aşısı şeklinde aşılama 5 farklı dozda Nagami kamkatı aşısı kalemlerinin 26.07.2013 tarihinde tutma oranları hesaplanmıştır. 06.12.2013 ve 02.11.2014 tarihlerinde 0, 15, 30, 45, 60 gram dozlarına ait bitkilerde tutan aşısı sürgünlerinin boyu (cm), çapı (mm) ve yaprak sayısı (adet) 2 kez ölçülmüştür.

17.12.2013 tarihinde her bir gama dozuna ait olan bitkilerin yapraklarının alt ve üst yüzeylerindeki klorofil miktarları normalize edilmiş büyüme indisi (normalized difference vegetation index) ile ölçüm yapan Plantpen NDVI 300 (PSI (Photon System Instruments), spol. s r.o., Drasov, Çek Cumhuriyeti) ölçülmüştür. 02.11.2014 tarihinde meyve sayısı ve meyve çap değerleri ölçülmüştür.

3.2.6. RAPD analizi yapılması

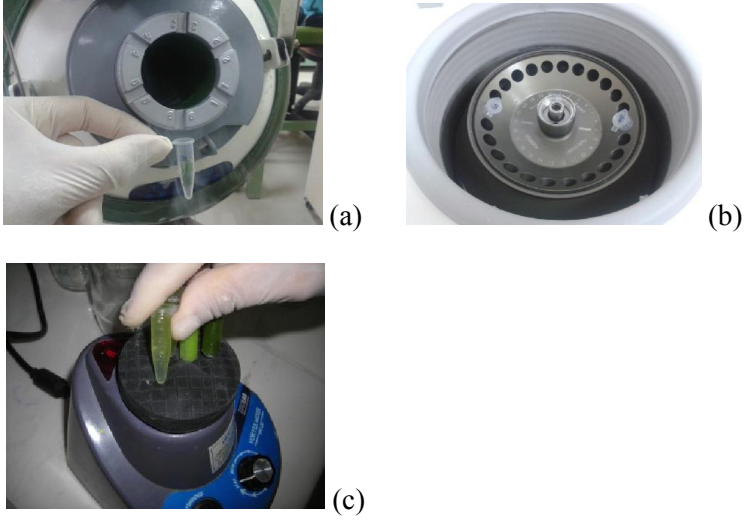
3.2.6.1. DNA çıkartılması (ekstraksiyon)

2013 yılında 0, 15, 30, 45, 60 gray dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanmış 30 adet bitkinin her birinden 2'şer adet yaprak örneği 18.12.2013 tarihinde toplanıp poşetler içerisine yerleştirilerek en kısa sürede ADÜ-TARBIYOMER, Aydın laboratuvarına getirilip buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir. Aynı gün laboratuvar çalışmasına başlanmıştır. Kullanılan Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit® solüsyonlarıyla doğrudan yapraktan DNA çıkartılması amacıyla 0.5 cm çapında yaprak dikleri kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan PCR karışımları (ddH₂O, 2X tampon, primer, enzim, bitki DNA'sı) üretici firmanın talimatları izlenerek optimizasyonu sağlamak amacıyla farklı oranlarda denenerek 2 ay süresince çalışılmıştır. Ancak gama ışınlamasına tabi tutulan aşı kalemlerinden süren 30 adet bireyin çıkartılan DNA'sı ile PCR yapılmış, elektroforezde görüntülenmiş, ancak maalesef bant görüntüsü elde edilemediği için bu ön çalışmaya son verilmiştir.

2014 yılında, aynı 29 adet bitkinin DNA'sı Thermo Scientific GeneJET® Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791 kullanılarak çıkartılmıştır. 21.08.2014 tarihinde Emre Fidancılık, Ödemiş, İzmir yüksek plastik tünelin alınan 29 bitkiye ait yapraklar plastik buzdolabı poşeti içerisine yerleştirilip ve üzerlerine kodları yazılarak en kısa sürede ADÜ-TARBIYOMER, Aydın laboratuvarına getirilip buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir. Toplam 29 adet bitkiye ait yaprak örneklerine 21-23.08.2014 tarihleri arasında aşağıdaki işlemler uygulanarak DNA çıkartılmıştır (Şekil 3.9):

- 1- Yaprak örnekleri yaklaşık 100 mg kadar tartıldıktan sonra alkol ile yıkanmış ve kurulanmıştır. 1.5 ml'lik Eppendorf® tüp içerisine konulan yaprak örneği üzerine sıvı azot dökülerek metal çivi yardımıyla ezilmiştir. 350 µl Lysis Buffer A konularak 20 s vorteks işlemi yapılmıştır.
- 2- 50 µl Lysis Buffer B ve 20 µl RNase A eklenmiştir.
- 3- 10 dakika 65°C'de termomikserde inkübe edilmiştir.

- 4- 130 µl Precipitation Solution ilave edilip 2-3 defa alt üst edilerek karıştırılmıştır. Buzdolabında 5 dak bekletilerek 14,000 rpm'de 5 dak santifürj edilmiştir.
- 5- Spin kolonu 2.0 ml'lik tüpe yerleştirilmiştir. Santrifuj edilen örneğin üst fazı (supernatant, 500 µl) mikro pipet yardımıyla çekip spin kolonun üzerine konulmuştur. Üzerine 400 µl Plant gDNA Binding Solution ve 400 µl %96 etanol konularak 20-30 s vortekslenmiştir.
- 6- Hazırlanan karışımdan kolon içerisinden 600-700 µl çekip 8,000 rpm'de 1 dak santrifuj edilmiştir. Ardından dipteki süzüntü tüpten uzaklaştırılmıştır. Spin kolon 2.0 ml'lik tüpün içerisine tekrar yerleştirilmiştir. Üzerine karışımın diğer yarısı 600-700 µl eklenip 8,000 rpm'de 1 dak santifürj edilmiştir. Tekrar dipteki süzüntü (DNA filitrede kaldığından alta geçen diğer hücre organelleri) dökülmüştür.
- 7- Spin kolonun üzerine 500 µl Buffer W1 eklenmiştir. 10,000 rpm'de 1 dak santrifuj edilmiştir. Dipteki süzüntü tüpten uzaklaştırılmıştır. Spin kolon 2 ml'lik tüpün içersine tekrar yerleştirilmiştir.
- 8- Spin kolon üzerine 500 Buffer W2 eklenmiştir. 10,000 rpm'de 3 dak santrifuj edilmiştir. Ardından daha iyi süzülmesi için 14,000 rpm'de 1 dak daha santrifuj edilmiştir.
- 9- Spin kolonu 1.5 ml'lik tüpe alınmıştır. Filitrenin üzerine 100 µl Elution Buffer konularak oda sıcaklığında 5 dak bekletilmiştir. Sonra 10,000 rpm'de 1 dak santrifuj edilmiştir. PCR'da kullanılıncaya kadar buzdolobında (-20°C) depolanmıştır.



Şekil 3.9. (a) Tüplerin içerisine sıvı azotun dökülmesi, (b) tüplerin santrifüj edilmesi, (c) vorteks işleminin yapılması

3.2.6.2. PCR

Toplam 9 primer kullanılmıştır. PCR solusyonu her bir örnek için 0.2 ml'lik Eppendorf® tüp içerisinde 1.5 μ l 10 \times Buffer *Taq* tampon, 1.5 μ l MgCl₂, 2.0 μ l dNTP, 1.2 μ l BSA, 0.2 μ l *Taq* DNA polymerase, 0.6 μ l primer ve, 5.0 μ l genomik DNA eklenmiştir. Üzerine karışımı 15 μ l'ye tamamlayıncaya kadar 8.47 μ l steril ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır. Her bir tüpün üzerine numaraları yazılmıştır. Tüpler PCR cihazına yerleştirmeden önce kapaklarının kapalı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra tüpler PCR cihazına (BioRad® thermal cycler) yerleştirilmiştir. PCR cihazında kullanılan program:

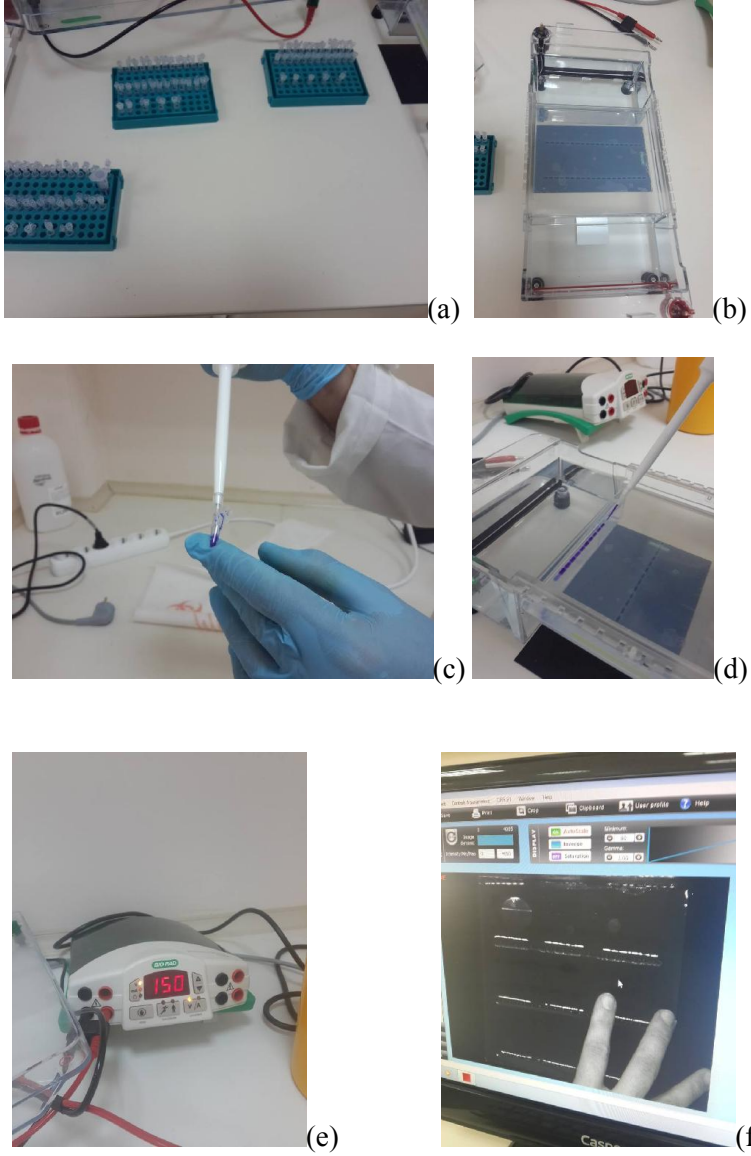
1. 94°C 5 dakika
2. 94°C 30 saniye
3. 35°C 30 saniye
4. 72°C 1 dakika
5. Go to 2 34 Döngü
6. 72°C 5 dakika
7. 4°C ∞ olmak üzere toplam 1 saat 50 dak çalışmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. PCR cihazındaki RAPD programı ayarlanması

3.2.6.3. Gel elektroforezi

PCR örneklerinin yürütülmesi için %1.8'lik agaroz jelin hazırlanması amacıyla 10X TBE çözeltisinden 50 mL alınarak 1000 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Bu şekilde 0.5X TBE çözeltisi elde edilmiş olup PCR'ı yapılan DNA örneklerinin yürütülmesi için %1.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 1.8 g agaroz (Biomax, Selangor, Malaysia), hassas terazide tartılarak 250 ml'lik cam kavanoza yerleştirilmiş, üzerine 100 ml 0.5X TBE çözeltisine ilave edilmiştir. Mikrodalga fırında hafifçe kaynaması sağlanıp birkaç kez şiddetli şekilde çalkalanmıştır. Solusyon iyice şeffaf hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Agaroz, eli hafifçe yakacak sıcaklığa ulaşıncaya kadar soğutulmuştur. İçerisine EasyVision® DNA boyası eklenen jel 20'li 3 tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tepsisine dökülmüştür. Katılaştıran jel, PCR ürünlerini yürütmek için saydam beyaz renk aldıktan sonra taraklar çıkartılmıştır (Şekil 3.11). Böylece PCR örneklerinin yüklenmesi için %1.8'lik agaroz jel hazır hale gelmiştir. PCR programı tamamlanan tüplerin içerisine 2 µl 6X yükleme boyası eklenmiştir. PCR ürünleri jelin kuyucuklarına 2 µl 6× yükleme boyası + 15 µl PCR ürünü 0.2 ml'lik tüp içerisinde karıştırılarak tüpten 10 µl karışım alınıp jelin kuyucuklarına pipetlenmiştir. PCR ürünleri elektroforez cihazında %1.8 agaroz jelde 150 V, 200 mA, 20-40 dak süresince yürütülmek suretiyle ayarlanmıştır (Şekil 3.11). Jeller UV ışık altında fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.11. (a) PCR cihazından çıkan jele yüklenecek ürünler, (b) DNA yüklemeye hazır katılaştan jel, (c) tüplerden 10 µl karışımın PCR ürününün pipetle alınması, (d) alınan ürünlerin jelin kuyucuklarına yüklenmesi, (e) elektroforez cihazının ayarlanması, (f) jelin UV ışık altında gözlenmesi

4. BULGULAR

4.1. Üç Yapraklı Portakal Anacında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

12.12.2012 tarihinde saksılara alınan ve her biri 19 cm boyunda olan 240 adet üç yapraklı portakal anaçlarının gövde çap ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). Kullanılan üç yapraklı portakal anaçlarının gövde çapları arasında istatistiki yönden fark olmaması, çöğürlerin uygulamalara rastgele dağıtıldığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Üç yapraklı portakal çöğürlerinde gövde çap ölçüm değerleri

Uygulama	Gövde Çap Ortalaması (mm)
Kontrol	5.60
Mikoriza	5.00
Solucan Gübresi	6.00
Solucan Gübresi+Mikoriza	5.40
LSD _{0.05}	ö.d.

02.07.2013 tarihinde aşılardan önce 4 grupta yapılan üç yapraklı portakal anacının boy, çap ve yan dal sayısı ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.2). 12.12.2012 tarihte yapılan ölçümle karşılaştırma yapılarak hangi harç ortamının üç yapraklı portakal çöğürlerinin büyüme ve gelişmesine daha yüksek veya düşük etki ettiğine bakılmıştır. Boy bakımından en yüksek değeri rakamsal olarak kontrol grubu verirken, istatistiki olarak mikoriza ve mikoriza+solucan gübresi ile aynı grupta yer almıştır. Gövde çapı bakımından en yüksek değeri rakamsal olarak mikoriza grubu göstermesine rağmen saksı harcı ortamları arasında istatistiki yönden farklılık yoktur. Yan dal sayısı bakımından en yüksek değer solucan gübrelili grupta gözlenmesine rağmen, saksı harcı ortamları arasında istatistiki yönden fark görülmemiştir.

Çizelge 4.2. 02.07.2013 tarihinde aşılama öncesi boy uzunluğu, gövde çapı, yan dal sayısı verileri

Uygulama	Boy (cm)	Çap (mm)	Yan Dal Sayısı (adet)
Kontrol	43.626a	6.564	4.026
Mikoriza	42.550a	7.006	4.028
Solucan Gübresi	36.946 b	6.720	4.302
Mikoriza + Solucan Gübresi	40.774ab	6.788	3.804
Ortalama	40.974	6.770	4.040
LSD _{0.05}	4.420	ö.d.	ö.d.

Aşı tutma oranı: 05.07.2013 tarihinde üç yapraklı portakal anacı üzerine aşılama 0, 15, 30, 45, 60 gray dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanmış Nagami kamkatı aşı kalemlerinin 26.07.2013 tarihinde tutma oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Toplam 248 bitkiden 48 tanesinde aşı tutmuştur. 0, 15, 30, 45, 60 gray dozlarının her birinde 32 adet bitki bulunmaktadır. Doz oranı olarak bakıldığında, tutan aşı sayısı 15 gray'de daha fazla bulunmuştur. En az 60 gray'de tespit edilmiştir. Ayrıca aşı tutma oranları; kontrol, mikoriza, mikoriza+ solucan gübre, solucan gübre gruplarının içerisinde de değerlendirme yapılmıştır. Her gruptaki 60 adet bitkiden çoktan aza doğru sırasıyla kontrol grubunda 15, mikorizalı grupta 13, solucan gübresi+mikoriza grubunda 11, solucan gübresi grubunda 9 adet aşı tutmuştur. 12.09.2013 tarihinde aşının tumadığı 0 gray dozundaki 19 bitki tekrar aşılama meyve tutumuna kadar geçen zamanda hayatta kalan bitki sayısı 30'a düşmüştür. Bu şekilde M₁V₁ bitkileri elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. 12.12.2012 tarihinde kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+ solucan gübresi uygulanan, 05.07.2013 tarihinde T göz aşısı ile aşılanan Nagami kamkatının 26.07.2013 tarihindeki aşısı canlılığı

Doz (Gy)	K	K%	G+M	G+M%	M	M%	G	G%	Toplam (adet)	Ort. (%)
0	2	25.0	3	37.5	2	25.0	1	12.5	8	25.0
15	5	62.5	2	25.0	5	62.5	2	25.0	14	43.8
30	4	50.0	3	37.5	3	37.5	3	37.5	13	40.6
45	4	50.0	1	12.5	0	0.0	2	25.0	7	21.9
60	0	0.0	2	25.0	3	37.5	1	12.5	6	18.8
Ort.(%)		37.5		27.5		32.5		22.5	48	30.0
LSD _{0.05}										ö.d.

4.2. Kamkatta Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Aşısı sürgünlerine ait ölçümler

06.12.2013 tarihinde 0, 15, 30, 45, 60 gray dozlarına ait bitkilerde tutan aşılarıdaki sürgün boyu, gövde çapı ve yaprak sayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.4a). Boy uzunluğu bakımından, 60 Gy'de, gövde çapı bakımından 0 Gy'de yaprak sayısı ise 15 Gy'de yüksek tespit edilmiştir. Bu ölçümde 5 farklı doza ait bitkilerde birbirine yakın değerler tespit edilmiştir.

02.11.2014 tarihinde yapılan aynı ölçümlerde boy uzunluğu ve yaprak sayısı bakımından en fazla 0 Gy 2.sırayı ise 60 Gy takip etmiştir.15, 30, 45 Gy dozlarında sayıca ani düşmeler görülmüştür. Gövde çapı kalınlığı 60 Gy'de fazla olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4b).

Çizelge 4.4. Aşı sürgünlerine ait boy, gövde çapı, yaprak sayısı değerleri

a) 06.12.2013

Doz (Gy)	Boy (cm)	Gövde Çapı (mm)	Yaprak Sayısı (adet)
0	11.16	2.44	14
15	9.94	2.40	15
30	10.31	1.91	9
45	9.60	2.41	11
60	11.54	2.14	13
Ort.	10.51	2.26	12

b) 02.11.2014

Doz (Gy)	Boy (cm)	Gövde Çapı (mm)	Yaprak Sayısı (adet)
0	39.02	5.00	47
15	29.11	5.57	41
30	21.71	4.78	26
45	20.98	4.78	26
60	34.43	5.72	44
Ort.	29.05	5.17	37

4.2.2. Yaprak klorofil miktarı

17.12.2013 tarihinde her bir doza ait olan bitkilerin yapraklarının alt ve üst yüzeylerindeki klorofil miktarlarına bakılmıştır ve her doz grubundaki klorofil değerleri verilmiştir (Çizelge 4.5). Yaprak klorofil miktarları üst yüzeyde 0.6254-0.6735 ve alt yüzeyde 0.4003-0.4224 arasında değişmektedir. Yaprak üst ve alt yüzeyleri klorofil miktarı 0 Gy dozunda daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Yaprakların klorofil miktarları 17.12.2013

Doz (Gy)	Üst yüzey	Alt yüzey
0	0.6735	0.4224
15	0.6450	0.4116
30	0.6254	0.4003
45	0.6500	0.4199
60	0.6436	0.4104
Ort.	0.6475	0.4129
LSD _{0.05}	ö.d.	ö.d.

4.2.3. Meyve ölçümleri

02.11.2014 tarihinde meyve sayısı ve meyve çap değerleri arasındaki farklılık istatistiki olarak ($P=0.05$) önemli değildir (Çizelge 4.6). Ancak rakamsal olarak, meyve sayısı 2.40 adet 60 Gy ile 5.50 adet 45 Gy arasında, meyve çapı ise 16.20 mm 60 Gy ile 18.99 mm 0 Gy arasındadeğişmiştir.

Çizelge 4.6. Meyve sayısı ve meyve çapı değerleri 02.11.2014

Doz (Gy)	Meyve sayısı (adet)	Meyve çapı (mm)
0	3.00	18.99
15	4.56	18.73
30	3.25	18.10
45	5.50	18.00
60	2.40	16.20
Ort.	3.71	18.08
LSD _{0.05}	ö.d.	ö.d.

4.3. RAPD Analizi

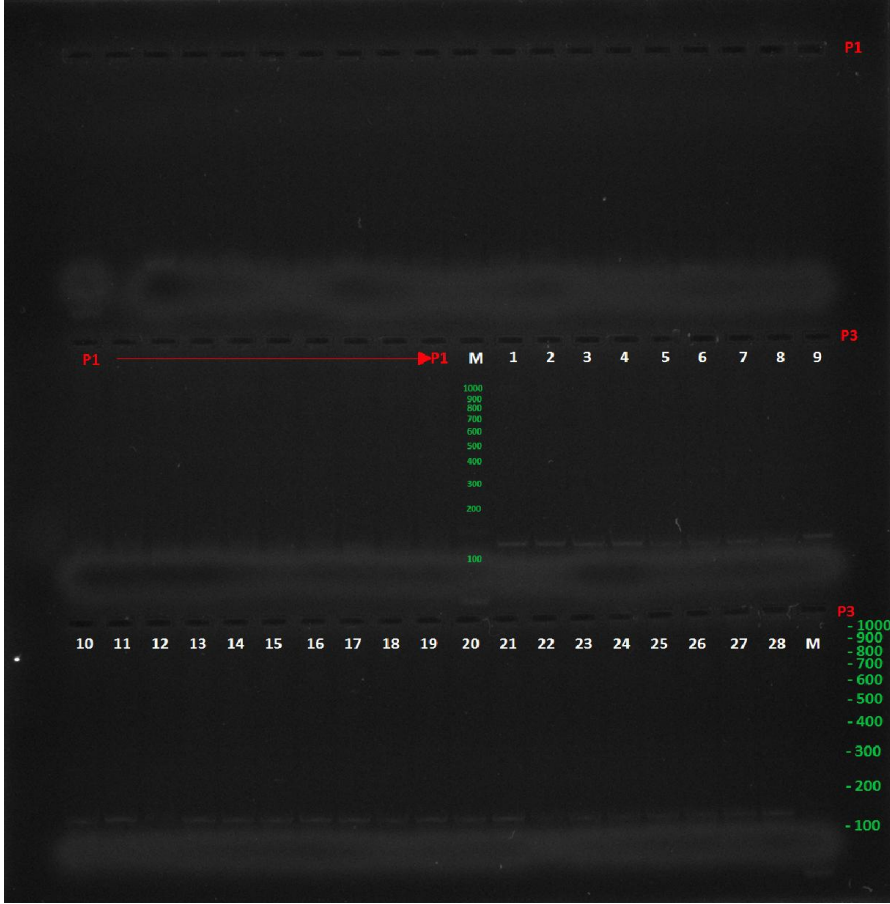
29 adet bitkide 9 değişik tesadüfi nüleotid diziliminden oluşan 10' merlik (bazlık) RAPD primerlerinin kullanıldığı çalışmada toplam 14 adet bant elde edilmiş, bunların 4 adedi polimorfik bulunmuştur (Çizelge 4.7). Her primerden elde edilen bant profilleri ayrı olarak değerlendirilmiştir. Kullanılan bitkiler sırasıyla (grup adı-sıra numarası-doiz miktarı):

1. K-01-15,	6. M-10-15,	11. S+M-18-30
2. K-10-15,	7. S-19-30,	12. S-26-45
3. M-17-30,	8. K-27-45	13. S-39-60
4. K-30-45,	9. S+M-34-60	14. M-16-15
5. S+M-40-60,	10. S-14-15	15. K-18-30
16. S+M-25-45,	21. M-35-60	26. K-13-15
17. M-34-60,	22. S+M-15	27. K-24-30
18. M-14-15,	23. S+M-21-30	28. K-32-45
19. K-17-30,	24. K-28-45	29. M-12-15
20. S+M-24-45,	25. M-09-15	30. M-01-0

Çizelge 4.7. PCR amplifikasyonları sonucu elde edilen bant sayıları, polimorfik bant sayıları yaklaşık bant büyüklükleri

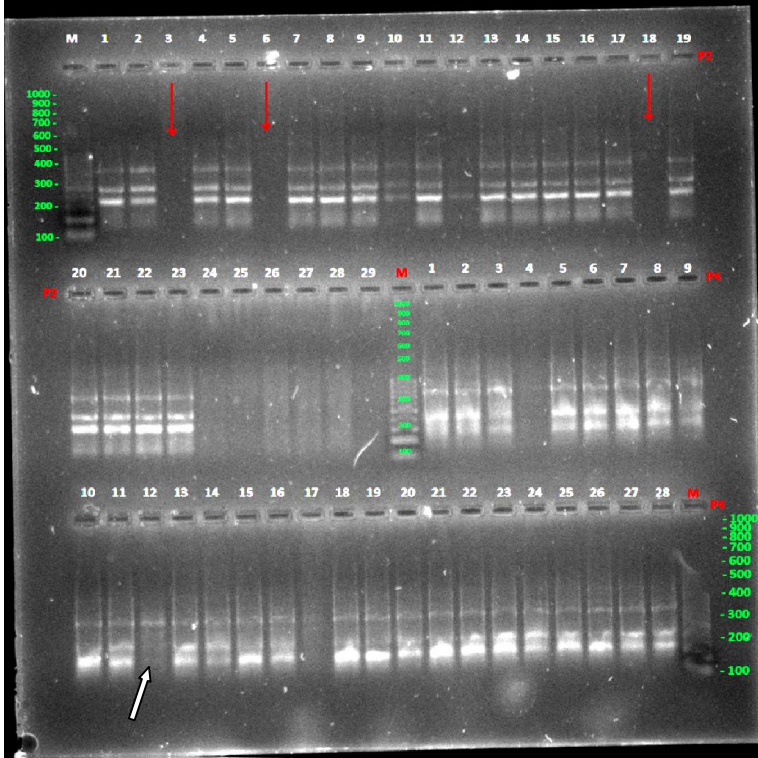
Primer	Elde edilen toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Yaklaşık bant büyüklüğü (bp)
PM1	0	0	-
PM2	3	0	200-400
PM3	1	0	100-200
PM4	3	1	100-400
PM5	4	1	100-300
PM6	0	0	-
PM7	3	2	200-400
PM8	1	0	100-400
PM9	0	0	-
Toplam	14	4	

PM1 ve PM3 (Primer 1 ve Primer 3): PM1 ve PM3 primerleriyle yapılan RAPD-PCR sonucu elde edilen DNA band profilleri Şekil 4.1’de görülmektedir. PM1 primeri ile hiç amplifikasyon gerçekleşmediği için çalışılmamıştır. PM3 primerinde 1 bant elde edilmiştir ve polimorfizm hiç gözlenmemiştir. Mutasyona uğrayandan bile ayırt edilememiştir.



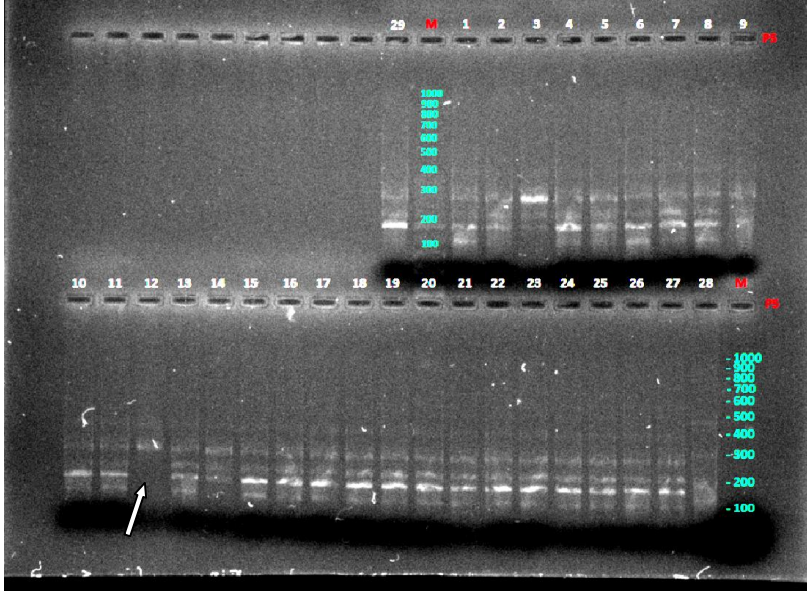
Şekil 4.1. PM1 ve PM3 DNA bant profili

PM2 ve PM4 (Primer 2 ve Primer 4): PM2 ve PM4 primerleri ile yapılan RAPD-PCR sonucu elde edilen DNA band desenlerine bakıldığında PM2 primeri toplam 3 bant oluşturmuştur. 11 bireyde hiç bant oluşmamıştır. PM2 primeri çalışmış ancak bant oluşturan bireylerde bant sırası farklılığı görülmediğinden polimorfizm göstermemiştir. PM4 primeri toplam 3 bant oluşturmuştur ve 4 ve 17 nolu 2 adet bireyde bant oluşturmamıştır. 12 nolu bireyde (S-26-45) polimorfik bant sayısı 1 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PM2 ve PM4 DNA bant profilleri. Ok bant oluşturmayan bireyleri göstermektedir.

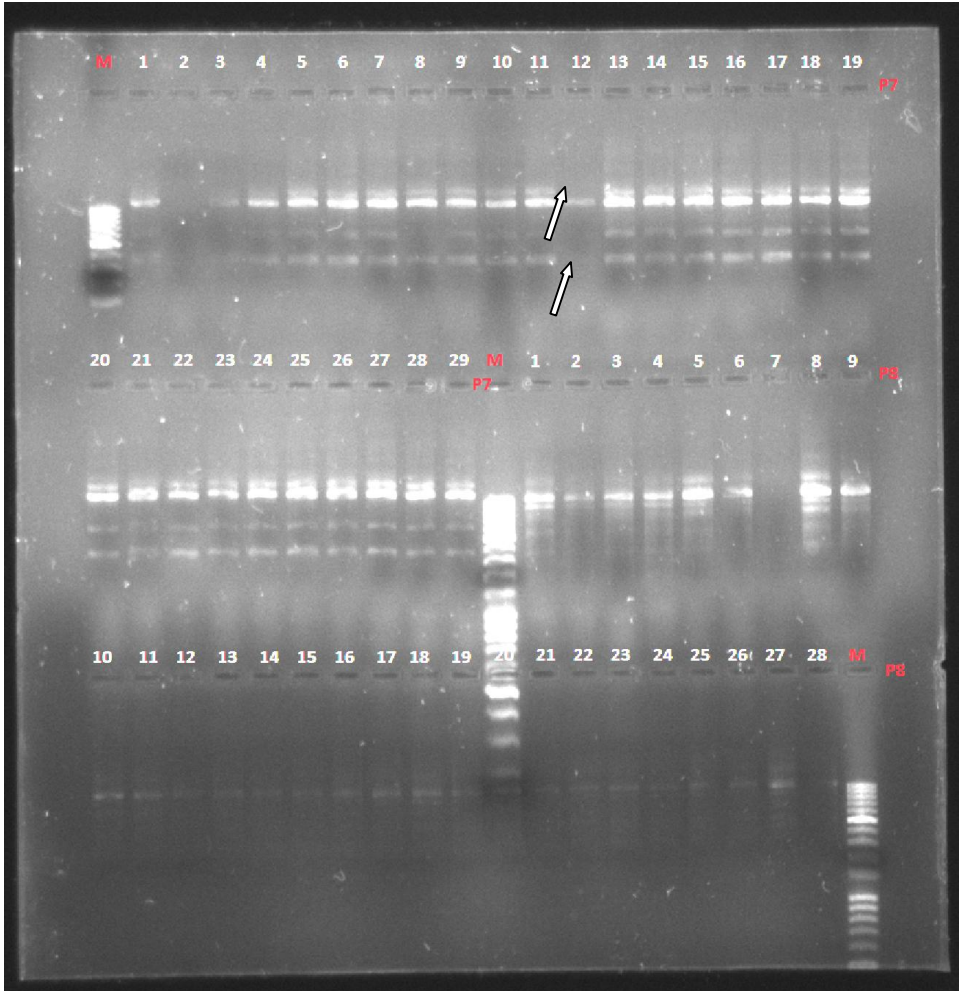
PM5 (Primer 5): PM5 primerine bakıldığında toplam bant sayısı 4'tür. Diğer bireylerde 4 adet bant bulunurken 12 nolu bireyde (S-26-45) 1 adet bant bulundurmıştır ve polimorfizm göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PM5 primeri DNA bant profili. Ok polimorfik bireyi göstermektedir.

PM6 (Primer 6): Primer 6 çalışmamıştır.

PM7 ve PM8 (Primer 7 ve Primer 8): PM7 primerinde toplam bant sayısı 3 bulunmuş ve 1 bireyde hiç bant oluşmamıştır. 12 nolu bireyde (S-26-45) 2 adet polimorfik bant bulunmuştur (Şekil 4.4). PM8 primerinde toplam bant sayısı 1'dir ve 2 bireyde hiç bant oluşmamıştır. Polimorfizm göstermemiştir.



Şekil 4.4. PM7 ve PM8 DNA bant profili. Oklar polimorfik bireyi göstermektedir.

PM9 (Primer 9): Primer 9 çalışmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüksek plastik tünel şartlarında 4 farklı saksı harç ortamına (kontrol, mikoriza, solucan gübresi, mikoriza+solucan gübresi) dikilen eşit boyda ve farklı çaplardaki üç yapraklı portakal anacının bu ortamlardaki boy ve gövde çap gelişimi incelenmiştir. Aralarında belirgin fark gözlenmemekle beraber boy bakımından kontrol grubu yüksek bulunurken, gövde çapı açısından mikorizalı grup öne çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada, mikoriza ve fosfor gübresinin uygulandığı turunc anacında bitki boyunun azaldığı, mikorizasız fosfor gübre uygulamasında bitki boyunun arttığı gözlenmiştir. Turunçgil anaçlarının seleksiyonu ya da bahçe tarımı çok yıllık bitkilerin özellikle de turunçgil fidanlarının köklerine dikim sırasında uygulanırsa mikoriza inokulumu hem daha az gübrele uygulamamızı hem de bitkinin yaşamı süresince mikoriza ile ilişkisi sayesinde çevre faktörlerine karşı daha dayanıklı olacağı tespit edilmiştir (Ortakçı 1999).

Üç yapraklı portakal anacı üzerine 0, 15, 30, 45, 60 Gy dozlarına tabi tutulmuş Nagami aşısı kalemlerinden alınan gözlerin T göz aşısı şeklinde aşılmasında aşısı tutma oranı düşük olmuştur. Tutma oranını etkileyen nedenlerin; yüksek plastik tünel şartlarında büyüme ve gelişme için gerekli yeterli ortamın (sıcaklık ve nemin) sağlanamaması, Nagami kamkatı için ideal anacın üç yapraklı portakal olmaması, asimilat maddelerinin yeterince köke ulaşmaması sonucu anacın zayıf ve cılız kalması olduğu düşünülebilir.

Kaynak araştırması sonucunda Nagami kamkatı çeşidinde uygulanan, farklı gama ışını dozlarının anaç ve aşılı fidan gelişimi üzerine etkilerinin belirlendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmıştır. Fidanın morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla aşısı tutma oranı, aşısı sürgünü boyu, gövde çapı, yaprak sayısı, yaprak klorofil miktarı, meyve çapı, meyve sayısı incelenmiştir.

Nagami kamkatının gama dozlarına verdiği tepkideki aşısı tutma oranı %43.8 (15 Gy) ile %18.8 (60 Gy) arasında değişmiş ve dozlar arasında önemli morfolojik farklılık görülmemiştir.

Yaprak klorofil miktarı hiç gama ışını uygulanmayanlarda daha yüksek bulunmuştur. Ling vd. (2008)'nin araştırmasında, 'Washington Navel'in tohumlarına 0, 10, 20, 30, 40, 50 Gy dozlarında ⁶⁰Co gama ışını uygulanmış ve hiç uygulama yapılmayan bitkilerde klorofil miktarı daha yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada elde edilen bulgular RAPD-PCR tekniğinin mutant bireylerin ayırımında başarılı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca daha fazla primer kullanılması halinde, daha yüksek oranda polimorfizm elde edilebilecektir.

RAPD analizlerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, mutant adayı bireylerde, RAPD polimorfizminin düşük düzeyde ortaya çıkmasının aşağıdaki nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- Mutasyon genom içerisinde oldukça küçük bir alanda meydana gelmiş olabilir (nokta mutasyonu).

- Belirli morfolojik özelliği kodlayan gen bölgesinde amplifiye edilen alan oldukça küçük olabilir.

Bu çalışma ile ^{60}Co gama ışını uygulanan Nagami kamkatının aşî gözlerinden elde edilen 12 nolu bireyin (S-26-45) diğêr bireylerden farklı olduğu RAPD primerleri ile belirlenmiştir. Gelecekte ^{60}Co gama ışını ile yapılacak çalışmalarla Nagami kamkatı meyvesindeki tohumların de yok edilebilmesi veya en aza indirilmesi üzerinde çalışmalara devam edilebilir. Ayrıca aşî gözleri 60 Gy dozunda hayatta kalabiliyorsa daha yüksek dozlarda da hayatta kalabilme ihtimalinin değerlendirilmesine olanak sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Ahmad W., Farooqi W. A., Sattar A. 1992. Effect of gamma irradiation on the morphology of Kinnow seedlings. **Proc. 1st Int. Sym. Citriculture Pakistan** 1:163-168.
- Arslan R., Aydın A., Ortaş İ. 2003. Üç farklı turunçgil anacında farklı mikoriza türlerinin aşılmasının çögür gelişimine etkileri. T.C. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı TAGEM, Sonuç Raporu.22 s.
- Alós E., Roca M., Iglesias D. J., Minguez-Mosquera M. I., Damasceno C. M. B., Thannhauser T. W., Rose J. K. C., Talón M., Cercós M. 2008. An evaluation of the basis and consequences of a stay-green mutation in the *navel negra* citrus mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. **Plant Physiology** 147:1300-1315.
- Başer İ., Bilgin O., Korkut K. Z., Balkan A. 2007. Makarnalık buğdayda mutasyon ıslahı ile bazı kantitatif karakterlerin geliştirilmesi. **Tarım Bilimleri Dergisi** 13(4):346-353.
- Bono R., Cordova de LF., Soler J. 1981. 'Arrufatina', 'Esbal' and 'Guillermina', three clementine mandarin mutations recently discovered in Spain. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 1:94-96.
- Canhoş E. 2003. Turunçgillerde Zamklanma Hastalığı (*Phytophthora citrophthora*)'na Karşı Alternatif Mücadele Yöntemlerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Çiftçi C. Y., Şenay A. 2005. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* Desf.) gama ışını ve EMS'in farklı dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının M2 bitkilerinde etkileri. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi** 14:41-49.
- Çoban H. 2003. Vejetatif bitkilerde üretilen bitkilerde mutasyon ıslahı. **Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi** 17:62-77.
- Davies, F.S., Albrigo, L.G. 2005. Turunçgiller (Çeviren: Z. Dalkılıç), Adnan Menderes Üniversitesi Yayın No: 22, Aydın, 272s.
- Değirmenci D. 2006. Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitolojik ve Moleküler Tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- Deng X. X., Hu C.G., Huo H., Gou W.W., Yi H. 2000. A preliminary study of citrus germplasm conservation and its evaluation by RAPD analysis. **Acta Hort.** 535:99-106.

- Ercişli S. 2012. Meyve Islahı. Ders Notu (basılmamış). Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Erzurum.
- Eryılmaz Z. 2011. Turunçgillerde çeşit geliştirmede mutasyon ıslahının önemi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Semineri, Antalya.
- FAO, 2012. <http://www.fao.org> Erişim Tarihi:01.05.2012
- Göçmen M., Polat İ., Çakır Ç. 2003. Turuncgil türlerine uygun RAPDs markörlerin belirlenmesi. **Derim** 20(1):43-47.
- Göçmez S. 2013. Karasu kekinin vermikompost üretiminde kullanım olanakları. In: **Tema Vakfı Ulusal Vermikültür Çalıştayı**, 16 Nisan, Ankara, pp:34-43.
- Gökçe, M. 2011.Tuzcu turunçgil koleksiyonunda bulunan portakal ve mandarin genotiplerinin morfolojik karakterizasyonu. **Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi** 26(3):29-36.
- Gulsen O., Uzun A., Pala H., Canihos E., Kafa G. 2007. Development of seedless and *Mal Secco* tolerant mutant lemons through budwood irradiation. **Sci. Hort.** 112:184-190.
- Hearn C. J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. **J. Amer. Soc. Hort. Sci** 109(2):270-273.
- Hearn C. J. 1986. Development of seedless grapefruit cultivars through budwood irradiation. **J. Amer. Soc. Hort. Sci** 111(2):304-306.
- Hensz R. A. 1977. Mutation breeding and the development of the 'Star Ruby' grapefruit. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 2:582-585.
- Hocagil M. M. 2012. Kamkat Yetiştiriciliği. (www.alata.gov.tr), Erişim Tarihi: 01.10.2013.
- Iwamasa M., Nishiura M. 1981. Recent citrus mutant selections in Japan. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 1:96-99.
- Kara H. 2013. Organik tarım ve çevre koruma açısından; solucan kültürü ve kompostunun değerlendirilmesi. In: **Tema Vakfı Ulusal Vermikültür Çalıştayı**, 16 Nisan, Ankara, pp:46-70.
- Khalil S. A., Sattar A., Zamir R. 2011. Development of sparse-seeded mutant Kinnow (*Citrus reticulata* Blanco) through budwood irradiation. **Afr. J. Biotechnol.** 10(65):14562-14565.

- Kunter B., Kantaoğlu Y., Baş M., Burak M. 2009. Mutasyon ıslahıyla kirazda yeni tiplerin geliştirilmesi. **X. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi**, (6-9 Ekim 2009) s:321-332, Muğla.
- Latado R. R., Neto A. T., Ando A., Iemma A. F., Junior J. P., Figueiredo J. O., Pio R. M., Machado M. A., Namekata T., Ceravolo L., Rossi A. C. 2001. Mutantes de laranja-‘Pera’ com numero reduzido de sementes, obtidos atraves de mutações induzidas. [Sweet orange ‘Pera’ mutants with low number of seeds obtained through mutation induction] **Rev. Bras. Jaboticabal** 23(2):339-344.
- Ling A. P. K., Chia J. Y., Hussein S., Harun A. R. 2008. Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. **World Applied Sciences Journal** 5(1):12-19.
- Machado M. A., Coletta Filho H. D., Targon M. L. P. N., Pompeu Jr. J. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*C. deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica** 92:321-326.
- Menge J.A. 1982. Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. **Phytopathology** 72(8):1125-1132.
- Menge J.A., Lembright H., Johnson E.L.V. 1977. Utilization of mycorrhizal fungi in citrus nurseries. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 1:129-132.
- Ollitrault P. 1992. Research of seedless ‘Willowleaf’ mandarin (*Citrus deliciosa*) by *in vitro* gamma irradiation of nucellar calli. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 1:113-116.
- Ortakçı, D. 1999. Değişik Mikoriza Türlerinin Turunç Bitkisinde Fosfor ve Çinko Alımına Olan Etkilerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans. Tezi, Adana.
- Ortaş İ., 1998. Toprak ve Bitkide Mikoriza. Workshop, Çukurova Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, 20-22 Mayıs, Adana 61 s.
- Özkan C. F., Ateş T., Kelten M., Taşdemir T., Arpacıoğlu A. 2004. VA Mikoriza Uygulamasının Bazı Turunçgil Anaçlarının Çögür Gelişimine Etkisi. **Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi**, Antalya, pp:163-166.
- Seday Ü., Eti S. 2011. Seleksiyonla Elde Edilen Bazı Klemantin Mandarin Tiplerinde 4 Farklı Tozlayıcıların Meyve Tutumu ve Büyümesi Üzerine Etkisi. **Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi** 25(5):172-179.

- Spiegel-Roy P, Vardi A, Yaniv Y, Fanberstein L, Elhanati A, Carmi N. 2007. 'Ayelet' and 'Galya': new seedless lemon cultivars. **HortScience** 42(7):1723-1724.
- Şimşek Ö. 2009. Bazı Turunçgil Alanlarında Demir (Fe) Klorozuna Dayanıklılıkta Sorumlu Genlerin SSCP Markörleriyle Allelik Çeşitliliğinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Taştekin E., Dalkılıç Z. 2008. Turunç (*Citrus aurantium* L.) ve kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.) çöğürlerinde mikoriza ve fosfor uygulamasının fidan gelişimi üzerine etkileri. **ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi** 5(1):61-73.
- Uzun A., Gulsen O., Kafa G., Seday, U. 2008. 'Alata', 'Gulsen', and 'Uzun' seedless lemons and 'Eylul' early-maturing lemon. **HortScience** 43(6):1920-1921.
- Vardi A., Levin I., Carmi N. 2008. Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 133(1):117-126.
- Varol İ. 2007. Bazı Turunçgil Türlerinde Embriyogenik Kallusların *In Vitro* Muhafazası ve Genetik Kararlılıklarının RAPD Markırları ile Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Yeşiloğlu T., Tuzcu Ö., Onus N., Şeker M., Yıldırım B., Göksel Ç., Açıkalın E. 2002. Turunçgil Cins Tür ve Akrabalarının RAPD Markerleriyle Tanılanması. TARP-2010 nolu TÜBİTAK Projesi Sonuç Raporu (Yayınlanmamış), Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Cennet KARA
Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİR 01.06.1986

EĞİTİM DURUMU

Önlisans : Fırat Üniversitesi S. Demirel Keban Meslek
Yüksekokulu-Gıda Teknolojisi
Lisans Öğrenimi : Atatürk Üniversitesi-Ziraat Mühendisliği
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi-Fen Bilimleri Enst.
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Ödemiş Euro Gıda A.Ş. Staj (2007)
Emre Fidancılık Ödemiş/İzmir (2012-2014)
Kiraz Belediyesi Kiraz/İzmir (2014-)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : cennetkara@hotmail.com
Tarih : 05.12.2014