ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aygül TURUNÇ

KLEMANTİN MANDARİNİNDE (*Citrus clementina Blanco*) SSR MARKÖRLERİ İLE GENETİK HARİTALAMA

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLEMANTİN MANDARİNİNDE *(Citrus clementina blanco)* SSR MARKÖRLERİ İLE GENETİK HARİTALAMA

Aygül TURUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez …/…/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

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

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: ZF2009YL68) ve TÜBİTAK (Proje No: 1080568) Tarafından Desteklenmiştir.

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLEMANTİN MANDARİNİNDE (*Citrus clementina Blanco*) SSR MARKÖRLERİ İLE GENETİK HARİTALAMA

Aygül TURUNÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç.Dr. Yıldız AKA-KAÇAR
Yıl : 2010, Sayfa: 91
Jüri : Doç.Dr. Yıldız AKA-KAÇAR
: Prof.Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Doç.Dr. Yeşim YALÇIN-MENDİ

Klemantin mandarininin, turunç (*C. aurantium*) ve mandarinin (*C. delicosa*) tesadüfî bir melezi olduğu ileri sürülmektedir. Kolay soyulabilme özelliği ile Akdeniz ülkelerinde yaygın yetiştirilmektedir. Bu güne kadar çeşitlerin çoğu melezleme olmaksızın somatik varyasyon veya mutasyon yoluyla oluşmuştur.

Tez kapsamında Klemantin mandarininde genetik bağlantı haritasının oluşturulması amacıyla *C. maxima* ve *C. clementina* populasyonu kullanılmıştır. Chandler pummelo x Clemenules melezlemesinden elde edilen 190 melez birey 46 SSR mörkörü kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu çalışma uluslararası bir projenin parçası niteliğindedir. İki Fransız kuruluşu (CIRAD ve INRA), Amerika'dan iki grup (UF-CREC ve UCR), İspanya'dan (IVIA), Fas (INRA) ve Türkiye'den Çukurova Üniversitesi bu uluslararası projeye dâhil olmuştur. Projenin ana hedefi Turunçgil Genom Haritasını oluşturmaktır.

Genetik haritanın oluşturulmasında I. aşama analizlerinde, tez kapsamında çalışılan 46 SSR primeri kullanılmış ve 310 cM uzunluğunda elde edilen 9 bağlantı grubunda 26 markör haritalanmıştır. Projeye katılan tüm partnerlerden elde edilen veriler birleştirilerek II. aşama analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda otuz üç primer tez kapsamında çalışılan primerler olmak üzere 247 SSR primeri ile genetik harita oluşturulmuştur. Genetik haritada 247 markör 10 gruba dağılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Turunçgiller, Klemantin mandarini, genetik haritalama, SSR

ABSTRACT

MSc THESIS

REFERENCE GENETIC MAP OF CLEMENTINE (*Citrus clementina Blanco*) BY USING SSR MARKERS

Aygül TURUNÇ

DEPARTMENT OF BIOTECNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof. Yıldız AKA-KAÇAR
Year : 2010, Pages: 91
Jury : Assoc. Prof. Yıldız AKA-KAÇAR
: Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU
: Assoc. Prof. Yeşim YALÇIN-MENDİ

C. *clementina* is a presumed hybrid between *C. aurantium* (Sour orange) and *C. deliciosa* (mandarin). All existing cultivars of *C. clementina* arose from this ancestral hybrid by mutation or somatic variation without sexual recombination. It is the main variety of small easy peeler citrus cultivated in the Mediterranean Basin.

Inter-specific population between *C. maxima* and *C. clementina* were used to obtain Clemantine linkage map in this thesis. 190 hybrids of Chandler pummelo x Clemenules were genotyped with 46 SSR markers. This research is a part of global collaborative project. An international collaboration was established between two French organizations (CIRAD, INRA), two groups from United States of America (UF-CREC, UCR), one Spanish institute (IVIA), INRA Morrocco and Cukurova University from Turkey. The main goal of the project is to establish the reference whole Citrus genome sequence.

26 markers were successfully mapped from 46 primers in the 9 clementina linkage groups with 310 cM map size in the first part of the analysis. The data obtained from all partners were combined with our results coming from this thesis for the second part of the analysis. A genetic map constructed with 247 SSR primers coming from other partners of the project included 33 primers from the thesis. The map contains 247 markers distributed to the ten linkage groups.

Key Words: Citrus, *Clementine*, genetic mapping, SSR

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana her türlü durumda desteğini, bilgisini ve deneyimlerini tüm sevgisiyle paylaşmaktan kaçınmayan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Yıldız Aka KAÇAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bölümün tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU ve Biyoteknoloji konusunda tecrübelerinden yararlandığım Doç.Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ hocalarıma teşekkür ederim.

Yoğun bir çalışma temposu içerisinde olmalarına rağmen büyük bir fedakârlıkla, bana çalışmalarımda yardımcı olan ve desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Özhan ŞİMŞEK' e, Biyolog Melda BONCUK' a, Biyolog Fatma ASLAN' a, Ziraat Yüksek Mühendisi İlkay ŞEN' e ve Biyolog Aylin TAMAM' a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tez çalışmaları esnasında maddi desteklerinden ötürü Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: ZF2009YL68) ve TÜBİTAK' a (Proje no: 1080568) içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her durumda desteklerini gördüğüm değerli Ailem**'** e göstermiş oldukları emek, sabır ve ilgilerinden ötürü sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ve son olarak da hayatımın anlamlarından biri olan ve hangi durumda olursa olsun her daim desteğini benden esirgemeyen sevgili nişanlım Seyhan Dayan' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
1.1.Moleküler Markörler. 3
1.2.Genetik Harita Oluşturma 6
1.2.1. Haritalama Populasyonları 8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
2.1. Turunçgillerde Genetik Haritalama Üzerine Yapılan Çalışmalar 11
2.2. Diğer Bazı Bitki Türlerinde Yapılan Genetik Haritalama Çalışmaları 18
3. MATERYAL ve METOD 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Bitkisel Materyal 27
3.2. Metod 29
3.2.1. DNA İzolasyonu 29
3.2.2. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması 29
3.2.3. DNA İzolasyon Aşamları 30
3.2.4. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi 31
3.2.5. Mikrosatellit (SSR) Analizleri PCR Koşulları 32
3.2.5.1. Mikrosatellit Elektroforez Koşulları 36
3.2.5.2. LiCor İçin Poliakrilamid Jel Hazırlığı 37
3.2.5.3. LiCor Elektroforez Koşulları 37
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi 38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 41
4.1. DNA İzolasyonuna Ait Bulgular 41

4.2. Çalışmada Kullanılan SSR Primerlerine Ait Bulgular 50
4.3. Genom Haritalama Bulguları……...55
4.3.1.Genetik Haritalama I. aşama Bulguları……..……....61
4.3.2.Genetik Haritalama II. aşama Bulguları…….……...…63
4.3.2.1.Klemantin Mandarininde Oluşturulan Genetik Bağlantı Grupları…...63
4.3.2.1.(1) Klemantin Mandarinin 1. Bağlantı Grubu.Bulguları…….....65
4.3.2.1.(2). Klemantin Mandarinin 2. Bağlantı Grubu Bulguları…..……...66
4.3.2.1.(3). Klemantin Mandarinin 3. Bağlantı Grubu Bulguları…….....67
4.3.2.1.(4). Klemantin Mandarinin 4. Bağlantı Grubu Bulguları…..…….....67
4.3.2.1.(5). Klemantin Mandarinin 5. Bağlantı Grubu Bulguları…… ……68
4.3.2.1.(6). Klemantin Mandarinin 6.Bağlantı Grubu Bulguları…….....69
4.3.2.1.(7). Klemantin Mandarinin 7. Bağlantı Grubu Bulguları……..70
4.3.2.1.(8). Klemantin Mandarinin 8. Bağlantı Grubu Bulguları……..71
4.3.2.1.(9). Klemantin Mandarinin 9. Bağlantı Grubu Bulguları……..72
4.3.2.1.(10) Klemantin Mandarinin 10. Bağlantı Grubu Bulguları…….....73
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER……..……...77
KAYNAKLAR……...81
ÖZGEÇMİŞ 91

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. Turunçgillerle İlgili Yapılan Genetik Harita Çalışmaları…….....17
Çizelge 3.1. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği …….……..…….....30
Çizelge 3.2. SSR Analizleri PCR Bileşenleri ve Miktarları……..…….....32
Çizelge 3.3. SSR Primerlerine Ait Bilgiler ……...…….....34
Çizelge 3.4. CP Populasyonunda Beklenen Açılımlar ……..…….....39
Çizelge 4.1. İzole Edilen DNA'lara Ait Spektrofotometre Sonuçları …….....41
Çizelge 4.2. Ebeveynlerin SSR Primerlerine Göre Segregasyonu ……50
Çizelge 4.3. Ebeveynlerin Allel Büyüklükleri……51
Çizelge 4.4. $\chi 2$ Analizlerinin Sonuçları……...56
Çizelge 4.5. "nnxnp" Allelleri İçeren Lokuslar……..57
Çizelge 4.6. "llxlm" Allelleri İçeren Lokuslar……58
Çizelge 4.7. "efxeg" Allelleri İçeren Lokuslar……...……59
Çizelge 4.8. "abxcd" Allelleri İçeren Lokuslar…….....60
Çizelge 4.9. "hkxhk" Allelleri İçeren Lokuslar……..61
Çizelge 4.10. Genetik Haritaya Ait Bilgiler…….....64

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Genetik Haritalama Çalışmasının Aşamaları……7
Şekil 3.1. Clemenules…….…….....27
Şekil 3.2. Chandler şadok (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.)…….……...28
Şekil 3.3. DNA İzolasyonu Aşamaları……...…….....31
Şekil 3.4. Thermal Cycler…….…….....33
Şekil 3.5. LiCor Elektroforez Hazırlık Aşamaları…….…….....38
Şekil 4.1. NB-GT03 Primerinin Görüntüsü ……..…...……..……...54
Şekil 4.2 CF-CA05 Primerinin Görütüsü ……...…….54
Şekil 4.3. NB-CAG01 Primerinin Görüntüsü…….…….……..54
Şekil 4.4. Cont.5628-840 Primerinin Görüntüsü……...54
Şekil 4.5. Ci03D12a Primerinin Görüntüsü ……..55
Şekil 4.6. Klemantin Mandarinin Genetik Haritasının I.Aşama Analizleri Sonucunda Elde Edilen Bağlantı Grupları……...……61
Şekil 4.7. Klemantin mandarinin 1. Bağlantı Grubu. ……..…….....65
Şekil 4.8. Klemantin mandarinin 2. bağlantı Grubu……..……..…….....66
Şekil 4.9. Klemantin mandarinin 3. bağlantı Grubu……..……67
Şekil 4.10. Klemantin mandarinin 4. bağlantı Grubu…….…….....67
Şekil 4.11. Klemantin mandarinin 5. bağlantı Grubu…….……68
Şekil 4.12. Klemantin mandarinin 6. bağlantı Grubu…….……69
Şekil 4.13. Klemantin mandarinin 7. bağlantı Grubu…….……70
Şekil 4.14. Klemantin mandarinin 8. bağlantı Grubu…….…….....71
Şekil 4.15. Klemantin mandarinin 9. bağlantı Grubu…….……72
Şekil 4.16. Klemantin mandarinin 10. bağlantı Grubu…….……..73

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP : Amplified Fragment Lenght Polymorphism
BAC : Bacterial Artificial Cchromosome
BC_1 : Backcross population
bp : Base pair
BSA : Bulked Segregant Analysis
CAPS : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CP : Cross pollinators
CTAB : Centyltrimeyhtlaminiumbromide
CTV : Citrus Tristeza Virüs
cM : Santimorgan
dk : Dakika
DIBA : Dot Immunobinding Assay
DNA : Deoxyribonucleic acid
EDTA : Ethilenediaminetetraaceticasit
gr : Gram
INDEL: Insertion/Deletion
IRAP : Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms
ISSR : Inter-Simple Sequence Repeat
mg : Miligram
ml : Mililitre
µl : Mikrolitre
ng : Nanogram
PCR : Polymerase Chain Reaction
POGP : Peroxidase Gene Poliymorphism
RAPD : Randomly Amplified Polimorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Lenght Polymorphism
RGA : Resistant Gene Analog
RILs : Rekombinant Inbred Lines
RGA : Resistance Gene Analogs

SSR	: Simple Sequence Repeat
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Regions
SNP	: Single Nucleotid Polymorphism
Taq	: *Thermus aquaticus*
TAE	: Tris (acetete) EDTA (buffer)
TBE	: Tris (borate) EDTA (buffer)
TE	: Tris EDTA (buffer)
TRAP	: Target Region Amplification Polymorphism
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
%	: Yüzde
UV	: Ultra Violet

1.GİRİŞ

Turunçgillerin birinci derecede anavatanı Çin kıyıları, Güneydoğu Çin ile Çin'in güney kıyıları ve Sarı ırmak vadisi içleridir. İkinci derecede anavatanı ise özellikle Himalayaların güney etekleri, Endonezya, Avustralya'nın kuzeyi, Yeni Gine, Timor Adası, Filipinler, Japonya ve Tayvan' dır (Tuzcu, 2002).

Bugüne kadar geçen binlerce yıllık süre içerisinde turunçgil türlerinde seleksiyon, doğal hibritleme ve doğal mutasyonlara bağlı olarak yeni turunçgil tür ve çeşitleri ortaya çıkmıştır (Göksel, 1999). Turunçgil grubunun sahip olduğu tür ve çeşit zenginliği, meyvelerinin olgunlaşması ve olgunlaşan meyvelerin ağaç üzerinde bekletilebilmesi turunçgillerin önemini arttırmaktadır. Turunçgiller, yüksek oranda C vitamini içermesi ile stratejik ürün grupları arasında değerlendirilip yetiştirilmektedir. Aynı zamanda insan beslenmesindeki önemi, kendine has renk ve kokusu, kozmetik sanayi hammaddeleri arasında yer alması dünya pazarlarında turunçgil ihtiyacını arttırmıştır (Karahocagil, 2003).

Turunçgil yetiştiriciliğinde dünyada en büyük üretici ülke Çin olup, onu sırasıyla Brezilya, ABD, Meksika, İspanya ve Hindistan izlemektedir (FAO, 2009). Türkiye'de ise en çok turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlar Akdeniz Bölgesi'nde Adana, Mersin, Hatay ve Antalya, Ege Bölgesi'nde İzmir, Muğla ve Aydın illeri ve çok az miktarda Doğu Karadeniz bölgesidir (Yeşiloğlu, 2009).

Uzun yıllar boyunca turunçgil yetiştiriciliğinin yapılması, turunçgillerde göz mutasyonlarının oluşması, poliembriyoni, turunçgil ve akrabaları arasında melezlemelerin olması nedeniyle turunçgil taksonomisi karmaşık bir yapı göstermektedir (Nicolosi ve ark., 2000; Novelli ve ark., 2004).

Turunçgillerin genom bilgileri incelendiğinde, genetik haritalama için uygun bir tür olduğu görülmektedir. Diğer bitki türleri ile karşılaştırıldığında nispeten küçük bir genoma sahiptir (1500-1700 cM) (Jarrell ve ark., 1992). Diploid bir genoma sahip olan turunçgillerin 9 adet kromozomu vardır. Bugüne kadar turunçgillerde, moleküler ve biyokimyasal markörler kullanılarak genetik haritalar yapılmıştır.

Turunçgiller dünya çapında büyük öneme sahip olmalarına rağmen, moleküler genetik çalışmalardan yeterince pay alamamıştır (Gülşen ve ark., 2006).

Turunçgillerde geleneksel ıslah yöntemleriyle çalışıldığında, yüksek oranda görülen apomiksis, uzun süren gençlik kısırlığı ve yüksek oranda görülen heterozigotluk gibi nedenlerden dolayı çok ciddi problemler ortaya çıkmaktadır (Soost ve Roose, 1996). Bu durumda turunçgillerle çalışmak için geleneksel ıslah metotları dışındaki yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Moleküler biyolojinin gelişmesiyle geliştirilen moleküler teknikler ile geleneksel ıslah metotlarında ortaya çıkabilecek olası sorunlara alternatif çözümler sunulabilecektir. Moleküler markörler, çok hızlı bir şekilde istenen ya da istenmeyen özellikleri tanıyıp değiştirmemize yardımcı olabilir (Richmond ve Somerville, 2001).

Moleküler markör teknolojisinin gelişmesi ve birçok markör lokusunun belirlenmesi genetik haritalamaya olan ilgiyi arttırmıştır (Yaşa, 2005). Turunçgillerde bu güne kadar daha çok moleküler ve biyokimyasal markörler kullanılarak genetik haritalar oluşturulmuştur. İlk genetik haritalama çalışmasını Torres ve ark., (1985) *Citrus* ve *Poncirus*'da izoenzim markörlerini kullanarak oluşturmuşlardır. Daha sonra RFLP ve izoenzim markörleri kullanılarak 11 bağlantı grubu içeren ilk genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur (Durham ve ark.,1992; Liou ve ark., 1996). Diğer bir genetik harita izoenzim ve RFLP markörleri kullanılarak 'Sacaton' sitrumelo (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (L.) Raf.) ve 'Troyer' sitranjı [*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.)] cinsler arası hibritler kullanılarak oluşturulmuştur (Jarrell ve ark., 1992).

Turunçgillerde bugüne kadar yapılan genetik haritalama çalışmaları, çeşitli stres koşullarında yetiştiriciliğe izin verebilen bazı anaç özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır; apomiksis (Garcia ve ark., 1999 ve 2000), tuza dayanıklılık (Tozlu ve ark., 1999a, b) ve tristeza virüsüne dayanıklılık (Roose, 2000) gibi çalışmalar yapılmıştır. Anaç özellikleri ile ilgili mevcut genetik haritalar Roose (2000) tarafından özetlenmiştir. Dalkılıç (1999), turunçgillerde "Alternaria" hastalığı ve "Phytopthora" hastalığına dayanıklılık mekanizmalarını araştırmış ve "Alternaria" hastalığına dayanıklılığın tek resesif gen tarafından kontrol edildiğini bulmuştur. Çalışmanın sonucunda en yakın markörün, bu hastalığı kontrol eden gene uzaklığı 15 cM' den fazla mesafede olduğu bildirilmiştir (Gülşen ve ark., 2006).

1.1. Moleküler Markörler

Genomdaki herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası olarak tanımlanan moleküler markörler birçok alanda kullanılabilmektedir. Bunlar arasında; genetik varyasyonun araştırılması, türlerin taksonomik tanımlamasının yapılması, filogenetik akrabalıkların bulunması, genetik haritalama ve markörler yardımıyla erken seleksiyon çalışmaları sayılabilir. Ayrıca genom analizlerinde moleküler markörlerin kullanımı ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Moleküler markörler, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ebeveynlerin ortaya konulması, farklı turunçgil türleri arasındaki filogenetik ilişkilerin saptanma çalışmaları için önemli bir araçtır (Barkley ve ark., 2006). Farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkan moleküler markörler, hibridizasyona ve PCR'a dayalı olmak üzere ikiye ayrılır. Hibridizasyona dayalı olan moleküler markör: RFLP, PCR'a dayalı moleküler markörler arasında RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA), SCAR (sequence-characterized amplified regions), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) gibi markörler bulunmaktadır.

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

RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA): PCR (Polymerase Chain Reaction)'ın keşfi ile DNA polimorfizmini araştıran yeni markör sistemleri ortaya koyulmuştur. Williams ve ark., (1990) tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği, basit ve kısa oligonükleotid primerler

kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. Amplifikasyon ürünleri, bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduktan sonra gümüş nitrat ya da ethidium bromid boyaması ile bantlar görünür hale gelir. RAPD markörleri, RFLP'nin tersine düşük kalitede ve miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen dominant markör (Corazza-Nunes ve ark., 2002) olmaları nedeni ile yorumlanmasının zor, güvenilirliğinin çok sınırlı ve tekrarlanamaması, dezavantajları arasında yer almaktadır (Lavi ve ark., 1994). RAPD, turunçgil yetiştiriciliğinin tanımlanmasında ve genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır (Deng ve ark, 1995, 1996). Ayrıca RAPD, RFLP ile birlikte kullanılarak Citrus ve akrabaları arasında filogenetik çalışmalar yapılmıştır (Federici ve ark., 1998).

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

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat): RAPD ile maliyeti yaklaşık olarak aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) (Zietjiewicz ve ark., 1994) tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markör bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fang ve Roose, 1997).

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism): PCR tekniğine dayalı olup, DNA'daki açık okuma bölgeleri dediğimiz (ORFs) bölgelerin çoğaltılması esasına dayanır. SRAP primerleri geliştirirken ilk önce çekirdekte CCGG bazlarını kullanarak (ORF) bölgelerindeki eksonlar hedef alınır. Forward primeri 17 nükleotit, Reverse primeri 18 nükleotit uzunluğundadır. Reverse primerleri DNA'nın intron ve promoter bölgelerini, Forward primeri ise DNA'nın ekson bölgelerini amplifiye eder. Forward primerlerinde 5' ucundaki 14, Reverse primerlerinde 15 nükleotit aynıdır, 3' ucuna yakın olan üç nükleotit tesadüfi seçilim sonucu oluşturulmuştur. Primerin başındaki 10 veya 11 nükleotitten sonra gelen dört nükleotit dizini Forward primerinde CCGG dizinine; Reverse primerinde AATT primer dizinine sahiptir (Tamam, 2008).

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

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

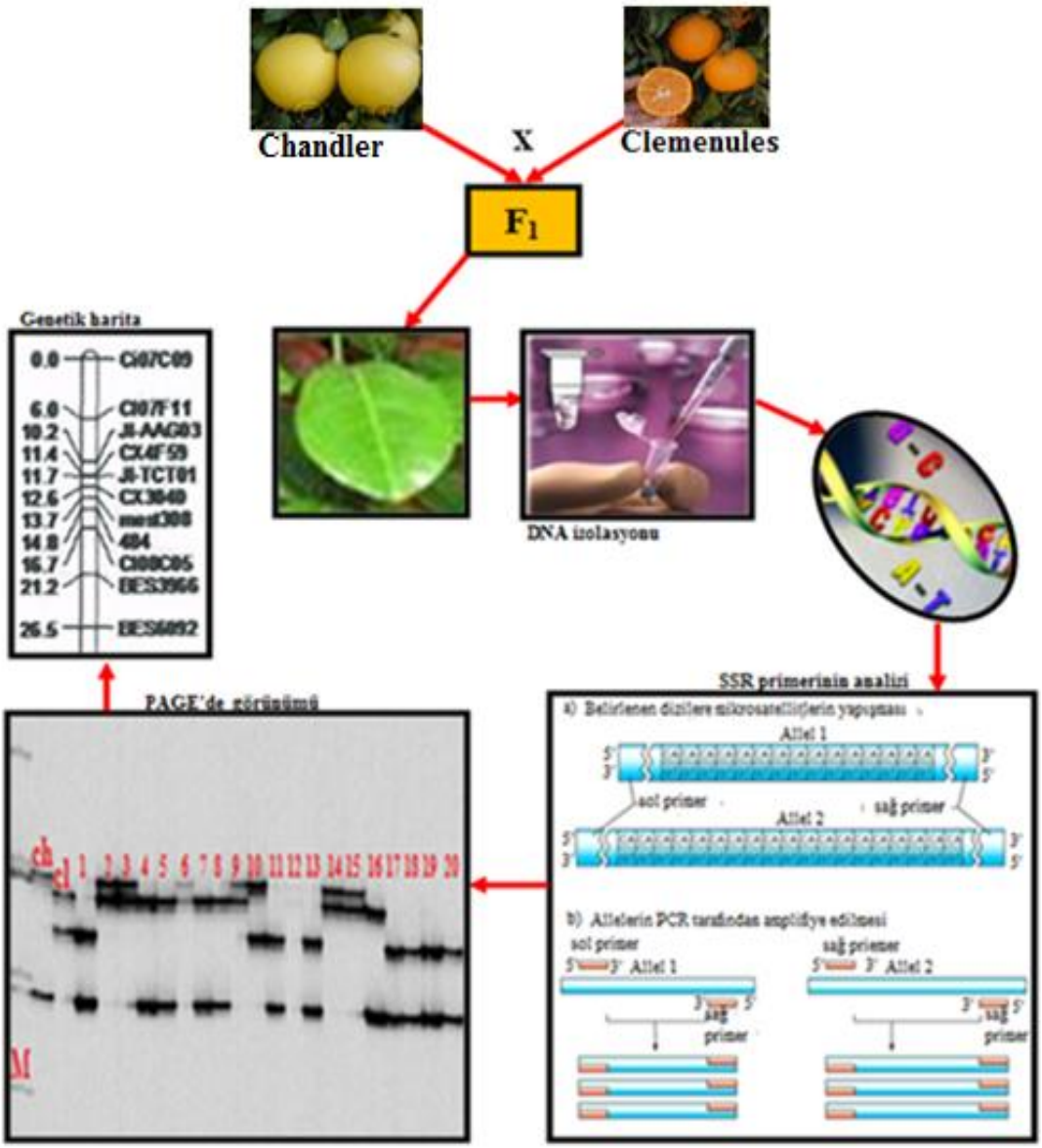
SSR markörlerinin, PCR'a dayalı olması, yüksek yapılı bitkilerin genomlarında çok yaygın olarak bulunmaları, bitki genomlarında yüksek oranda polimorfizm

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

1.2. Genetik Harita Oluşturma

Gen haritası, genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerinin (lokus) tespit edilmesinde kullanılır. Bu gen haritası ile bitkilerin genomu ortaya çıkarılır. Harita oluşturulurken moleküler markörler kullanılmaktadır. Birçok genin ve moleküler markörlerin birbirlerine göre kromozom boyunca diziliş sırasının haritalanması ile bir kromozomun veya tüm genomun haritasını çıkarmak mümkündür (Anonim, 2009). Bu haritalama bitkinin fonksiyonlarının bilinmesi için gereklidir.

Genetik harita oluşturulurken izlenecek yollar sırasıyla şöyledir: Haritalamada kullanılacak en uygun populasyonun seçimi, DNA izolasyonu, izole edilen DNA'ların polimorfik markörler yardımı ile DNA'nın belirli bir bölgesinin PCR'da çoğaltılması, jel elektroforezi yapılarak bantların görüntülenmesi, skorlama ve son olarak da sonuçların analiz edilmesidir. Şekil 1.1' de SSR markörleri kullanılarak genetik haritalama çalışmasının aşamaları sunulmuştur.



Şekil 1.1. Genetik haritalama çalışmasının aşamaları

Oluşturulacak genetik haritanın önemi markör-karakter ilişkisine bağlı olacağından ana-baba olarak kullanılacak hatlar mümkün olduğu kadar karakter açısından birçok farklılık göstermelidir. Bu da bize genetik haritalamanın temelinde rekombinasyon olduğunu göstermektedir. Mayoz I'in profaz evresinde gerçekleşen rekombinasyonda homolog kromozomların eşleşmesiyle, kromozom segmentlerinin karşılıklı (resiprokal) değiş-tokuşu gerçekleşir ve bu olay sonucunda genetik haritalama için gerekli olan polimorfizm meydana gelir. Rekombinasyon frekansı cM ile hesaplanır. cM harita birimi olup 1 cM her 100 kişide 1 rekombinant birey olduğunu gösterir.

Bir araştırıcının genetik haritalama yapabilmesi için araştırıcının en uygun populasyonları seçmesi, bu populasyonları kullanarak ikili rekombinasyon frekanslarını hesaplaması, bağlantı gruplarını belirlemesi, harita uzaklıklarını saptaması ve harita sırasını belirlemesi gerekir. Büyük haritalama populasyonlarının farklı markör sistemleri ile karakterize edilmesinden dolayı harita oluşturma, bilgisayar programlarına bırakılmıştır. Linkage 1 (Suiter *ve ark.*,. 1983), Gmendel (Echt *ve ark.*, 1992), Mapmaker (Lander *ve ark.*,. 1987), MapManager (Manly ve Elliot, 1991) ve JoinMap (Stam, 1993) gibi bilgisayar paket programları haritalamada genetik bilginin analizinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir.

1.2.1. Haritalama Populasyonları

Başarılı bir haritalama için populasyon seçimi çok önemlidir. Ana-baba olarak kullanılacak hatlar mümkün olduğu kadar karakter açısından birçok farklılık göstermelidir. Haritalamada kullanılan populasyonlar; F_1, F_2, RIL (Rekombinant sürekli kendilenmiş hatlar), BC (Geri Melezleme) ve DH (katlanmış haploidler)' dir (Yaşa, 2005). Haritalamada populasyonunun seçimi, kullanılan markör sistemine bağlıdır. En fazla genetik bilgi tamamen sınıflandırılmış F_2 populasyonu ve ko-dominant markörlerle elde edilebilir. Dominant markörler, rekombinant sürekli kendilenmiş hatlarda (Recombinant Inbred Lines-RIL, genellikle >F8), katlanmış haploidlerde (DH) veya cis fazı halindeki geri melezleme populasyonlarında ko-

dominant markörler kadar bilgi sağlar (Burr ve ark., 1988). Dominant markörlerden elde edilen bilgi, bütün lokusların neredeyse tamamının homozigot olması nedeniyle RIL veya DH' nin kullanılması suretiyle maksimum hale getirilebilir. Bunun temelinde genlerin kromozom üzerindeki durumları yer alır. Genetik haritada genlerin kromozom üzerindeki durumları göz önünde bulundurulur. Genler aynı kromozom üzerindeyse bunlar bağlantılı (link) genlerdir ve genetik çaprazlarda bağlantı (linkaj) gösterirler. Bir çift kromozom üzerinde iki gen cis (*coupling)* ve trans (*repulsion)* olmak üzere iki farklı şekilde düzenlenebilir. Cis durumunda iki resesif allel, bir kromozom üzerinde, dominant alleller ise diğer kromozom üzerinde yer alır (AB//ab). Trans durumu ise alternatif düzeni (bir dominant ve bir resesif allel aynı kromozom üzerinde) anlatır (Ab//aB). Bu ilişki, harita oluştururken dominant markörler kullanıldığında özellikle önemlidir (Öner, 2003).

Geri melezleme (BC) populasyonları, geriye melezlenen (alıcı) ebeveynde bütün lokuslar homozigot, alıcı ile verici (donör) ebeveyn birbirine zıt polimorfik markör allellere sahip ise dominant markörlerin haritalanması için uygundur (Reiter ve ark., 1992).

F_1 populasyonları oluşturularak yapılan genetik haritalama, odunsu bitkilerde normal yaşam döngülerinin çok uzun zaman almasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. F_1 populasyonları, turunçgillerin anaç özelliklerinin haritalanmasında (Cristofani ve ark., 2000; Roose, 2000) ve çamgillerde (*Pinus* sp.) (Kubisiak ve ark., 1995) yaygın olarak kullanılmıştır.

Genetik haritalar ve onları tanımlayan markörler, verim, tohum kalitesi veya hastalıklara dayanıklılık gibi çok çeşitli uygulamalara sahiptir.

Bu araştırma "Klemantin mandarininde (*Citrus clemanetina*) SSR markörleri ile genetik haritalama" konulu 8 ülkenin ve 14 araştırma grubunun yer aldığı uluslararası proje kapsamında olup, bu çalışmada *C. maxima x C.* c*lementina* melez bireylerden elde edilen F_1 populasyonları, SSR markörleri ile amplifiye edilerek mandarin genomunun haritalanması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilecek veriler klemantin mandarininde "referans genetik haritanın" oluşturulması ve belli genlerle markörler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde yardımcı olacaktır. Ortak proje kapsamında elde edilen tüm veriler birleştirilerek tüm genoma ait bilgiler

ortaya koyulacak ve böylece elde edilen bilgiler, mandarin genomunun yanı sıra portakal ve altıntop türlerinin de genomlarının anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgiller bilindiği üzere dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği yapılan en önemli meyve gruplarından bir tanesidir. Turunçgillerde bugüne kadar birçok moleküler çalışma yapılmıştır. Bunların başında turunçgillerin genetik ilişkilerinin tespiti amaçlı moleküler karekterizasyon çalışmaları gelmektedir. Turunçgiller için oluşturulan bazı genetik haritalar da bilinmektedir. Turunçgillerde yapılan genetik haritalama çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

2.1 Turunçgillerde Genetik Haritalama Üzerine Yapılan çalışmalar

Bitkilerin genetik bağlantı haritalarının oluşturulmasında ilk olarak morfolojik markörler kullanılmış daha sonra izoenzimler kullanılarak genetik harita oluşturulmuştur. Moleküler markörlerin geliştirilmesiyle genetik haritalama çalışmalarına bu tür markörlerle devam edilmiştir.

Turunçgillerde ilk genetik bağlantı haritası Torres ve ark. (1985) tarafından izoenzimler kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra RFLP ve izoenzim markörleri kullanılarak turunçgillerin 11 bağlantı grubunu içeren ilk genetik bağlantı haritası yapılmıştır (Durham ve ark., 1992; Liou ve ark., 1996).

Diğer bir genetik harita izoenzim ve RFLP markörleri kullanılarak 'Sacaton' sitrumelo (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (L.) Raf.)'ın ve 'Troyer' sitranj [*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.)] intergenerik hibritler kullanılarak oluşturulmuştur (Jarrell ve ark., 1992).

Cai ve ark. (1994), RAPD ve RFLP markörleri ile *Citrus grandis* (L.) Osb. X [*Citrus grandis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 'nın BC_1 populasyonunu kullanarak 9 bağlantı grubu içeren ve 1192 cM uzunluğa sahip olan kompleks bir bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Bu harita Na^+ ve Cl^- birikimi ile ilgili özelliklerin tanımlanmasında kullanılmıştır (Tozlu ve ark., 1999a, 1999b).

Mikrosatellit markörlerinin geliştirilmesinden sonra Kijas ve ark., (1995) Rangpur laymı (*Citrus limonia* Osb.) ve üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.),

arasındaki melezlemelerden 2 mikrosatellit markörü izole etmiş ve bu markörlerin turunçgil genomunda korunduğunu bildirmişlerdir.

Gmitter ve ark. (1996), Citrusun CTV'ye dirençli gen bölgesinin bağlantı haritasını oluşturmak amacıyla *P.trifoliata* L., ve bu tür ile eşeysel olarak akraba olan *Citrus* türlerini kullanılmışlardır. Çalışmada BSA analizleri, dayanıklılıkla ilişkilendirilmiş RAPD markörü için kullanılmıştır. Harita uzaklığı ve lokus sırasını belirlemek amacıyla MAPMAKER 3.0 ve JOİNMAP 1.3 programları kullanılmıştır. Araştırmacılar, CTV' ye sıkı bir şekilde bağlantı gösteren RAPD markörlerini tanımlamışlardır. Tanımlanan markörlerin, turunçgil ıslahında ve aynı zamanda CTV' nin izolasyonu ile ilgili yapılacak olan genetik çalışmalarda kullanılabileceklerini belirtmişlerdir.

Kijas ve ark. (1997), turunçgil için daha önceden RFLP ve izoenzim markörleri kullanılarak yapılmış olan genetik haritaya, bu çalışma ile ilk kez 7 mikrosatellit markörü ilave etmişlerdir. Yedi mikrosatellit için 14 primer çifti geliştirilip test edilmiştir. Haritalamada, allellerin ayırımı analizinde 9 mikrosatellitin ikisinde beklenen oranların ($P>0.5$) dışında bir segregasyon olduğu görülmüştür. Mikrosatellitlerin turunçgiller için yapılmış olan genetik haritalamaya ilave edilmesi ile bu markörlerin genetik analizler için faydalı olacağını belirtmişlerdir.

Cristofani ve ark. (1999), *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. ve *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.'ın genetik bağlantı haritalarını ve CTV' ye dirençli gen bölgesini haritalamak amacıyla yaptıkları bu çalışmada, pseudo-testcross haritalama yöntemi ve RAPD markörlerini geliştirmişlerdir. *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. ve *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.'ın arasında yapılan çaprazlamada 314 F_1 birey elde edilmiş ve haritanın oluşturulmasında bu F_1 populasyonunun 80 tanesi kullanılmıştır. Bağlantı haritasının oluşturulmasında ve CTV' ye dirençli gen bölgesinin haritalanmasında farklı programlar kullanmıştır: CTV'ye dirençli genin değerlendirilmesinde Western blot, DIBA ve BSA analiz programları kullanmışlardır. cM değerlerinin hesaplanmasında ise MAPMAKER 2.0 programı kullanmışlardır. Toplamda 169 RAPD markörü kullanılmış ve 169 markörün 125'i 18 bağlantı grubunda yer almıştır. 63 markör ile *Citrus sunki*'de 10 bağlantı grubu ve 62 markör ile *Poncirus trifoliata* cv. Rubidoux' ta 8 bağlantı grubu oluşturulmuş, 44 markör (%26.78) diğer

gruplardan ayrım göstermemiştir. Araştırıcılar, toplam uzunluğu 1599.20 cM olan 2 harita oluşturmuşlardır. *Citrus sunki* ve *Poncirus trifoliata* CTV' ye dirençli olduklarından hibritlerinin, herhangi bir tristeza enfeksiyonunu göstermediklerini belirtmişlerdir. Son olarak CTV ile ilişkili bütün markörlerin *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux.'un 1. bağlantı grubunda, yalnızca tek bir gen bölgesinin haritasının oluşturulabildiğini belirtilmişlerdir.

Deng ve ark. (2001), tarafından *Poncirus trifoliata* (Raf.)'da CTV' ye dirençli gen lokusunun haritalanması amacıyla yapılan bu çalışmada Nakon pummelo ve USDA 17-47 [Thong Dee X Pomeroy üç yapraklı] arasında geri melezleme yapılmış ve 678 birey elde etmişlerdir. Bu bireyler, CTV' ye dayanıklı gen lokusunun haritalanmasında ve moleküler markörlerin seçiminde kullanılmıştır. Moleküler markör olarak SCAR ve RAPD kullanılmıştır. Bu çalışmada, haritalamaya dayalı klonlama (MBC) stratejisi kullanılmıştır ki bu yöntemin tek yıllık veya iki yıllık birkaç bitki türünde hastalığa dayanıklılık geninin (R) izolasyonu için başarılı bir şekilde kullanıldığı belirtilmiştir. BAC kütüphaneleri, haritalamaya dayalı CTV' ye karşı, direnç geninin klonlanmasını kolaylaştırmak amacıyla geliştirilmiştir. BAC kütüphanelerinden türetilen üç markörün CTV 'ye yakın veya birlikte bağlantı gösterdiği belirtilmiştir. CTV lokusu BAC'ın sonuna yerleştirilmiş olan genomik bölgeye yerleştirilmiş ve genetik haritalamaya BAC contigleri eklenmiştir. Araştırıcılar RAPD ve SCAR markörleri kullanarak CTV gen bölgesinin iki bağlantı haritasını yapmışlardır. Sonuç olarak haritalamaya dayalı gen klonlamanın çok yıllık odunsu bitkilerde yapılmasının mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Sankar ve ark. (2001), turunçgillerde RFLP, RAPD ve izoenzim markörleri kullanılarak yapmış oldukları genetik haritalama çalışmalarına ISSR moleküler markörleri eklemiş ve bunların değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları bu çalışmada [*Citrus grandis* (L.) Osb.×(*C. grandis*×*Poncirus trifoliata* (L.)Raf.]'ın melezlenmesiyle oluşan 60 birey kullanılmışlardır. ISSR markörleri, SSR primerleri kullanılarak elde edilmiştir. Haritanın oluşturulmasında JoinMap 2.0 programı kullanılmıştır. Araştırıcılar, çalışmanın sonucunda 310 markörle 9 bağlantı grubu içeren 874 cM uzunluğunda bir harita oluşturmuşlardır.

Soğuğa toleranslılıkla ilişkili QTL'leri tanımlamak amacıyla Weber ve ark. (2003) *Citrus grandis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf F_1 populasyonunu kullanarak genetik harita oluşturmuşlardır. Araştırıcılar genetik haritanın oluşturulmasında RAPD, CAPs, SCAR ve STS moleküler markörlerini kullanmışlardır.

Ruiz ve Asins (2003), Ponsirus ve Citrus genomlarını karşılaştırmak amacıyla *C. aurantium* (L.) (A) x *P.trifoliata* (L.) Raf. var. Flyin Dragon (Pa), *C. volkameriana* Ten. (V) *P. trifoliata* (L.) Raf. var. Rubidoux (Pv), ve P. *trifoliata* (L.) Raf. var. Flying Dragon'un kendilenmesi ile elde edilen (Pp), 5 genetik bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Araştırıcılar EST'ler, SSR markörleri, inter re transposon ve IRAP markörleri kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda *C. volkameriana* × *P. trifoliata* familyası ve *C. aurantium* × *P. trifoliata* familyasında *P.trifoliata'* ya göre lokusların daha çok heterezigot olduğunu belirtmişlerdir.

Oliveira ve ark. (2004) , tarafından Citrus' un bağlantı gruplarındaki RAPD markörlerinin bulunduğu yeri ve Mendel oranlarının dışında bir segregasyon gösteren RAPD markörlerinin genetik haritalama üzerinde, bu segregasyonun etkisini ölçmek ve analizini yapmışlardır. *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo ve C. *sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra'dan oluşturulan 94 F_1 populasyonu kullanılmışlardır. Genetik analizler için Oliveira ve ark. (2004) tarafından oluşturulan 'Cravo' mandarininden 53 RAPD markörü ve 'Pêra' portakalından 123 RAPD markörü kullanılmış ve her bir markör X_2 ile analiz edilmiştir ($p < 0.05$ ve $p < 0.01$). Her bir tür için bağlantı gruplarını ve büyüklüğünü içeren, harita uzunluğunu, markörler arasındaki mesafeyi ve bu markörlerin sıralarını içeren bir harita oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda RAPD markörlerinin Mendel ayırım (1:1) oranlarından önemli derecede sapma gösterdiği gözlenmiştir. RAPD markörleri 'Pêra' portakalında % 61 ($p < 0.05$) ve % 48 ($p < 0.01$) sapma gösterirken, 'Cravo' mandarininde, % 26.4 ($p < 0.05$) ve % 15.1 ($p < 0.01$) oranlarında sapma göstermiştir.

Oliveira ve ark. (2007), tarafından Citrus cinsi için yapılan genetik haritalama çalışmaları, izoenzim markörleri (Durham ve ark. 1992), RFLP (Durham ve ark. 1992), RAPD (Gmitter ve ark., 1996), SCAR (Deng ve ark., 1997), SSR (Garcia ve ark., 1999; Ruiz ve Asins 2003), ve RGC **(Ling ve ark., 2000)** markörleri

kullanılarak oluşturulmuştur. Turunçgillerde abiyotik strese karşı dayanıklılık (Tozlu ve ark., 1999a,b) veya biyotik faktörlere karşı dayanıklılık (Gmitter ve ark., 1996; Deng ve ark., 1997; Cristofani ve ark., 1999; Ling ve ark., 2000) gibi çalışmalar yapılmıştır. Citrus' un *Xf (Xylella fastidiosa)*'ye kantitatif dayanıklılık lokusunun tanımlanması amacıyla yapılan bu çalışmada, CVC' ye dayanıklı olduğu bilinen, 'Murcott' tangor ve 'Pera' portakal çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada fAFLP markörü ile 87 BC_1 populasyonu kullanılmış ve her bir çeşit için ayrı bir harita oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda, Murcott' çeşidi için: 65 fAFLP markörü 1:1 Mendel segregasyonu göstermiş, toplam uzunluğu 1651.47 cM olan ve 9 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuş. 'Pera' portakal çeşidi için: 55 fAFLPs markörü 1:1 Mendel segregasyonu göstermiş, toplam uzunluğu 1596.2 cM olan ve 5 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuştur.

Şahin-Çevik ve Moore (2007), Cinsler arası karmaşık {*C. grandis (L.) Osb. x* [*C. paradisi Macf. x P. trifoliata (L.) Raf.]} x {[(C. paradisi Macf. X P. trifoliata (L.) Raf.) x C. reticulata Blanco] x [(C. paradisi Macf. x P. trifoliata (L.) Raf.) x C. sinensis (L.) Osb.]}* melezlemesinden elde edilen bitki populasyonu içerisinden 30 ağaç rastgele seçilmiş ve bitkilerden toplanan yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmışlardır. Kullanılan otuz sekiz farklı random primerlerinin kombinasyonundan toplam 111 rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markörü belirlenmiştir. Bu markörlerle seçilen bitki populasyonunun bağlantı haritası oluşturulmuştur. Bu genetik haritada dokuz farklı bağlantı grubu elde edilmiş. Bu bağlantı grupları 63 RAPD markör içermekte olup, araştırıcıların tahminine göre bu bağlantı grupları turunçgillerin dokuz olan haploid kromozom sayısına denk geldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda oluşturulan genetik haritanın toplam uzunluğu 314,8 cM ve markörler arasındaki ortalama harita mesafesinin 5,07 cM olduğunu belirtmişlerdir.

Lyon ve ark. (2007), portakal ve üç yapraklının SSR markörleri ile genetik haritasının oluşturulması amacıyla yapılan bu çalışmada *C. sinensis* x *P. trifoliata* ya ait 210 birey kullanılmışlardır. Çalışmada kullanılan SSR markörleri EST ve genomik kütüphanelerinden elde edilmiştir. Çalışmada 214 markör skorlanmış ve portakala ait

genetik haritanın 651 cM uzunluğunda olup, 9 bağlantı grubu içerdiğini belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (2008); portakal (*C.sinensis* [L.] Osbeck, Cs) ve *Poncirus* (*P. trifoliata* (L.) Raf., Pt) çeşitlerinin melezlenmesinden elde ettikleri 97 F_1 bireyi ile çalışmışlardır. Üç yüz kırk primer taraması sonucunda 141 polimorfik EST-SSR markörleri saptanmıştır. Bu markörlerin 122'si portakalın ayırımında, 59'u *Poncirus*'ta ve 40 tanesi de her ikisinde gözlenmiştir. Portakalda 113 markörle 11 bağlantı grubu, *Poncirus*'ta 45 markörle 8 bağlantı grubu oluşturulmuştur. Portakal genomu 775.8 cM ve *Poncirus*'un 425.7 cM uzunluğunda olduğu gözlenmiştir.

Gülşen ve ark. (2010), Klemantin mandarinin genetik bağlantı haritasını oluşturmak amacıyla Klemantin mandariniin ve Orlando tangelo arasında melezleme yapmış ve toplamda 164 F_1 populasyonu kullanılmışlardır. SRAP marköründen 385, RAPD marköründen 97, SSR marköründen 95, ISSR marköründen 18, POGP marköründen 12 ve RGA marköründen 2 tane olmak üzere toplamda 609 markör kullanılmıştır. Çalışmada pseudo-testcross stratejisi kullanılarak Klemantin mandarini ve Orlando tangelo için iki ayrı harita oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda Klemantin mandarini için, 858 cM uzunluğunda olan 9 bağlantı grubu içeren ve iki markör arasındaki ortalama uzaklığın 3.5 cM olduğu bir harita oluşturulmuş, Orlando tangelo'da ise 886 cM uzunluğunda olan, 9 bağlantı grubu içeren ve iki markör arasındaki ortalama uzaklığın 3.9 cM olan bir harita oluşturulmuştur.

Turunçgillerle ilgili yapılan bazı haritalama çalışmaları Çizelge 2.1'de sunulmuştur (Roose, 2007).

Çizelge 2.1 Turunçgillerle ilgili yapılan genetik haritalama çalışmaları

Ebeveynler	Toplam markör	Markör tipi	Populasyon büyüklüğü	Harita uzunluğu	Bağlantı grupları	Kaynak
(C. paradisi x P. trifoliata) x *C. sinensis x P. trifoliata*	38	R,I	60	351	10	Jarrell ve ark., 1992
C. grandis x (C. grandis x P.trifoliata)	189	R,R,I	60	1192	9	Cai ve ark., 1994
C.maxima x (C.reshini x P trifoliata)	34.97	I,F,R,S,D	52	6.00,1.500	4,7	Luro ve ark., 1996
C. sunki x P.tirifoliata	63.62	R	80	732.867	5,5	Cristofani ve ark.,1999
(C. paradisi x P. trifoliata) x C. sinensis x P. trifoliata	153	I,F,R,S,D	57	701	14	Roose ve ark., 2000
C. latipes x C.aurantium	92.247	A,R,F	120?	433.964	5,8	Simone ve ark., 1998
C.maxima x (C.maxima x P.trifoliata)	310	I,F,R,S,D	60	874	9	Sankar ve Moore, 2001
C.volkameriana x P. trifoliata	97.73	I,F,R,S,D	80	460.342	5,4	Ruiz ve Asins., 2003
C. reticulata Blanco x C. sinensis	176	R	94	612.1,353.3	12,12	Oliveria ve ark., 2004
C. sinensis x P. trifoliata	340	E	97	775.8, 425.7	11,8	Chen ve ark., 2008
C.reticulata x (C.paradisi x C.reticulata)	609	S,S*,I*, D	164	858,886	9,9	Gülşen ve ark.,2010

I; Isozymes, F; RFLP, R; RAPD, A; AFLP, S; SSR, S*; SRAP; I*;ISSR, D;Diğerleri, E; EST-SSR

2.2. Diğer Bazı Bitki Türlerinde Yapılan Genetik Haritalama Çalışmaları

Genetik haritalama çalışmaları, sağlık ve ekonomik yönden önemli olan turunçgillerin yanı sıra, yaşamımızda önemli yere sahip olan diğer bitki türlerinde de yapılmıştır.

Landry ve ark. (1987), tarafından Marulda genetik harita oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada markör olarak RFLP, izoenzim, ve morfolojik markörler kullanılmışlardır. Oluşturulan harita 404 cM uzunluğunda olup 9 bağlantı grubu içermiştir. Kullanılan markörlerin, 9 bağlantı grubunda dağılım gösterdiğini ve bunun marul genomunun % 20-25'ini temsil edebileceklerini belirtmişlerdir.

Rajapakse ve ark. (1995) ağaç şekli ve formlarından sorumlu genleri belirlemek amacıyla yaptıkları bu çalışmada New Jersey Pillar ve KV 77119 çeşitleri kullanılmışlardır. Bu çeşitlerin melezlenmesi ile F_1 populasyonu oluşturulmuş ve F_1 populasyonunun kendilenmesi ile oluşturulan 71 F_2 populasyonu haritalama için kullanılmıştır. Çalışmada RFLP ve RAPD markörleri kullanılarak ağaç şekli dışında meyve et rengi (*Y*), çiçek şekli (*Sh*), petal sayısı (*Dl*) ve rengi (*w*)'ni kontrol eden genler de araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda 8 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuş ve ayrıca dikine büyümeyi kontrol eden genler ile petal sayısını kontrol eden genlerin I. bağlantı grubu üzerinde 17.6 cM uzaklıkta olduğu belirlenmiştir.

Baird ve ark. (1996), tarafından şeftalide meyve kalitesi ve soğuğa dayanıklılık üzerine haritalama yapmak amacıyla yapılan bu çalışmada, "Sun Crest" ve "Bailey" arasında yapılan melezlemelerden elde edilmiş olan F_1 bireylerinin kendine melezlemesinden oluşturulan 200 F_2 bireyi kullanılmışlardır. Çalışmada şeftali genomik klonlarından elde edilmiş olan RFLP ve cDNA klonları ile RAPD markörlerini içeren 80 markör tanımlanmıştır. Sonuç olarak, Sun Crest x Bailey kombinasyonunda genomik klonlar yerine cDNA kullanıldığında polimorfizmin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (%5).

Dubcovsky ve ark. (1996), buğdayın (*Triticum monococcum* L.**,** 2n=14) genetik haritasını oluşturarak arpanın haritası ile karşılaştırma yapılmışlardır. Buğdayın haritasını oluşturmak amacıyla, ana birey olarak *T. monococcum ssp. monococcum DV92,* baba birey olarak *T. monococcum ssp. aegilopoides G3116*

kullanılmıştır. Haritalamada F_2 populasyonu kullanılmıştır. Araştırıcılar, RFLP, izoenzim, markörlerin, morfolojik lokusların, rRNA' nın ve proteinlerin bulunduğu toplamda 335 markör kullanarak, 7 bağlantı grubundan oluşan ve toplam uzunluğu 1067 cM olan bir harita oluşturmuşlardır.

Frenge ve ark. (1997), cassavanın genetik haritasını oluşturmak amacıyla 132 RFLP, 30 RAPD, 3 mikrosatellit ve 3 izoenzim markörü kullanılmışlardır. Haritalamada TMS 30572 ve CM 2177-2 ebeveynleri arasında yapılan melezleme sonucu oluşan F_1 populasyonu kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 931.6 cM uzunluğuna sahip ve 20 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuş ve bu da cassava genomunun % 60'nı içerdiği belirtilmiştir.

Nozaki ve ark. (1997), RAPD, tarafından izoenzim ve bazı agronomik özellikler kullanılarak Çin lahanasında bağlantı haritası oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada ***Brassica campestris*** L. var. ***pekinensis*** (2n=20) ve ***B. campestris*** L. var. ***japonica*** (2n=20) türleri kullanılmıştır. Haritada F_2 populasyonu kullanılmıştır. Çin lahanasının bağlantı haritası, önceden izoenzim markörü kullanılarak yapılmış olan bağlantı haritası baz alınarak oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda 10 bağlantı grubu oluşturulmuş ve bu bağlantı gruplarında 52 RAPD markörü yer almıştır ve bu markörlerin QTL analizleri sonucunda morfolojik özelliklerden sorumlu genlerle bağlantı gösterdiği belirtilmiştir.

Harushima ve ark. (1998), pirincin yüksek yoğunluğa sahip genetik bağlantı haritasını oluşturulmuşlardır. Araştırıcılar yüksek yoğunluğa sahip haritanın önemli genlerin klonlanmasında, QTL analizlerinin yapılmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada 2275 markör kullanılmıştır. Markörler Nipponbare' nin kallus, kök ve sürgün kütüphanesindeki EST klonlarından temin edilmiştir. Haritalamada ***japonica*** çeşidi olan Nipponbare ve ***indica*** çeşidi olan Kasalath arasında yapılan bir melezleme sonucunda F_1 populasyonu oluşturulmuş ve F_1 populasyonunun kendilenmesiyle oluşturulan F_2 populasyonu kullanılmıştır. Oluşturulan harita 1521.6 cM uzunluğunda olup 12 bağlantı grubu içermektedir. Ayrıca araştırıcılar yüksek yoğunluğa sahip haritanın genomun tümünde, mayoz bölünmede gerçekleşen rekombinasyonun karekterizasyonunun yapılmasına olanak sağladığını belirtmişlerdir.

Joobeur ve ark. (1998), tarafından Badem (cv Texas) ve şeftalinin melezlenmesiyle F_1 populasyonu oluşturulmuş ve F_1 populasyonunun kendilenmesiyle oluşturulan F_2 populasyonu kullanılarak, Prunus' ta genetik haritanın doyurulması amacıyla yapılan bu çalışmada RFLP ve izoenzim markörleri kullanılmışlardır. RFLP markörleri farklı türlerden elde edilen genomik ve cDNA kütüphanelerinden oluşturulmuş ve haritada 235 RFLP makörü ile 11 izoenzim markörü olmak üzere toplamda 246 markör kullanılmıştır. Araştırıcılar 491 cM uzunluğuna sahip olan ve 8 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturmuşlardır.

Maliepaard ve ark. (1998), RFLP, RAPD, izoenzim, AFLP, SCAR ve mikrosatellit markörlerini kullanarak elmada (*Malus pumila Mill.)* genetik haritalama yapmak amacıyla Prima ve Fiesta çeşitlerini kullanılmışlardır. Bu çeşitlerin melezlenmesiyle 152 birey elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda her bir ebeveyn için 17 bağlantı grubu oluşturulmuştur. Araştırıcılar ko-dominant RFLP markörlerinin, yüksek markör yoğunluğuna sahip haritanın ve bazı mikrosatellitleri içeren haritalar için bu haritanın iyi bir referans genetik harita olabileceğini belirtmişlerdir.

Travis ve ark. (1998), tarafından Çam fıstığının *(Pinus edulis* n=12) genetik haritasını oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada markör olarak AFLP markörü kullanılmıştır. Haritalamada ise F_1 populasyonu kullanılmıştır. 78 AFLP primer kombinasyonundan 542 primer elde edilmiş ve bunlardan 164'ü tam bağlantı göstermiş, 33'ü ise Mendel oranlarının dışında segregasyon göstermiştir. Çalışmanın sonucunda 2012 cM uzunluğa sahip olan ve 25 bağlantı grubu içeren bir genetik harita oluşturulmuştur.

Yu ve ark. (2000), fasülyenin daha önceden yapılmış olan moleküler bağlantı haritasına ilk kez SSR markörlerini yerleştirmişlerdir. Ve bu da önceden RFLP ve RAPD markörleri (Freyre, ve ark., 1998) ile yapılmış olan harita baz alınarak yapılmıştır. Toplamda 37 SSR markörü kullanılmış ve BAT93 x EEP558 ebeveynleri ile yapılan tarama sonucunda 16 SSR markörü polimorfizim göstermiştir ve bunlardan 15'i oluşturulan 7 bağlantı grubunda yer almıştır. Populasyon olarak önceden yapılan haritada kullanılan F_7 RIL populasyonu kullanılmıştır. Bu çalışmada ilk kez patojenite ile ilişkili proteini, endokitinaz, protein kinaz gibi önemli enzim ve poteinler tespit edilmiştir.

La Rosa ve ark. (2003), tarafından RFLP, SSR, RAPD ve AFLP markörlerini kullanarak zeytinde ilk genetik haritalamayı oluşturmak amacıyla yapılan bu çalışmada, 'Leccino' ve 'Dolce Agogia' zeytin çeşitleri arasında melezleme yapılarak, 95 F_1 populasyonu oluşturulmuştur. Genetik haritalama yapılırken 'double pseudo test-cross' stratejisi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 'Dolce Agogia' ile 'Leccino'' nın bağlantı gruplarına bakıldığında, 'Dolce Agogia' ebeveyn haritasında 27 bağlantı grubu oluşturulmuş ve 236 markör 27 bağlantı grubunda yer almıştır (93 RAPD, 133 AFLP, 6 RFLP, 4 SSR markör). 'Leccino' ebeveyn haritasında ise, 249 markör bağlantı yapmış olup (110 RAPD, 127 AFLP, 8 RFLP, 3 SSR markör) 22 bağlantı grubu elde edildiği belirtilmiştir.

Graham ve ark. (2004),'nın yaptığı çalışmada kırmızı ahududu'nun (***Rubus idaeus*** subsp. ***ideaus***) 'Glen Moy' çeşidi ile 'Latham' çeşitleri melezlemişler ve 300 birey oluşturulmuştur. Bunlardan 94'ü haritalama populasyonu olarak kullanılmıştır. SSR ve AFLP markörlerinden oluşan ve toplamda 417 markör içeren bir harita oluşturulmuştur. Araştırıcılar haritanın 7 bağlantı grubu içerdiğini ve 465.8 cM genom uzunluğuna sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ahududunun yüksek heterozigot yapıda olması ve gençlik kısırlığı süresinin uzun olmasından dolayı, ahududunun ıslahında karmaşık çoklu genlerden sorumlu olan lokusların tanımlanmasının ayrıca bu çoklu genetik özellikleri kontrol eden tanımlayıcı markörlerin geliştirilmesi ile genetik bağlantı haritalarının oluşturulmasının önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Riaz ve ark. (2004), tarafından SSR markörü kullanılarak *Vitis vinifera* L.' nın bağlantı haritasını yapmak amacıyla, Riesling x Cabernet sauvignon' çeşitleri arasında yapılan melezleme sonucunda 153 F_1 populasyonu oluşturulmuştur. Araştırıcılar 152 SSR markörü kullanarak 20 bağlantı (2n=38) grubu oluşturmuşlardır ve toplam uzunluğu 1728 cM olan bir harita elde etmişlerdir. Haritada iki markör arasındaki uzaklığın ortalama 11 cM olduğunu belirtmişlerdir.

Sargent ve ark. (2004), çilekte bağlantı haritasını oluşturmak amacıyla mikrosatellit, morfolojik ve özel gen markörlerini kullanılmışlardır. Haritada ***F.vesca f. semperflorens*** × ***F.nubicola*** arasında melezlemeyle oluşturulan F_2 populasyonu kullanılmıştır. Toplamda 174 markör kullanılmış ve bunların ebeveynlerle taranması sonucunda 75' i polimorfizim göstermiştir. Bu 75 markörün 17'sinin Mendel

oranlarının dışında bir segregasyon verdiği belirtilmiştir. Araştırıcılar toplam uzunluğu 488 cM olan ve 7 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturmuşlardır.

Song ve ark. (2004), tarafından Soya fasülyesinde ilk genetik bağlantı haritalama çalışmaları daha çok RFLP markörü kullanılarak oluşturulmuş ve bundan dolayı soya fasülyesinde yapılan haritalarda polimorfizm eksikliğinin görüldüğü belirtilmiştir. Bu eksikliği gidermek amacıyla yapılan bu çalışmada 391 SSR markörü kullanılmıştır. Çalışmada 'Minsoy' x 'Noir 1', 'Minsoy' x 'Archer', 'Archer' x'Noir 1', 'Clark' x 'Harosoy', ve A81-356022 xPI468916 olmak üzere 5 haritalama populasyonu kullanılmış ve toplam uzunluğu 2,523.6 cM uzunluğunda olan 5 ayrı harita oluşturulmuştur.

Çalışkan (2005),'nın yaptığı çalışmada, RAPD tekniğini kullanarak 28 bahçe tipi gül, 15 kesme gül ve 4 yabani tür veya çeşidi arasındaki varyasyonu belirlemek amacıyla genetik harita oluşturulmuştur. 19 RAPD primer kombinasyonundan 133 polimorfik bant elde edilmiş ve primer başına polimorfik bant sayısının ortalama bant sayısı 7.0 olduğu belirtilmiş ve buradan yola çıkılarak en yüksek bant sayısı ve polimorfizm oranı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda gül çeşit ve türlerinin genetik tanımlaması yapılmış ve aralarındaki genetik ilişkiler ortaya konmuştur. Çalışmanın sonucunda güllerin yetiştiricilik grupları arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı genetik havuzdan alınmalarına karşın, modern bahçe gülleri ile kesme gül grupları arasında, bu iki grup ile doğada yetişen türler ve eski bahçe gülleri arasında önemli genetik farklılıklar olduğu bulunmuştur. Gruplar içerisinde yer alan genotipler ise, birbirleri ile genetik farklılıklar gösterdikleri belirtilmiştir.

Yaşa (2005), asma (*Vitis vinifera* L.) da önemli vegetatif ve generatif karakterler ile hastalıklara dayanım özelliklerini belirlemek amacıyla genom haritalaması yapmışlardır. Haritalamada, Italia ve Mercan üzüm çeşitlerinin melezlenmesi ile elde edilmiş olan F_1 populasyonu kullanılmıştır (60 F_1 + 2 ebeveyn). F_1 populasyonu için RAPD markörü kullanarak toplam 300 adet primer test edilmiştir. Amplifikasyon ürünleri negatif filmden "var" ya da "yok" diye değerlendirildikten sonra $\chi 2$ testleri yapılmış, bunun sonucunda 1:1 ve 3:1 dağılım gösteren polimorfik lokuslar belirlenmiştir. Haritanın çıkartılması amacıyla Mapmaker/Exp 3.0 paket programı genom haritalaması için ise çift yönlü-yalancı

melezleme tekniği kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 8 (ana) ve 6 (baba) bağlantı grubu içeren genetik bağlantı haritası elde etmiştir. Bu bağlantı gruplarına yerleşen lokusların, incelenen morfolojik ve hastalıklara dayanımın karakterlerle olan bağlantılarını tespit etmek amacıyla regresyon ve varyans analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre $p \leq 0.01$ önem derecesinde iki adet karakterin (çiçeklenme zamanı ve küllemeye dayanım) sırasıyla 1 ve 2 markör lokusu ile bağlantılı oldukları tespit edilmiştir.

Venkateswarlu ve ark. (2006), tarafından RAPD, ISSR ve SSR markörleri kullanarak dut bitkisinde (*Morus* spp.) ilk genetik haritalama yapmak amacıyla 50 F_1 populasyonu kullanılmışlardır. Araştırıcılar, genetik harita için 'double pseudo-testcross' yöntemini kullanmışlar ve her bir ebeveyn için iki ayrı harita oluşturmuşlardır. Her bir ebeveynin haritasında toplamda 94 markör kullanılmıştır. Ana bireyin haritasının uzunluğu 1196.6 cM, baba bireyin ise 1351.7 cM olduğu belirtilmiştir. Ana bireyde 12 bağlantı grubu ve bağlantı grupları üzerindeki markörler arası ortalama uzaklık 15.75 cM, baba bireyde 14 bağlantı ve bağlantı grupları üzerindeki markörler arası ortalama uzaklık 18.78 cM olarak bulunmuştur.

Boyacı (2007), patlıcanda *fusarium* solgunluğuna dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılığın kalıtımını belirlemek amacıyla, *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. melongenae Matuo ve Ishigami araştırmış ve çalışmayı dört bölüm halinde gerçekleştirmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, yerli ve yabancı genotipler ile patlıcana akraba yabani türler test edilmiş ve bunun sonucunda yabani genotiplerin bu hastalığa dayanıklı olduğu, yerli ve yabancı genotipler ile bazı ıslah hatlarının ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İkinci aşamasında ise 15 patlıcan genotipi ile *F. oxysporum* f. sp. melongenae'nın 12 izolatı test edilmiş ve genotip x izolat etkileşimi araştırılmıştır. Üçüncü aşamasında, bulunan dayanıklılık kaynakları içinden, *Solanum melongena* türüne ait dayanıklı genotipler, LS 1934 ve LS 2436 ile duyarlı genotip NSFB-99 arasında resiprokal melezleme yapılmış ve dayanıklılığın kalıtımı araştırılmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise dayanıklı genotip LS 2436 ve duyarlı saf hat NSFB-99 arasında yapılan melezlemelerden elde edilen F_2 ve BC_1 populasyonunda 1200 primerle RAPD kullanılarak genetik haritalama yapılmış,

dayanıklılık genine 2.6 cM uzaklıkta olan H-12 primeri markör olarak tespit edilmiştir.

Alwala ve ark. (2008), tarafından AFLP, SRAP ve TRAP markörleri kullanılarak şeker kamışında genetik haritalama yapmak amacıyla şekerkamışının iki farklı türü olan *Saccharum officinarum* 'La striped' (2n=80) ile *Saccharum spontaneum* 'SES 147B' (2n=64) kullanılmış ve bunların melezlenmesiyle oluşturulan 100 F_1 populasyonu haritalamada kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda *Saccharum officinarum* için 1732 cM uzunluğa sahip olan ve 49 bağlantı grubu içeren bir harita, *S. spontaneum* için ise 1491 cM uzunluğa sahip olan ve 45 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuştur.

Topkaya (2008),'nın bu çalışmasında, domateste erken yanıklık hastalığına dayanıklılık sağlayan genlerin moleküler markörler yardımıyla genetik haritasının ön çalışmalarını yapmıştır. Erken yanıklık hastalığının etmeni olan *Alternaria solani'*ye karşı yedi domates hattının reaksiyonu belirlenmiş ve bunun sonucunda orta derecede dayanıklı NCEBR2 (baba birey) hattı ile orta derecede hassas NC84173 (ana birey) hattı melezlenerek F_1, F_2 ve geriye melez (BC1) bitki populasyonları oluşturulmuştur. Ebeveynler arasındaki polimorfizmi ortaya koymak amacıyla beş adet RGA markörü, 70 adet SSR markörü, 23 adet CAPS/SNP markörü ve 1 adet INDEL markörü kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda, patojenisite testlerinde 150 haritalama populasyonunun fenotipleri ortaya konmuştur.

Varlı (2009), tarafından Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) genomunun haritalanması amacıyla yapılan bu çalışmada, SSR, RAPD, AFLP, ISSR ve morfolojik markörler kullanmıştır. Haritada WA8649041 ve Precoz ebeveynlerin çaprazlanmasıyla elde edilmiş olan 93 adet rekombinant saf hat populasyonu kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, genom haritası 11 bağlantı grubundan oluşmuş olup, toplam harita uzunluğunun 1311.2 cM olduğu ve iki markör arası ortalama uzaklığın 9.64 cM olduğu belirtilmiştir.

Kıyga (2009),'nın Osmanlı x Camarosa çilek melezlerinin morfolojik ve pomolojik karekterizasyonu üzerine yaptığı bu çalışmada, 340 bitki elde edilmiş ve bu bitkiler, her iki yılda da çeşitli yöntemlerle yetiştirilerek olup, morfolojik ve pomolojik özellikleri incelemiştir. İncelenen tüm özellikler bakımından melezler arasında geniş

bir varyasyon olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, ‘Osmanlı’ x ‘Camarosa’ melez populasyonun, haritalama için ideal bir populasyon olduğu belirtilmiştir.

Yıldız (2010), AFLP, SSR, SNP ve SCAR moleküler markörlerini kullanarak havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosenteziyle mor ve sarı renkleri veren P_1 ve Y_2 genlerinin haritalama, çalışmasını yapmıştır. Çalışmada “P1173687 x B493” ve P1173687 x B10138” melezlemeleri yapılmış ve oluşturulan F_2 generasyonundan 72 birey kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda havuçta 9 bağlantı grubu elde edilmiştir. Bağlantı grupları için % 82.7 AFLP, % 13.5 SSR, % 2.6 SNP ve % 0.6 SCAR marköründen olmak üzere toplamda 312 markör kullanılmıştır. Oluşturulan haritanın toplam uzunluğu 2389 cM ve markörler arası mesafenin 7.6 cM olduğu belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Bitkisel Materyal

Klemantin mandarininde, (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. Var. *clemenules*) SSR markörleri ile genetik haritanın oluşturulması amacıyla yapılan bu çalışmada uygun haritalama populasyonu için CIRAD/Fransa'dan temin edilmiş olan Klemantin (*Citrus clementina Hort. Ex Tan. Var. clemenules*) mandarini ve Chandler şadok (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) genotipleri ebeveyn olarak kullanılmış ve bu ebeveynlerden elde edilen 190 F_1 bireyi çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur. Baba birey olarak kullanılan, Clemenules ve ana birey olarak kullanılan Chandler şadok (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.)'a ait resimler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2' de sunulmuştur.



Şekil.3.1 Clemenules (Anonim, 2010a)



Şekil 3.2 Chandler şadok (Anonim, 2010b)

Klemantin: *Citrus aurantium* (L.) Osbeck (Turunç) ve *Citrus delicosa Tenore* (Mandarin) melezi olup ortaya çıkış şekli hakkında çeşitli görüşler vardır. Kolay soyulabilme özelliği ile Akdeniz ülkelerinde yaygın yetiştirilmektedir. Son derece özel bir aromaya sahip olması ile oldukça dikkat çekmektedir. Klemantin mandarini monoembriyonik tohum yapısına sahiptir. Bugüne kadar çeşitlerin çoğu melezleme olmaksızın somatik varyasyon veya mutasyon yoluyla oluşmuştur (Yeşiloğlu, 2009).

Clemenules: "Fina" klemantin mandarininden 1953 yılında mutasyon yoluyla elde edilmiş bir çeşittir. "Clemenules", "Nulesina", "Clementina Reina","Clementina Victoria" ve "Reina y Gorda de Nules" olarak da bilinmektedir. Fina çeşidinden daha büyük ve birkaç gün erkenci bir çeşittir. Çekirdeksiz olup yüksek bir kaliteye sahiptir. Uzun süre bekletilirse puflaşmaya meyilli bir çeşittir. İspanya'da yaygın olarak yetiştirilen bir Klemantin çeşididir (Anonim, 2010a).

Chandler şadok (*Citrus maxima (Burm.) Merr.*): Siamese Pink x Siamese Sweet şadoklarının melezidir. Amerika Kalifornia Üniversitesi (Riverside)'nde 1961 yılında ıslah çalışması sonucunda elde edilmiştir. Chandler şadok baba olarak kullanılan

ebeveyni Siamese pink gibi pembe etlidir, fakat diğer taraftan özellikleri Siamese pink ile ana ebeveyni Siamese sweet arasındadır. Chandler şadok meyvesi orta irilikte basık yuvarlak şekilli ve çekirdeklidir. Meyve kabuğu kalın, düz ve bazen tüylüdür. Meyve eti sıkı, fakat yumuşak ve bir dereceye kadar suludur. Tad asitsiz ile orta asitli arasındadır. Erken olgunlaşır ve depolamaya elverişlidir (Webber ve ark., 1967).

3.2. Metod

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu amacıyla alınan F_1 bireylerinden alınan yapraklar saf su altında yıkanmış alimünyum folyo ile sarılmış ve ardından sıvı azot içerisine batırılmıştır. Her örnek havan içerisinde sıvı azot ile öğütülerek 0.1 gr olacak şekilde 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve izolasyon MiniPrep-CTAB yöntemine göre yapılmıştır.

3.2.2. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltileri dışında kloroform : izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8.0, EDTA: 0.5 M pH:8.0), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (% 99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. DNA izolasyon yönteminde kullanılan ekstraksiyon tampon çözeltisinin içeriği.

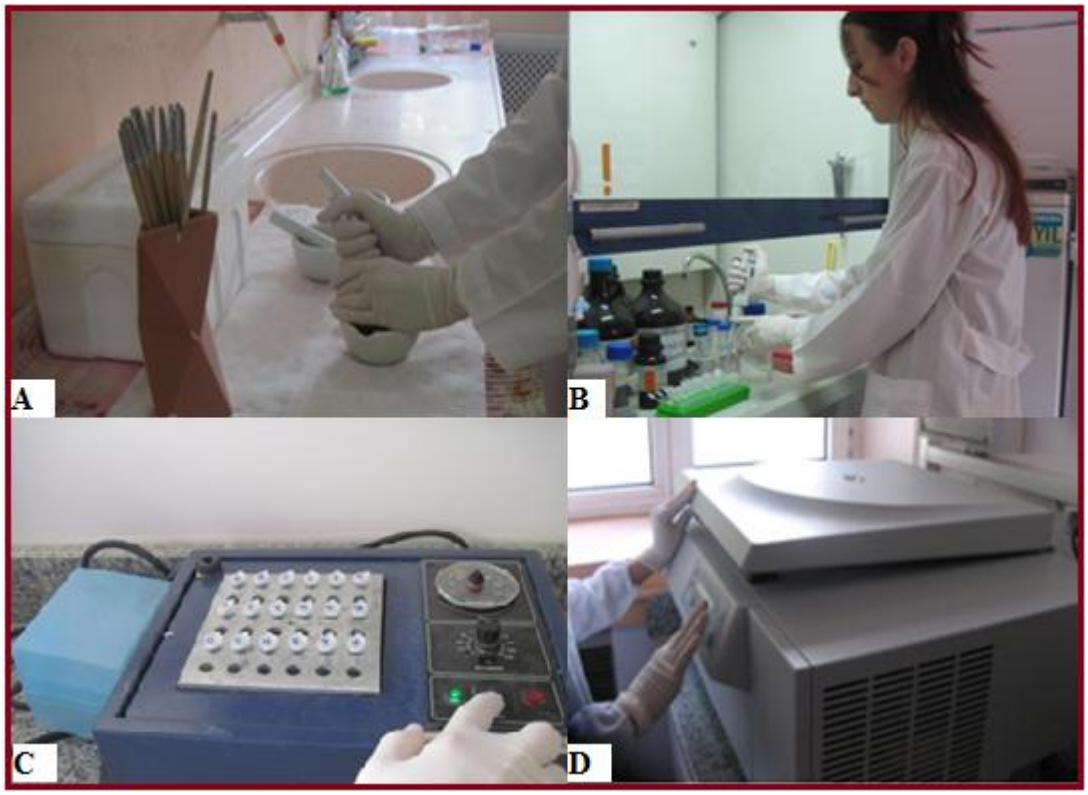
Solüsyon	**Konsantrasyon**
CTAB	% 2,0
NaCl (5 M)	1.4 M
EDTA (0.5 M) pH 8.0	0.2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8.0	0.1 M

3.2.3. DNA İzolasyon Aşamaları

1. Her tüpe hazırlanan ekstraksiyon solüsyonundan 396 µl ve 4 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.
2. Homojenizasyon sağlanana kadar pipet yardımıyla tüpler karıştırılmıştır.
3. Tüpler 65 ^{0}C'de 20 dakika bekletilmiş bu sırada tüpler iki defa karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
4. Her tüpe 400 µl kloroform:izoamilalkol eklenmiş, 15 dakika karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
5. Beş dakika 13.000 devirde tüpler santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiştir ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20 ^{0}C) izopropanol eklenmiştir.
6. Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 µl soğuk (-20^{0}C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20 ^{0}C'de bekletilmiştir.
7. Beş dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir.
9. Kuruyan pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
10. Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (% 96) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20 ^{0}C'de bekletilmiştir.
11. Beş dakika 13.000 devirde santrifüj yapılmıştır.

12. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir.
13. Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
14. Örnekler –20 ^{0}C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu aşamaları Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. A) Yaprakların Sıvı Azotta Öğütülmesi, B) Deterjanların Çeker Ocakta Eklenmesi, C) Örneklerin Isıtıcıda Bekletilmesi, D) Örneklerin Santrifüj Yerleştirilmesi

3.2.4. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen spektrofotometre sonuçları değerlendirilip ilgili hesaplamalar yapılmış ve DNA konsantrasyonları önce 50 ng'a ve ardından 5 ng'a seyreltilmiştir.

3.2.5 Mikrosatellit (SSR) Analizleri PCR Koşulları

Çalışmada Klemantin mandarininde genetik haritanın oluşturulmasında kullanılan SSR markörlerini belirlemek amacıyla primer tarama çalışması yapılmıştır. Genetik haritanın oluşturulmasında kullanılan ve sekansları CIRAD/Fransa'dan alınan 70 SSR primer çifti, bunun dışında laboratuvarımızda mevcut 46 SSR primer çifti olmak üzere toplam 116 SSR primeri kullanılmıştır. Tarama (screening) çalışmaları sonucu ebeveynlerin verdiği DNA bant profilleri incelenmiş ve en iyi amplifikasyon veren ve polimorfik bulunan 46 primer seçilmiştir. SSR analizleri için LiCor (4300) Sekans analiz sistemi (Lincoln, NE) kullanılarak bantlar görüntülenmiştir. Bu kapsamda Forward veya Reverse primerlerin 3'uçlarına CACGACGTTGTAAAACGAC dizini eklenerek floresan etiketi okuma özelliği olan DNA analiz sisteminde görüntülenmesi ve analizlerinin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır.

Primer taraması için ve tarama sonrasında tüm genetik haritalama populasyonuna ait DNA'lar ile hazırlanan PCR reaksiyonlarının bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SSR Analizleri PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Bileşenleri	**Kons.**	**Miktar**
DNA	5 ng	5.0 µl
PCR Master Mix	2X	8.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	0.5 µl
Primer Forward	2 µM	0.5 µl
Primer Reverse	2 µM	0.5 µl
M13 Primer	1 nM	0.5 µl
ddH_2O		5.0 µl

PCR Döngü Programı

94 ^{0}C 5 dk	ön **“denaturation’’**
94 ^{0}C 1 dk	DNA’nın çift ipliğinin ayrılması**‘’denaturation’’**
55-60* ^{0}C 30 sn	primerlerin bağlanması **‘’annealing’’**
72 ^{0}C 1 dk (35 döngü)	yeni iplikçiğin yazılımı **‘’extention’’**
72 ^{0}C 7 dk	son yazılım
4 ^{0}C ∞	

* primer bağlanma sıcaklığı her bir primer için ayrı ayrı belirlenmiştir.

PCR reaksiyonları Thermal Cycler cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan Thermal Cycler Şekil 3.4’ de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Thermal Cycler

Genetik haritanın oluşturulmasında kullanılan 46 SSR primerlerine ait bilgiler Çizelge 3.3’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler

No	Primer	Primer Dizini (5'-3')	Uzunluk(baz)
1	Cont.5628-840	F: ATCCTGGCCACTCCAGGACA	20
		R: CAGATTGCAAGGGAGTTACGGC	22
2	Cont.5874-697	F: TGCATTTTGTGGGTCTTGCTTG	22
		R: GGCCCTGACTGCTGCAAGAT	20
3	Cont.0591-498	F: GGTAAGGGGCTGGGCAAAAA	20
		R: CAGCATCACATATGCAGGCTTGT	23
4	Cont.5719-663	F: CCGCATCATTTATCAGCTCCAA	22
		R: TGCCACGGCCGCAATATTTA	20
5	Cont.5708-571	F: TCGCCCTCCCCCTGAAATTA	20
		R: GAAAGCCTGGTGGGAGCAGA	20
6	Cont.6193-635	F: GCAAATGTGGCGCAAAGTGA	20
		R: CCACGAACAAAGAGGCCAGC	20
7	Cont.5573-287	F: TGATCCTTCACACCTCCGGG	20
		R: GAATTGTTTGCAGAAACCGCC	21
8	Cont.5725-449	F: GTCGAGGCTTGTGGTGCAAA	20
		R: GATCACTGTTGGGGCTGGCT	20
9	Cont.0204-485	F: AGCTCTCTTCCCTGTGGCTA	20
		R: GGTCGAGATTGAGCAGCAGT	20
10	Cont.0502-208	F: TGCATTCACAATTGGTTCCCA	21
		F: TGCATTCACAATTGGTTCCCA	20
11	Cont.5362-214	F: AATGCCCCCAAATTAAAGCC	20
		R: CGGTGGGCTTGGTTTGGATA	20
12	Cont.6314-214	F: CCCCAACAACATGGAAACCG	20
		R: TGTCCCCAACTTTCTTGGTGC	21
13	Cont.5376-72	F: TGCTTGAATGAGGAGCGTGG	20
		R: TCACAGCATGCATTCCCAGAG	21
14	Cont.5909-119	F: GCTGCAGGTTGATGCAGCTC	20
		R: CAGCCTGTGCTACCCCATCA	20
15	Cont.5485-526	F: CAAAGCAAACACGCACAGGC	20
		R: TCCAGGAGGTGGTGCCATTT	20
16	Cont.0599-511	F: CATTGCAGGAAACGGCTGTG	20
		R: TCCCTTGCTTTCCATTGGTTG	21
17	Contig6458-179	F: AGACCCCGAGAAATGCCGTT	20
		R: TCAACACGCTGAATGCGACA	20

Çizelge 3.3.(Devamı)

18	Cont.0245-955	F: CCCTCTCATAAGAAGAGGATAGACA	25
		R: TTGAAAGTGAGGGTGGAATTG	21
19	Cont.6314-132	F: CCCCAACAACATGGAAACCG	20
		R: TGTCCCCAACTTTCTTGGTGC	21
20	Contig6286-480	F: GCACGTGCATTTTGTGACCC	20
		R: TGCTTGACTCCATGAGCTTT	20
21	497	F: CGCAATTCAATTCCCTGTCT	20
		R: CGTCGAGCAACAAATCAAGA	20
22	472	F: TCCACACAAACCCATCTCAA	20
		R: AACCAGACAAGGTGACTGCC	20
23	484	F: TGGAGTTGCAGAGATGATCG	20
		R: TCAACTGATCGCTGATCAAAA	21
24	494	F: TTGCACAAACACAGCCTTTT	20
		R: ATACGAACCACCAGACGGAG	20
25	495	F: GGCCTTAAACCACCTTGACA	20
		R: TGAGGTTTTGCTGTTGTTG	20
26	473	F: CTTGGCGTCGAAAAGAAATC	20
		R: AGCACGGATGTCAAAATTCC	20
27	488	F: CACGCTCTTGACTTTCTCCC	20
		R: CTTTGCGTGTTTGTGCTGTT	21
28	501	F: GAATAGAGGGACGTTGCTGC	20
		R: GGCTTCACTTGTTGTCCCAT	20
29	MEST 431	F: GAGCTCAAAACAATAGCCGC	20
		R: CATACCTCCCCGTCCATCTA	20
30	Ci03D12a	F: GCCATAAGCCCTTTCT	17
		R: CCCACAACCATCACC	16
31	Ci03CO8	F: CAGAGACAGCCAAGAGA	17
		R: GCTTCTTACATTCCTCAAA	19
32	Ci03G05	F: CCACACAGGCAGACA	15
		R: CCTTGGAGGAGCTTTAC	17
33	Ci02G12	F: AAACCGAAATACAAGAGTG	19
		R: TCCACAAACAATACAACG	18
34	MEST121	F: TCCCTATCATCGGCAACTTC	20
		R: CAATAATGTTAGGCTGGATGGA	22
35	CF-CAT07	F: AACACCTTAAGGCTGCAGGA	20
		R: CGTTGTTGATGATTCTTGATGA	22

Çizelge 3.3.(Devamı)

36	CF-CA14	F: TTGGACCCGAGAGTACAAGC	20
		R: CCAGTGTGCTTGGCATTTTT	20
37	CF-CA05	F: CTGCCCTACAGAGAGCGTAGA	20
		R: GTGCCGCATCTGATTTCAA	20
38	CF-CA16	F: AGAGTTCAAGCGCCTTGGTA	20
		R: ACATGCATATTGCTCCTCCA	20
39	CF-CA19	F:GCATAGAATAAGAAATGACAGCAAA	25
		R: ATGCCTGCACCTTTGGTAAG	20
40	CF-TG07	F: CATGTGGATGCGAAGAGGTA	20
		R: GGCTTTTCAAACATGTCAAACA	22
41	CF-CA22	F: TTCCATGATTGACCATTTGC	20
		R: GTTCCTGCCAGCAGCATAGT	20
42	CF-TG02	F: AACCATTACGCTCACCGAAG	21
		R: CCCTAATTGCATCTTCCCAAT	21
43	NB-AC01	F: TTTGACATCAACATAAAACAAG	22
		R: TTTTAAAATCCCTGACCAGA	20
44	NB-GT03	F: GCCTTCTTGATTTACCGGAC	20
		R: TGCTCCGAACTTCATCATTG	20
45	NB-CAG1	F: AACACTCGCACCAAATCCTC	21
		R: TAAATGGCAACCCCAGCTTTG	21
46	NB-AG 14	F: AAAGGGGAAAGCCCTAATCTCA	22
		R: CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC	20

3.2.5.1. Mikrosatellit Elektroforez Koşulları

Elde edilen PCR ürünlerinden 6 µl çekilerek + 1µl yükleme bufferı eklenmiş ve % 1.5'lik agaroz jelde, 1X TAE (Trizma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA(Na_2.EDTA.H_2O) buffer eklenerek koşulmuştur. Jel % 0.1 oranındaki ethidium bromide solüsyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek amplifikasyon ürünlerinin varlığı belirlendikten sonra PAGE (Polyakrilamid Gel Electrophoresis)'de koşma işlemine geçilmiştir.

3.2.5.2. LiCor İçin Poliakrilamid Jel Hazırlığı

Elde edilen PCR ürünlerini koşmak amacıyla % 6.5 poliakrilamide jel hazırlanmıştır. Poliakrilamide jel hazırlamak amacıyla;

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

solüsyonlar karıştırılmış ve elekroforez aparatına dökülüp, yaklaşık 2 saat polimerize olması beklenmiştir.

3.2.5.3. LiCor Elektroforez Koşulları

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra aparat, LiCor cihazına yerleştirilmiştir. 1000 V, 35 mA, 25 W 45^0C'de yaklaşık 30 dk. ön ısıtma yapılarak ardından eşit miktarda formamide yükleme bufferı eklenmiş ve 95 ^{0}C'de 2 dk denatüre edilen örneklerden 1 µl elektroforeze yüklenmiştir. 1500 V, 35 mA, 50 W 48^0C'de elektroforez koşullarında 1.5 saat koşturulmuştur. Amplifiye edilmiş ürünler 50-350 bp uzunluğundaki DNA markör (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) kullanılarak hesaplanmıştır. PAGE hazırlık aşamaları Şekil 3.5' de sunulmuştur.



Şekil 3.5.A) Poliakrilamid jelin döküleceği camlar, B) Jelin enjektör yardımıyla dökülmesi, C) Jel polimerize olduktan sonra tarağın yerleştirilmesi, D) Aparatının cihaza yerleştirilmesi.

3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Tez kapsamında çalışılan haritalama populasyonu JoinMap 4 (Ooijen, V., 2006) programında analiz edilerek kromozomlar üzerinde markörlerin durumları belirlenmiştir. Analizler gerçekleştirilirken CP (cross pollination) populasyon tipi kullanılmış ve analiz öncesinde elde edilen alleller Çizelge 3.4.'de sunulduğu gibi düzenlenmiştir. Amplifikasyon olmadığı durumda "uu" olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları Mikrosoft Exel dosyasına girilmiş ve daha sonra JoinMap 4 programında text dosyasına dönüştürülmüştür.

Çizelge.3.4.CP Populasyonunda beklenen açılımlar

Ebeveynler	Açıklama	Beklenen Açılım
<abxcd>	Ebeveynlerin herikisi heterezigot; dört allel	ac,ad,bc,bd
<efxeg>	Ebeveynlerin herikisi heterezigot;üç allel	ee,eg,fg
<hkxhk>	Ebeveynlerin herikisi heterezigot;iki allel	hh,hk,kk
<lmxll>	Ebeveynlerden biri heterezigot	lm,ll
<npxnn>	Ebeveynlerden biri heterezigot	nn,np

Ebeveyn ve melez bireylerin PAGE'de elde edilen jel profillerinden, polimorfik primerler bantların varlığı ve yokluğu durumuna göre skorlanmıştır. Daha sonra tez çalışması kapsamında, genetik haritanın oluşturulmasının 1. aşamasında kullanılan 46 SSR markörü JoinMap 4 programında analiz edilmiş ve bu markörler kromozom üzerindeki yerleri ve sıraları belirlenmiştir. Çalışma, uluslararası bir genom haritalama projesinin bir parçası niteliğinde olması nedeniyle diğer çalışma gruplarından alınan veriler birleştirilerek genetik haritanın ikinci aşaması için analizler gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda 247 SSR primeri haritalanmış ve 247 SSR primerinin 33 adedi çalışmamızda kullandığımız primerlerden oluşmuştur.

Melez bireyler arasında gözlenen segregasyon oranları $\chi 2$ analizleri kullanılarak Mendel oranları JoinMap 4 programında hesaplanmıştır. Programda herhangi iki markör arasındaki bağlantı, LOD skoru 4 kullanılarak belirlenmiştir. Haritalamada markör uzaklıkları için Kosambi fonksiyonu seçilmiştir. Sonuç olarak bağlantı grupları ve bu gruplar üzerindeki markörlerin kapladıklar alan ve birbirlerine olan uzaklıkları tespit edilmiştir. Bu alan ve uzaklık cM olarak belirlenmiştir. Son olarak da genetik harita MapChart 2.2 (Voorrips, 2002) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonuna Ait Bulgular

Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan ebeveyn ve melez bireylere ait yapraklardan metot kısmında belirtildiği şekilde DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen saflık ve DNA miktarlarına ait veriler Çizelge 4.1' de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 İzole edilen DNA'lara ait spektrofotometre sonuçları

No	İsim	DNA Miktarı (ng DNA)	DNA Saflığı (A260/A280)
1	Chandler	194.3	1.50
2	Clementina	110.0	1.45
3	chxcl- 001	95.5	1.86
4	chxcl- 002	68.4	1.72
S	chxcl- 003	76.9	1.72
6	chxcl- 004	102.2	1.49
7	chxcl- 005	218.1	1.68
8	chxcl- 006	123.7	1.65
9	chxcl- 007	57.9	1.51
10	chxcl- 008	329.2	1.70
11	chxcl- 009	131.8	1.19
12	chxcl- 010	262.5	1.69
13	chxcl- 011	136.3	1.41
14	chxcl- 012	89.8	1.81
15	chxcl- 013	175.0	1.61
16	chxcl- 014	166.9	1.91

Çizelge 4.1 (Devamı)

17	chxcl- 015	307.6	1.57
18	chxcl- 016	106.3	1.53
19	chxcl- 017	329.2	1.48
20	chxcl- 018	64.8	2.23
21	chxcl- 019	80.4	1.85
22	chxcl- 020	140.9	1.02
23	chxcl- 021	129.0	1.80
24	chxcl- 022	230.0	1.92
25	chxcl- 023	170.0	1.20
26	chxcl- 024	217.9	1.81
27	chxcl- 025	99.4	1.50
28	chxcl- 027	183.2	1.92
29	chxcl- 028	71.6	1.70
30	chxcl- 029	332.1	1.31
31	chxcl- 030	98.3	1.32
32	chxcl- 031	354.9	1.75
33	chxcl- 032	49.6	1.90
34	chxcl- 033	109.8	1.32
35	chxcl- 034	93.8	1.28
36	chxcl- 035	138.9	1.92
37	chxcl- 036	179.4	1.70
38	chxcl- 037	108.6	1.42
39	chxcl- 038	159.6	1.51
40	chxcl- 041	224.5	1.14

Çizelge 4.1 (Devamı)

41	chxcl- 042	139.5	1.29
42	chxcl- 043	104.0	1.50
43	chxcl- 044	247.3	1.41
44	chxcl- 045	182.6	1.06
45	chxcl- 046	246.4	î. 26
46	chxcl- 047	130.0	1.71
47	chxcl- 048	86.0	1.56
48	chxcl- 049	172.7	1.38
49	chxcl- 050	142.3	2.17
50	chxcl- 051	347.1	1.91
51	chxcl 052	84.3	1.21
52	chxcl 053	129.4	1.19
53	chxcl 054	172.2	1.47
54	chxcl 055	164.4	1.84
55	chxcl 056	265.9	1.65
56	chxcl 057	142.9	1.98
57	chxcl 059	69.3	1.10
58	chxcl 060	86.4	1.69
59	chxcl 061	210.0	1.68
60	chxcl 062	248.2	1.59
61	chxcl 065	186.1	1.26
62	chxcl 066	151.7	1.21
63	chxcl 067	122.2	1.40
64	chxcl 068	192.3	1.51

Çizelge 4.1 (Devamı)

65	chxcl -069	255.0	1.33
66	chxcl -071	94.2	1.91
67	chxcl- 072	118.1	1.30
68	chxcl- 073	234.4	1.27
69	chxcl- 074	93.0	1.60
70	chxcl- 075	102.5	2.06
71	chxcl- 076	167.8	1.73
72	chxcl- 077	108.8	1.81
73	chxcl- 079	244.0	1.22
74	chxcl- 081	100.5	1.39
75	chxcl- 082	98.6	0.70
76	chxcl- 083	330.3	1.40
77	chxcl- 084	112.8	1.90
78	chxcl- 086	135.0	1.40
79	chxcl- 087	157.1	1.27
80	chxcl- 088	45.3	1.40
81	chxcl- 089	141.9	1.59
82	chxcl- 090	262.4	1.08
83	chxcl- 091	126.2	1.89
84	chxcl- 092	56.9	1.80
85	chxcl- 094	207.5	1.48
86	chxcl- 095	83.3	1.74
87	chxcl- 096	190.1	1.78
88	chxcl- 097	197.5	1.33

Çizelge 4.1 (Devamı)

89	chxcl- 098	89.7	1.56
90	chxcl- 102	56.2	1.87
91	chxcl- 103	118.3	1.59
92	chxcl- 104	100.0	1.62
93	chxcl- 106	143.7	1.58
94	chxcl- 109	125.0	1.31
95	chxcl- 111	228.1	1.38
96	chxcl- 112	71.1	1.37
97	chxcl- 113	284.0	1.64
98	chxcl- 114	119.0	1.35
99	chxcl- 115	287.2	1.13
100	chxcl- 116	200.0	1.41
101	chxcl- 117	136.0	1.27
102	chxcl- 118	107.4	1.24
103	chxcl- 121	96.4	1.25
104	chxcl-123	212.9	1.88
105	chxcl-124	172.0	1.78
106	chxcl-127	214.3	1.33
107	chxcl-129	61.2	1.82
108	chxcl-130	126.6	1.33
109	chxcl-131	231.5	1.81
110	chxcl-134	107.5	1.85
111	chxcl-135	81.1	1.76
112	chxcl-137	113.5	1.25

Çizelge 4.1 (Devamı)

113	chxcl-138	127.6	1.80
114	chxcl-139	102.4	1.36
115	chxcl-141	37.7	1.60
116	chxcl-143	99.8	1.41
117	chxcl-146	114.7	1.23
118	chxcl-147	150.2	1.58
119	chxcl-148	106.6	1.64
120	chxcl-149	146.3	1.81
121	chxcl-150	154.0	1.41
122	chxcl-151	86.4	1.31
123	chxcl-152	131.5	1.77
124	chxcl-153	163.2	1.72
125	chxcl-154	71.0	1.77
126	chxcl-156	80.3	1.80
127	chxcl-157	135.2	1.31
128	chxcl-158	121.1	1.84
129	chxcl-159	139.0	1.46
130	chxcl-160	177.6	1.91
131	chxcl-161	116.4	1.77
132	chxcl-162	245.2	1.58
133	chxcl-163	179.4	1.51
134	chxcl-164	132.2	1.66
135	chxcl-165	256.3	1.31
136	chxcl-166	89.8	1.13

Çizelge 4.1 (Devamı)

137	chxcl-168	31.5	1.40
138	chxcl-170	60.6	1.66
139	chxcl-171	153.0	1.42
140	chxcl-172	114.2	1.88
141	chxcl- 173	96.9	1.58
142	chxcl- 174	228.0	1.73
143	chxcl- 175	147.5	1.28
144	chxcl- 176	348.3	1.66
145	chxcl- 177	53.2	1.17
146	chxcl- 178	135.7	1.35
147	chxcl- 179	50.0	1.50
148	chxcl- 180	376.8	1.44
149	chxcl- 181	162.2	1.54
150	chxcl- 183	172.9	1.58
151	chxcl- 184	158.0	1.17
152	chxcl- 185	250.0	1.72
153	chxcl- 187	207.0	1.38
154	chxcl- 188	104.5	2.02
155	chxcl- 189	84.0	1.22
156	chxcl- 191	230.0	1.37
157	chxcl- 192	119.3	1.79
158	chxcl- 193	101.1	2.03
159	chxcl- 194	150.2	1.33
160	chxcl- 195	195.0	1.16

Çizelge 4.1 (Devamı)

161	chxcl- 196	220.1	1.92
162	chxcl- 197	33.4	1.86
163	chxcl- 199	536.3	1.63
164	chxcl- 200	160.0	1.66
165	chxcl- 201	116.4	1.11
166	chxcl- 202	322.0	1.40
167	chxcl- 207	90.7	1.43
168	chxcl- 210	137.2	1.43
169	chxcl- 211	111.9	1.33
170	chxcl- 213	353.0	1.80
171	chxcl- 214	158.4	1.89
172	chxcl- 215	171.6	1.02
173	chxcl- 216	133.9	1.75
174	chxcl- 217	117.2	1.34
175	chxcl- 219	344.3	1.59
176	chxcl- 223	35.9	1.17
177	chxcl- 224	189.3	1.28
178	chxcl- 225	92.8	1.19
179	chxcl- 228	189.3	1.66
180	chxcl- 230	75.0	1.80
181	chxcl- 231	265.7	1.53
182	chxcl- 232	163.1	1.74
183	chxcl- 233	206.5	1.88
184	chxcl- 234	140.1	1.66

Çizelge 4.1 (Devamı)

185	chxcl- 235	229.7	1.65
186	chxcl- 238	18.5	1.75
187	chxcl- 239	118.9	1.28
188	chxcl- 240	129.9	1.74
189	chxcl- 243	134.0	1.68
190	chxcl- 244	170.6	1.68
191	chxcl- 247	67.8	1.54
192	chxcl- 248	73.7	1.65

Veriler içerisinde en yüksek DNA konsantrasyonu 163 numara ile kodlanmış chxcl-199'da (536.3 ng DNA/ ul), en düşük DNA miktarı ise 186 numara ile kodlanmış chxcl-238'den (18.5 DNA/ ul) elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan genotiplere ait saflık değerleri 1.0-2.17 arasında değişim göstermektedir. Kaliteli DNA'nın saflık değeri 1.8-2.0 arasında olmalıdır. Saflık değerlerinin beklenen orandan daha düşük olmasının en büyük nedeni yaprak örneklerinin, CIRAD Araştırma Enstitüsü'nden posta aracılığıyla gelmesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yaprakların Fransa'dan geldiği dönem aktif büyüme dönemi olmadığı için, yaşlı yapraklardan, DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyon çalışmalarında orijinal dokunun toplanması ekstraksiyondan önce korunması DNA'nın kalite ve kantitesini çok etkilemektedir. Genel olarak en iyi doku en genç olan dokudur. Bitki hücreleri genelde çok miktarda sekonder bileşikler içerirler, bunun sonucu olarak belirli türlerde yüksek düzeydeki sekonder bileşikler DNA'nın saflığını bozmaktadır (Aka-Kaçar, 2003). Bununla birlikte kalitesi düşük DNA'lardan elde edilen bantlarda herhangi bir sorun olmadığı için tekrar izolasyon yoluna gidilmemiştir.

4.2. Çalışmada Kullanılan SSR Primerlerine Ait Bulgular

Çalışmada toplamda 116 SSR primeri kullanılmış, bunlardan ebeveynlerde 46 adedi polimorfizim göstermiş ve bu 46 SSR markörlerinden 33 tanesi haritalama için uygun segregasyon göstermiştir. Haritalama için uygun segregasyon gösteren otuz üç SSR markörü ve açılımları Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Ebeveynlerin SSR primerlerine göre segregasyonu

No	Primer	Chandler	Clementina
1	Cont.5628-840	ll	lm
2	Cont.5874-697	ab	cd
3	Cont.0591-498	nn	np
4	Cont.5719-663	lm	ll
5	Cont.6193-635	nn	np
6	Cont.5573-287	nn	np
7	Cont.5725-449	nn	np
8	Cont.5362-214	nn	np
9	Cont.0502-208	hk	hk
10	Cont.6314-214	nn	np
11	Cont.5909-119	nn	np
12	Cont.5485-526	ef	eg
13	Cont.0599-511	nn	np
14	Cont.0245-955	nn	np
15	Cont.6314-132	nn	np
16	Contig6286-480	nn	np
17	497	nn	np
18	484	nn	np
19	473	nn	np
20	488	nn	np
21	501	lm	ll
22	Ci03D12a	nn	np
23	Ci03CO8	nn	np
24	Ci03G05	nn	np
25	Ci02G12	lm	ll
26	CF-CA14	cd	ab
27	CF-CA05	ef	eg

Çizelge 4.2 (Devamı)

28	CF-CA19	cd	ab
29	CF-TG07	hk	hk
30	CF-TG02	ef	eg
31	NB-AC01	nn	np
32	NB-GT03	cd	ab
33	NB-CAG1	hk	hk

Her bir ebeveyn için elde edilen allel büyüklükleri ise Çizelge 4.3'de sunulmuştur. Ebeveynlere ait bant büyüklükleri 122 bp ile >350 bp arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Ebeveynlerin allel büyüklükleri

No	Primerler	Chandler	Clementina
1	Cont.5628-840	204-202	204-204
2	Cont.5874-697	365-377	364-369
3	Cont.0591-498	335-335	333-335
4	Cont.5719-663	124-122	124-124
5	Cont.5708-571	145-145	142-147
6	Cont.6193-635	184-184	177-184
7	Cont.5573-287	363-363	363-364
8	Cont.5725-449	270-270	270-272
9	Cont.0204-485	204-204	196-204
10	Cont.0502-208	356-351	356-351
11	Cont.5362-214	142-142	140-142
12	Cont.6314-214	238-238	233-238
13	Cont.5376-72	NA	170-173
14	Cont.5909-119	361-361	359-361

Çizelge 4.3 (Devamı)

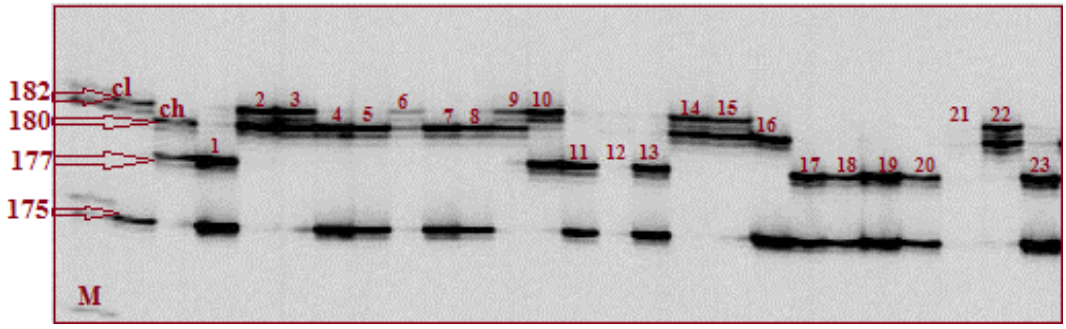
15	Cont.5485-526	260-251	260-255
16	Cont.0599-511	328-328	328-324
17	Contig6458-179	>350- >350	>350- >350
18	Cont.0245-955	349-349	349-351
19	Cont.6314-132	240-240	240-235
20	Contig6286-480	371-371	371-354
21	497	351-351	351-352
22	472	270-270	266-264
23	484	NA-NA	260-263
24	494	270-270	276-282
25	495	274-274	277-289
26	473	214-214	214-222
27	488	146-146	146-150
28	501	264-273	273-273
29	MEST 431	339-337	329-329
30	Ci03D12a	260-260	260-250
31	Ci03CO8	221-221	233-216
32	Ci03G05	230-230	237-235
33	Ci02G12	265-265	nd-260
34	MEST121	182-189	179-179
35	CF-CAT07	158-160	153-153
36	CF-CA14	185-171	154-152
37	CF-CA05	182-187	187-203

Çizelge 4.3 (Devamı)

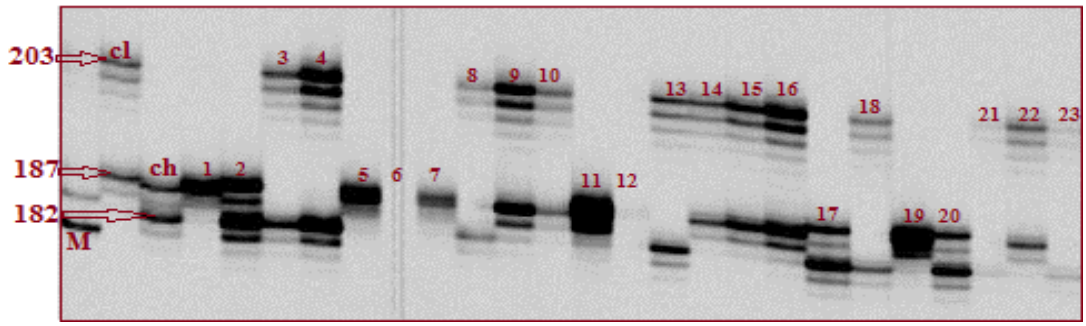
38	CF-CA16	178-178	170-175
39	CF-CA19	191-202	185-200
40	CF-TG07	185 -181	185- --
41	CF-CA22	212-208	217-217
42	CF-TG02	208-224	208-205
43	NB-AC01	151-151	151-155
44	NB-GT03	180-175	182-177
45	NB-CAG01	233-239	233- --
46	NB-AG14	172-182	172-174

Haritalama çalışmasında kullanmış olduğumuz dört primer her iki ebeveynde de heterozigot bir yapı göstererek toplam dört allel oluşturmuş ve bu primerler “abxcd” olarak kodlanmıştır. Bu açılıma ait jel görüntüsü Şekil 4.1’de sunulmuştur.

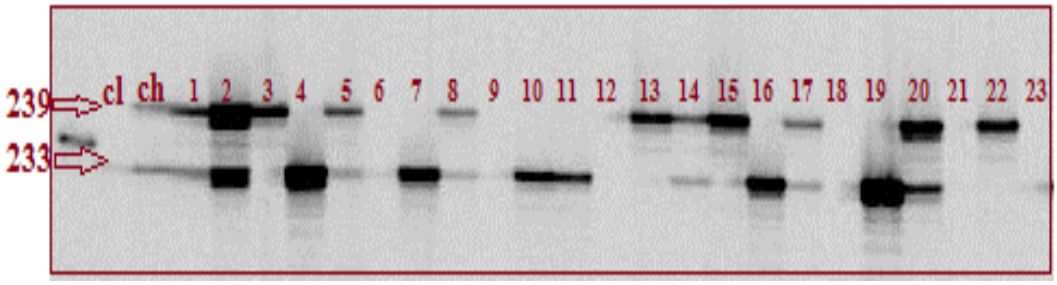
Dört primer ana ve baba ebeveynlerde ortak bir bant oluşturarak heterezigot yapı göstermişler ve toplamda 3 allel oluşturarak “efxeg” şeklinde kodlanmışlardır. “efxeg” şeklinde skorlanan primerlerden CF-CA05 nolu primere ait jel görüntüsü Şekil 4.2’ de sunulmuştur. Dört primer her iki ebeveynde aynı bant profilini göstererek “hkxhk” olarak kodlanmıştır (Şekil 4.3). Ana veya baba ebeveynlerden birinin homozigot olması durumu ise “Imxll” (8 primer) ve “nnxnp” (26 primer) olarak kodlanmıştır. Bu şekilde açılım gösteren primerler sırasıyla Şekil 4.4 ve 4.5’de sunulmuştur.



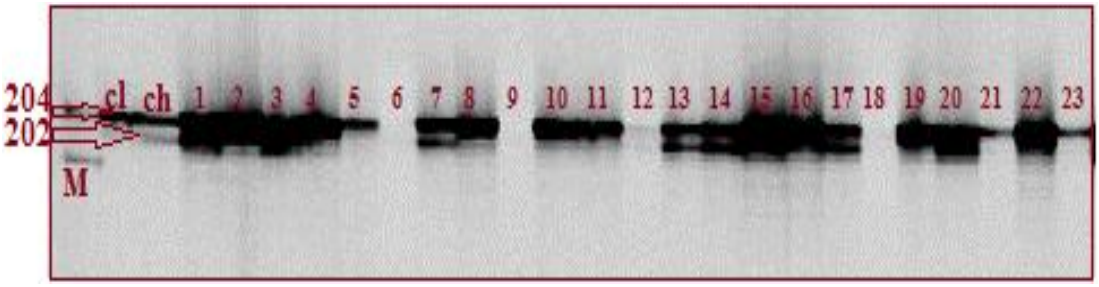
Şekil 4.1 NB-GT03 primeri, cl (Clementina); ab, ch (Chandler); cd, M; markör, Oklarla gösterilen rakamlar ise cl ve ch'nin baz büyüklüğünü ifade etmektedir.



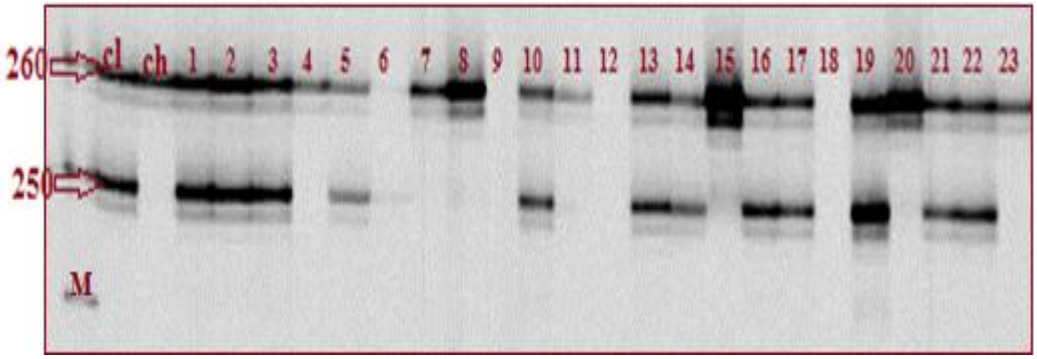
Şekil 4.2 CF-CA05 primeri, cl (Clementina); ef, ch(Chandler); eg



Şekil 4.3 NB-CAG01 primeri, cl (Clementina); hk, ch (Chandler); hk



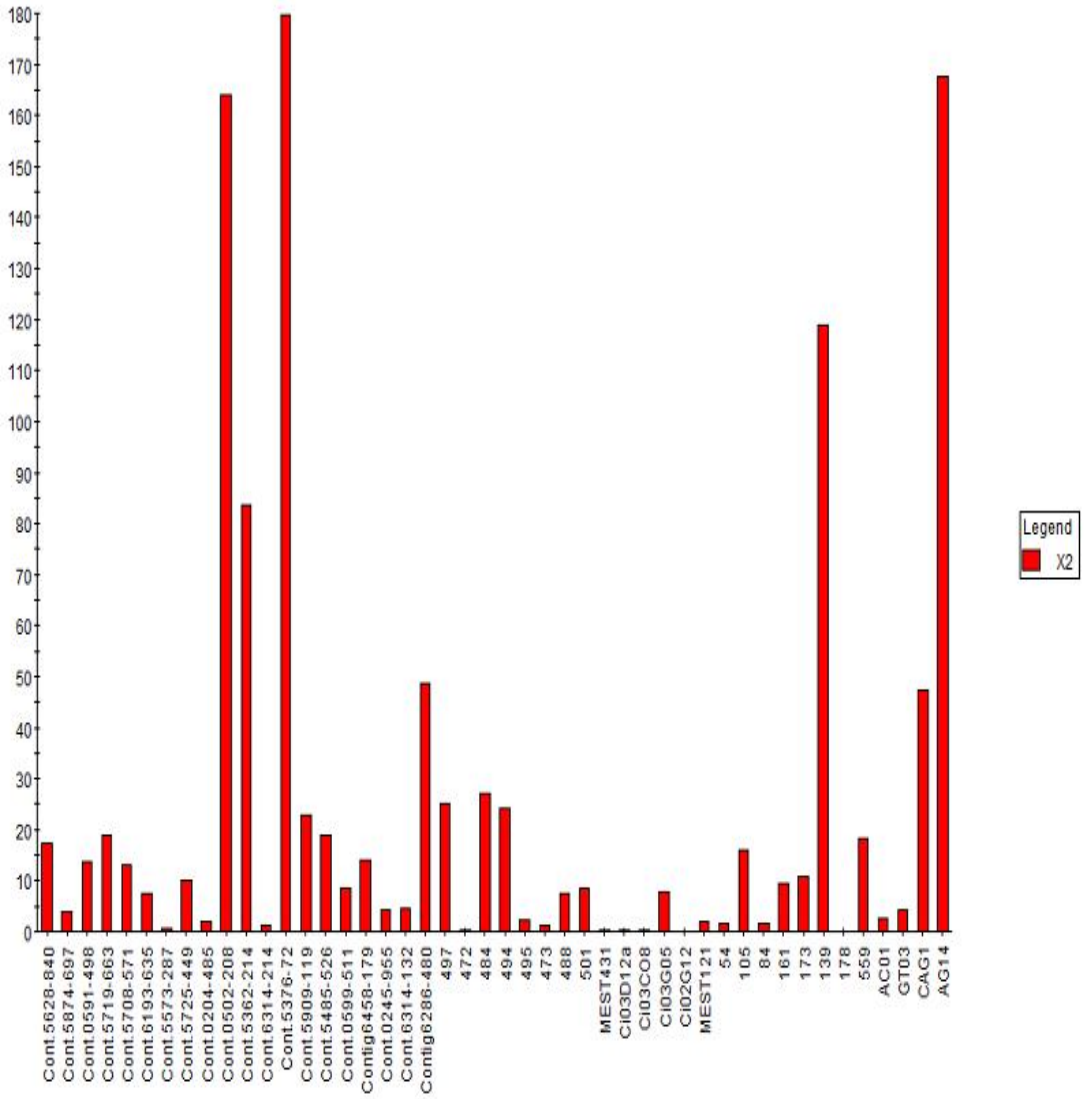
Şekil 4.4 Cont.5628-840 primeri, cl (Clementina); ll, ch(Chandler); lm



Şekil 4.5 Ci03D12a primeri, cl (Klemantin mandarini); np, ch (Chandler); nn

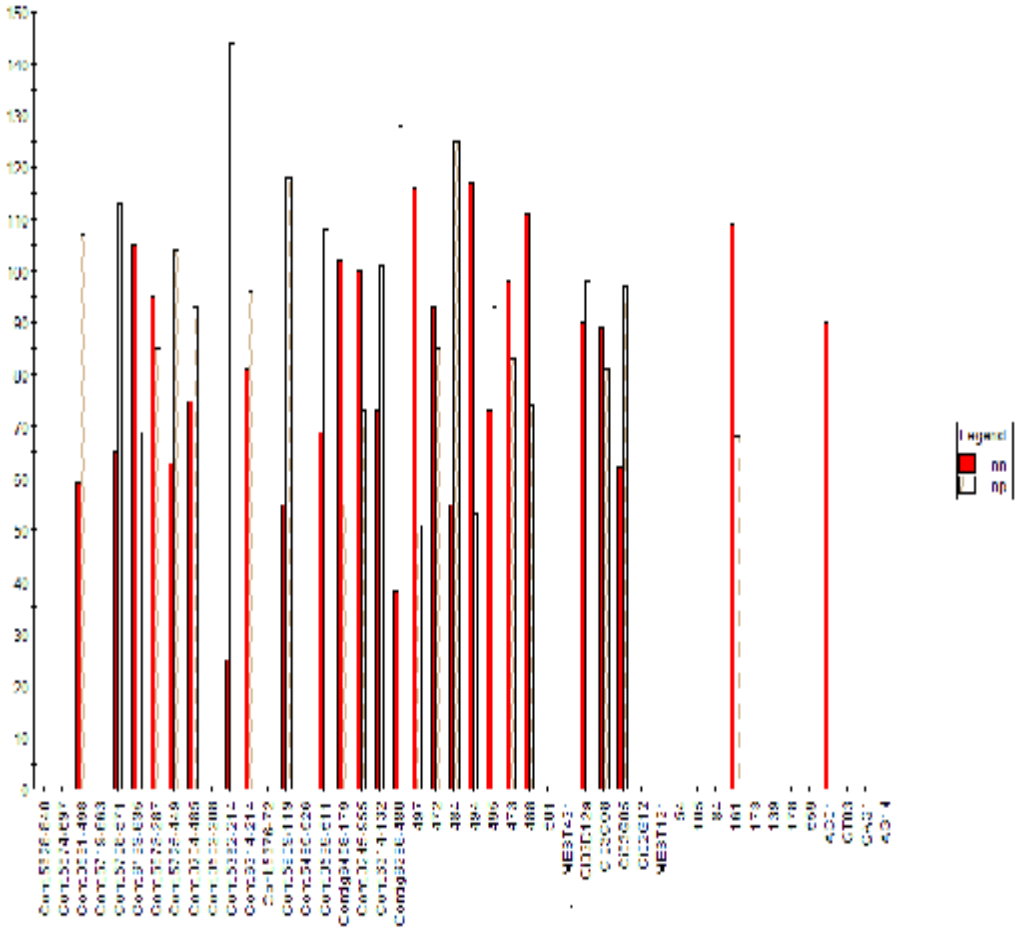
4.3. Genom Haritalama Bulguları

Chandler x Clementina populasyonunun SSR primerleri ile amplifikasyonu sonucunda elde edilen verilerin analizi JoinMap 4 programında gerçekleştirilmiştir. JoinMap 4 programında öncelikli olarak her bir lokus için $\chi 2$ analizi yapılmıştır. Ayrıca her bir lokusun allel durumlarını içeren çizelgeler oluşturulmuş ve bu çizelgeler aracılığıyla Klemantin mandarinin genetik bağlantı grupları içeren harita elde edilmiştir. Haritalamada kullanılan primerlerin Çizelge 4.4'de $\chi 2$ analizlerinin sonuçları sunulmuştur. Klemantin mandarinine ait lokusların allel durumları Çizelge 4.5.'den 4.9'a kadar sunulmuştur.



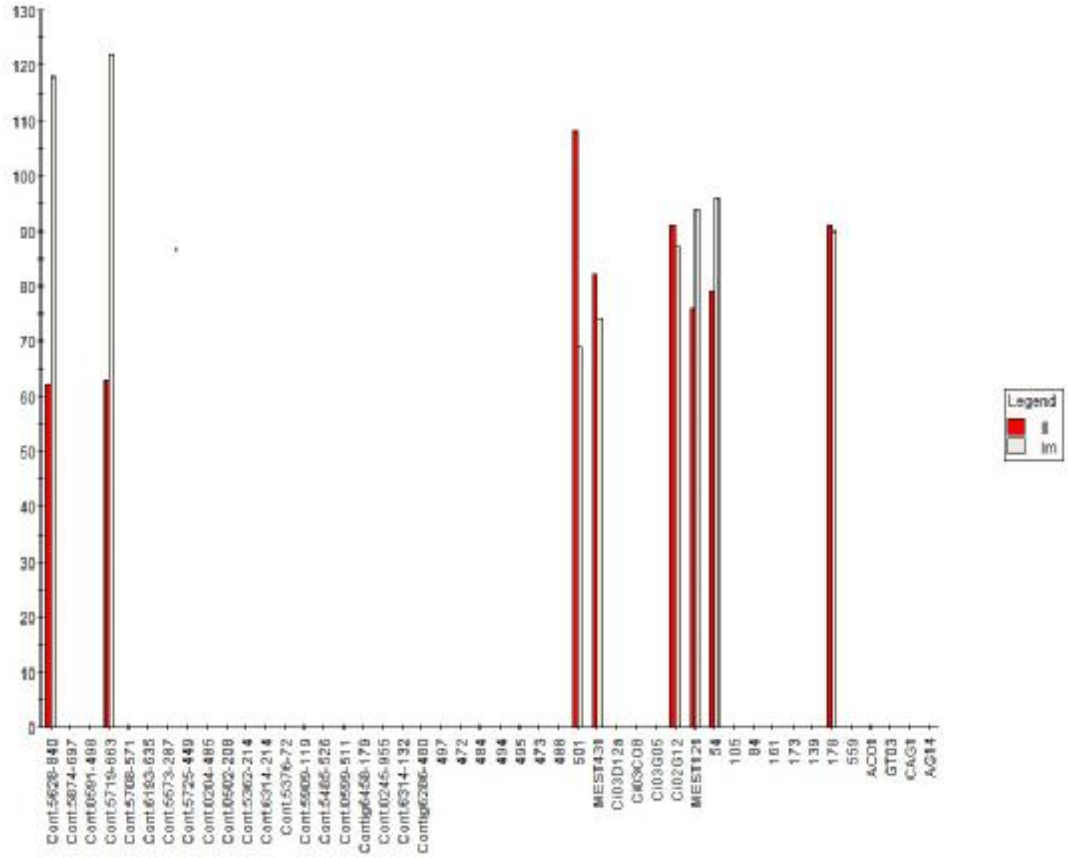
Çizelge 4.4 χ2 analizlerinin sonuçları

Kırk altı SSR markörü arasında 26 adedi “nnxnp” segregasyonu göstermiştir. Yirmi altı SSR markörünün 19 adedi (% 58), Klemantin mandarini için oluşturulan 10 bağlantı grubunda dağılım göstermiştir (Çizelge 4.5).



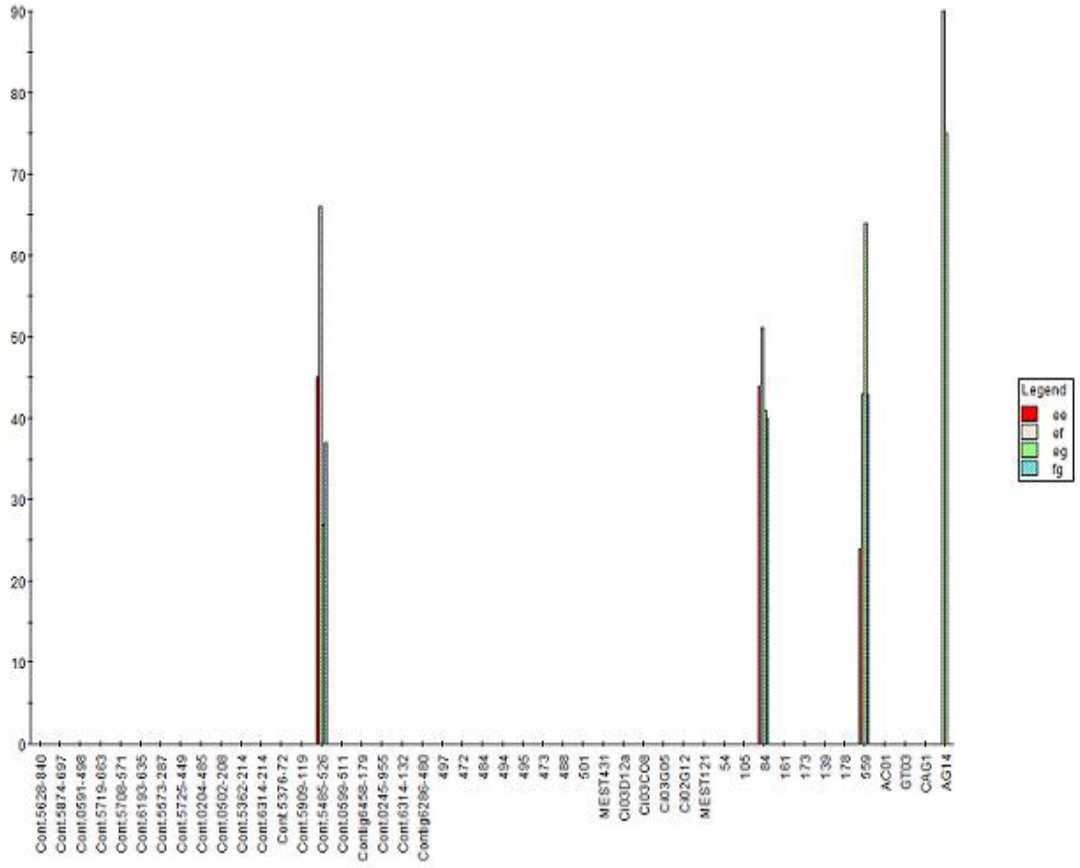
Çizelge 4.5.” nnxnp” allelleri içeren lokuslar

Kırk altı SSR marköründen 8 adedi “lmxll” segregasyonunu, göstermiştir. Bunlardan 4 adedi (% 12.5) Mendel segregasyonuna uyum göstermiş ve Klemantin mandarini için oluşturulan 10 bağlantı grubu arasından 1.4. ve 7. bağlantı gruplarında dağılım göstermiştir (Çizelge 4.6).



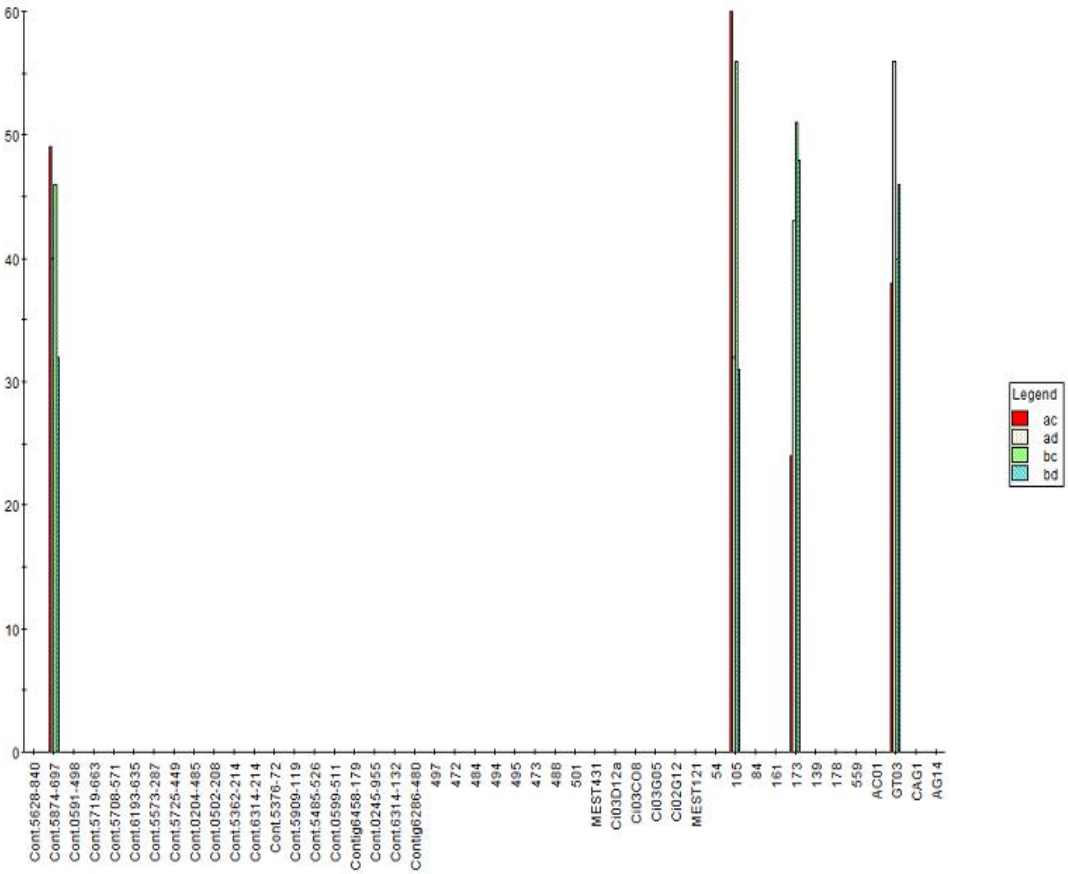
Çizelge 4.6 “llxlm” allelleri içeren lokuslar

Kırkaltı SSR marköründen 4 adedi “efxeg” segregasyonu göstermiştir. Dört SSR markörünün 3 adedi (% 9.1) Mendel segregasyonuna uyumlu bulunmuştur. JoinMap 4 programı oluşturulan 10 bağlantı grubundan 6. ve 10. bağlantı gruplarında dağılım göstermiştir (Çizelge 4.7).



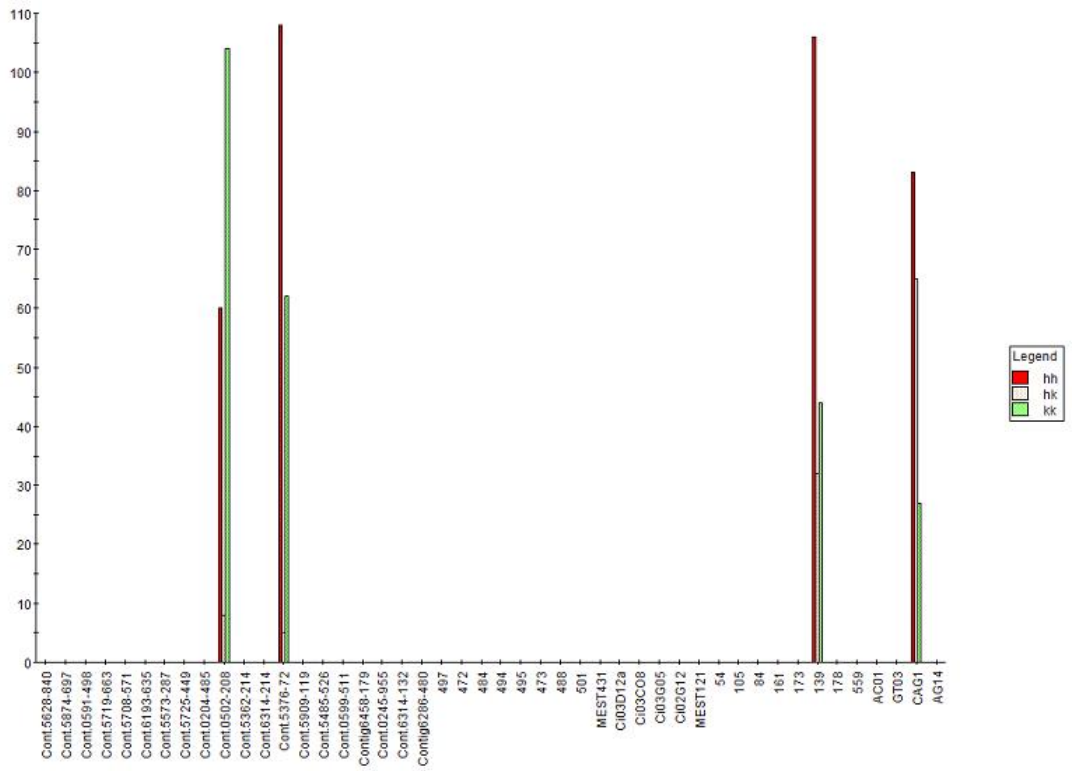
Çizelge 4.7. “efxeg” allelleri içeren lokuslar

Polimorfizim gösteren 46 SSR marköründen 4 adedi (% 12.5) "abxcd" segregasyonu göstermiştir. Dört SSR markörünün, Klemantin mandarini için oluşturulan 10 bağlantı grubu arasından, 4. 7. ve 8. bağlantı grupları arasında dağılım göstermiştir (Çizelge 4.8).



Çizelge 4.8. "abxcd" allelleri içeren lokuslar

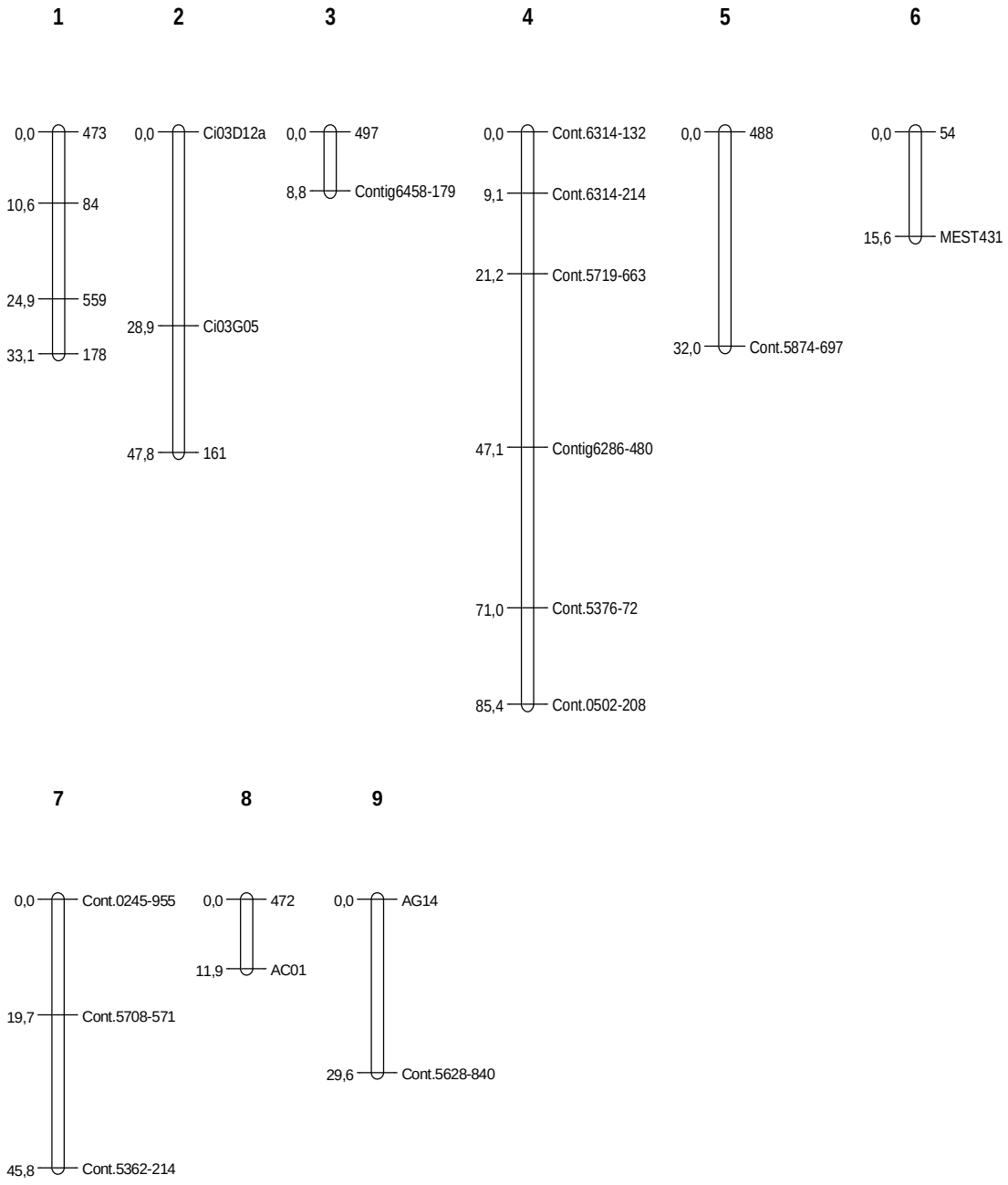
Kırkaltı SSR marköründen 4 adedi “hkxhk” segregasyonu göstermiştir. Dört SSR markörünün 3 adedi (% 9.1), Klemantin mandarini için oluşturulan 10 bağlantı grupları arasından 4. 2. ve 10. bağlantı grupları arasında dağılım göstermiştir (Çizelge 4.9).



Çizelge 4.9. “hkxhk” allelleri içeren lokuslar

4.3.1.Genetik Haritalama I. Aşama Bulguları

Tez kapsamında çalışılan haritalama populasyonu JoinMap 4 programında analiz edilmiştir. Bunun sonucunda, 46 polimorfik SSR primerinden 26 adedi Klemantin mandarinin genetik bağlantı haritasını oluşturmak için kullanılmıştır. Harita toplamda 9 bağlantı grubu içermektedir. Klemantin mandarinin, 26 SSR markörü kullanılarak oluşturulan genetik bağlantı haritası Şekil 4.6’ da sunulmuştur.



Şekil 4.6. Klemantin mandarinin genetik haritasının I. aşama analizleri sonucunda elde edilen bağlantı grupları

Haritanın I. aşamasında 9 bağlantı grubu oluşturulmuştur. Bağlantı gruplarında yer alan SSR primerlerinin sayısı sırasıyla şu şekildedir:
1. bağlantı grubunda dört SSR markörü, ikinci bağlantı grubunda üç SSR markörü bağlantı göstermiştir. Üçüncü bağlantı grubu iki SSR marköründen oluşmaktadır. Dördüncü Bağlantı grubunda altı SSR markörü yer almıştır ve bağlantı grupları arasında en fazla sayıda markör içeren gruptur. Beşinci bağlantı grubunda iki SSR markörü haritalanmıştır. Altıncı bağlantı grubunda iki SSR markörü yer almıştır. Yedinci bağlantı grubunda ise üç SSR markörü bağlantı göstermiştir. Sekizinci bağlantı grubunda iki SSR markörü yer almıştır. Dokuzuncu ve son bağlantı grubunda ise iki SSR markörü haritalanmıştır.

4.3.2. Genetik Haritalama II. Aşama Bulguları

4.3.2.1.Klemantin mandarini İçin Oluşturulan Genetik Bağlantı Grupları

Yedi ülke ve 14 araştırma grubundan elde edilen 214 SSR markörü ile bu çalışmada elde edilen 33 SSR markörü birleştirilmiş ve toplamda toplamda 247 SSR markörü kullanılarak Klemantin mandarinin genetik haritası oluşturulmuştur. Oluşturulan genetik bağlantı haritasına ait bilgiler Çizelge 4.10'da sunulmuştur. Klemantin mandarinin genetik haritasını oluşturan 10 bağlantı grubu Şekil 4.7' den 4.16' ya kadar olan şekillerde sunulmuştur.

Çizelge 4.10 Genetik haritaya ait bilgiler

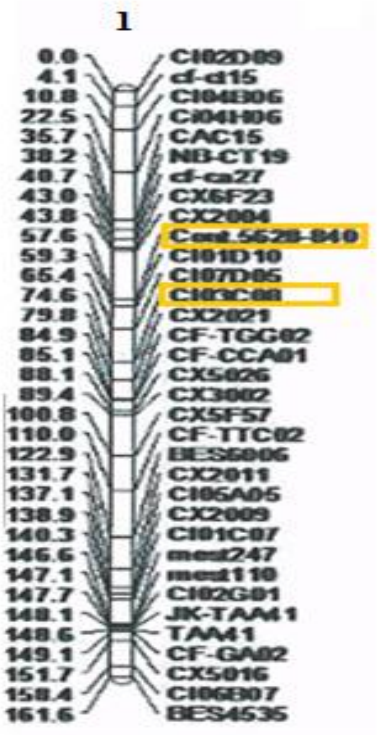
Bağlantı Grubu	Uzunluk (cM)	Markör sayısı	% markör	Genomun tamamında kapladığı alan	iki markör arasındaki ortalama uzaklık
1	161,6	34	13,8	10,1	4,75
2	64,1	12	4,9	4,01	5,34
3	21,7	8	3,2	1,36	2,71
4	235	35	14,2	14,69	6,71
5	157,7	30	12,1	9,86	5,26
6	137,3	35	14,2	8,58	3,92
7	171,5	22	8,9	10,72	7,8
8	170,7	29	11,7	10,67	5,89
9	126,1	23	9,3	7,88	5,48
10	123,7	19	7,7	7,73	6,51
TOPLAM	1369,40	247	100	85,59	5.43

Haritanın uzunluğu toplam 1.369.40 cM bulunmuş ve genomun % 85.59'ui haritalanmıştır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 543 cM olarak tespit edilmiştir. Markör sayısının en fazla olduğu bağlantı grupları 4. (35 Markör) ve 6. (35 markör) bağlantı gruplarında en az markör sayısının yer aldığı bağlantı grubu 3. bağlantı grubunda elde edilmiştir. Genomda en çok alan kaplayan bağlantı grubu 4. bağlantı grubu en az alan kaplayan bağlantı grubu ise 3. bağlantı grubu olarak tespit edilmiştir. En uzun bağlantı grubu (235 cM) 4. bağlantı grubu, en kısa bağlantı grubu ise 3. bağlantı grubu olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Diğer araştırmacılar tarafından turunçgil türlerine ait, yapılan haritalama çalışmalarında, Luro ve ark., (1996), *C.maxima x (C.reshini x P trifoliata)* ebeveynlerini kullanarak her bir ebeveyn için iki harita oluşturmuş, *C. maxima'* nın harita uzunluğunu 600 cM ve *Poncirus'*un toplam harita uzunluğunu 1503 cM olarak belirtmişlerdir. Roose ve ark., (2000), (*C. paradisi x P. trifoliata) x (C. sinensis x P. trifoliata)* ebeveynlerini kullanarak oluşturdukları haritanın, toplam uzunluğunun 701 cM olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan Chen ve ark., (2008), *C. sinensis x P. trifoliata'*yı ebeveyn olarak kullanmış ve her bir ebeveyn için ayrı bir harita oluşturmuşlardır. *C. sinensis* için oluşturulan haritanın uzunluğu 775.8 cM, *P. trifoliata'*nın ise 425.7 cM olduğu belirtilmiştir. Son olarak da Gülşen ve ark., (2010), *C.reticulata x (C.paradisi*

x C.reticulata) ebeveyn olarak kullanmış ve her ebeveyn için iki ayrı harita oluşturmuşlardır. Klemantin mandarinin harita uzunluğunun 858 cM, Orlando'nun harita uzunluğunun 886 cM olduğunu belirtilmişlerdir. Bu çalışmada Klemantin mandarinin genetik bağlantı haritasının uzunluğu 1369.40 cM olarak bulunmuş ve bahsedilen araştırmacıların çalışmalarının sonuçlarından farklı olması, kullanılan ebeveynlerin, markörün ve markör sayısının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.2.1.(1) Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 1. Bağlantı Grubu Bulguları

Klemantin mandarinin 1. bağlantı gurubu 161. 6 cM uzunluğunda olup bu bağlantı grubunda 34 markör yer almıştır. Bu 34 markör genomun % 10' unu kapsamıştır. İki markör arasındaki ortalama mesafe 4.74 cM olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen iki SSR markörü 1. bağlantı grubunda yer almıştır (Şekil 4.7).

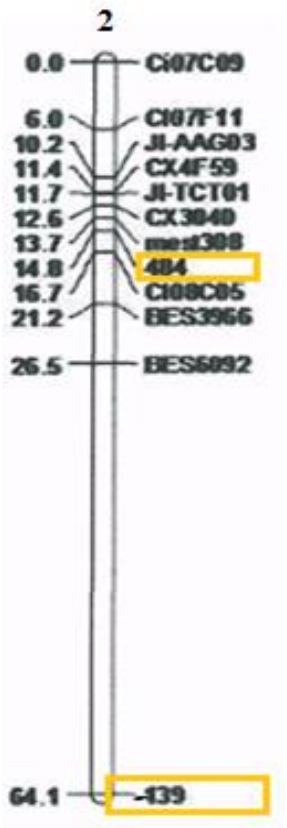


Şekil 4.7. Klemantin mandarinin 1. bağlantı grubu.

Şekil 4.7'deki soldaki rakamlar cM olarak markörler arasındaki uzaklığı belirtmektedir. Kutunun içine alınmış markörler ise bu çalışmaya ait olan SSR markörlerini göstermektedir.

4.3.2.1.(2) Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 2. Bağlantı Grubu Bulguları

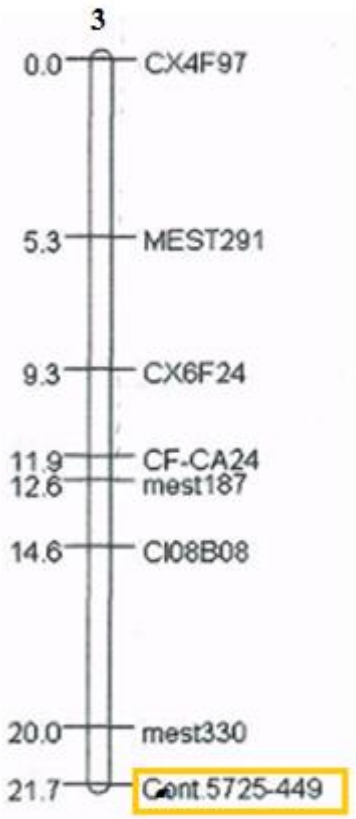
Klemantin mandarinin 2. bağlantı gurubu 64.1 cM uzunluğunda olup toplamda 12 markör yer almaktadır ve bu 12 markörden 2 adedi bu çalışmanın sonucundan elde edilmiştir. 12 SSR markörü genomun % 4'ünü kapsamıştır. Bağlantı grubunda yer alan her iki markör arasındaki ortalama mesafe 5.34 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Klemantin mandarinin 2. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(3) Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 3. Bağlantı Grubu Bulguları

Klemantin mandarinin 3. bağlantı grubu 21.7 cM uzunluğunda olup, 1 adedi bu çalışmadan olmak üzere toplamda 8 markör yer almıştır. Sekiz markör genomun % 1.36'sını kapsamaktadır. Bu bağlantı grubunda iki markör arasındaki ortalama mesafe 2.71 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).

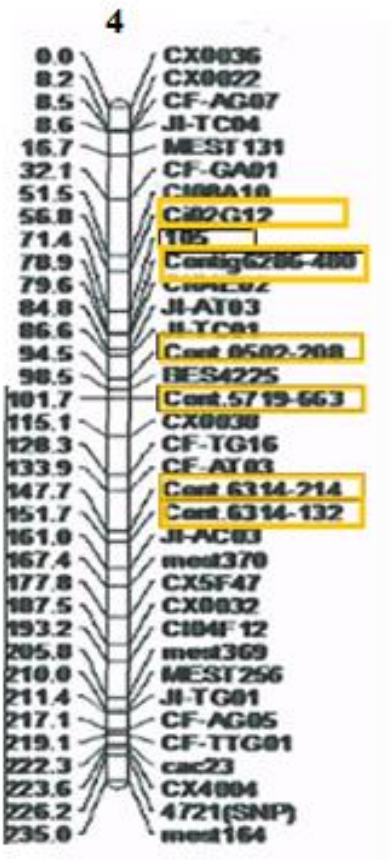


Şekil 4.9. Klemantin mandarinin 3. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(4). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 4. Bağlantı Grubu Bulguları

Klemantin mandarinin 4. bağlantı grubu, 235 cM büyüklüğünde olup en uzun bağlantı grubunu oluşturmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen 7 SSR markörü ile diğer ülkelerin elde ettiği 28 SSR markörü olmak üzere toplamda 35 SSR markörü yer almıştır. Bu bağlantı grubu genomun % 14.69'unu kapsamaktadır.

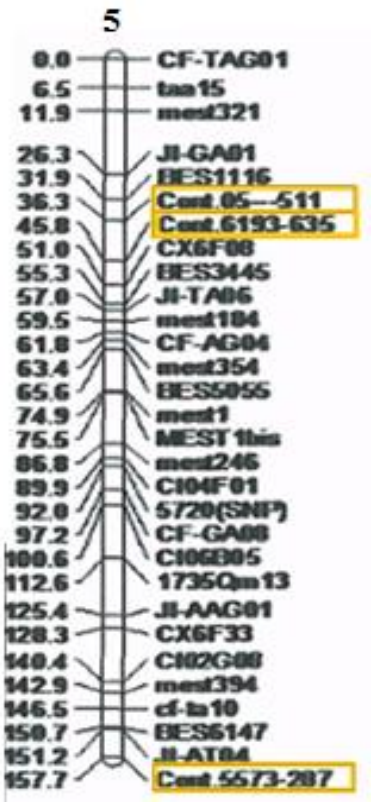
İki markör arasındaki ortalama uzaklık 6.71 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Klemantin mandarinin 4. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(5). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 5. Bağlantı Grubu Bulguları

Klemantin mandarinin 5. bağlantı grubu, 157.7 cM uzunluğunda olup, bu bağlantı grubunda toplamda 30 markör yer almıştır. Otuz SSR markörünün 3 adedi bu çalışmanın sonucundan elde edilmiş olup genomun % 9.86'sını kapsamaktadır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 5.26 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Klemantin mandarinin 5. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(6). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 6. Bağlantı Grubu Bulguları

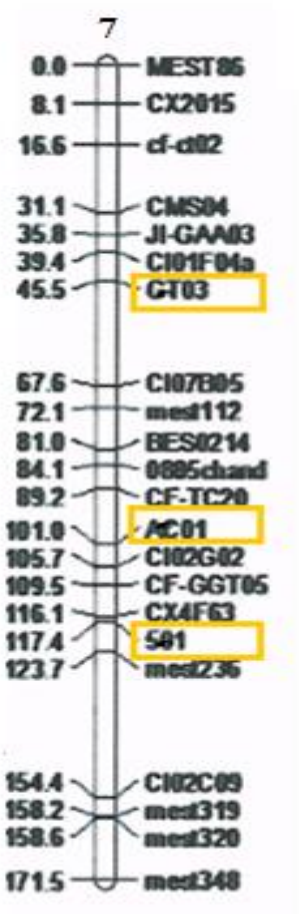
Klemantin mandarinin 6. bağlantı grubu, 137.3 cM büyüklüğünde olup, toplamda 35 SSR markörü yer almıştır. Bunlardan 3 adedi bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir. Genomun % 8.58'ini içermektedir. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 3.92 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Klemantin mandarinin 6. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(7). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 7. Bağlantı Grubu Bulguları

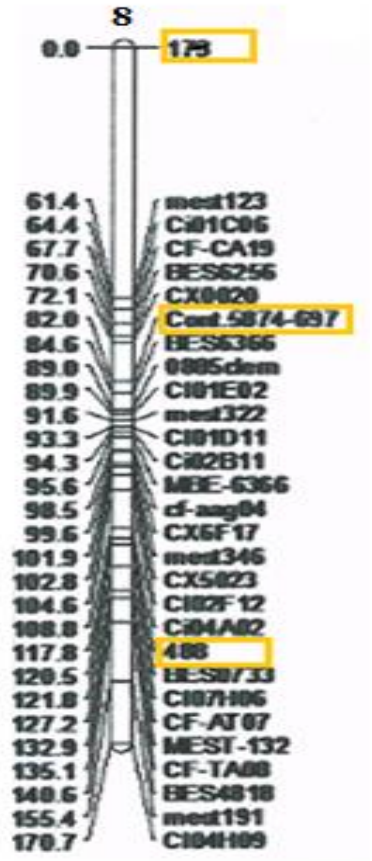
Klemantin mandarinin 7. bağlantı grubu, 171.5 cM büyüklüğünde bir bağlantı grubu olup, bu çalışmanın sonucundan elde edilen 3 SSR markörü ile toplamda 22 markör yer almıştır. Bu da genomun % 10.72'sini kapsamaktadır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 7.80 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Klemantin mandarinin 7. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(8). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 8. Bağlantı Grubu Bulguları

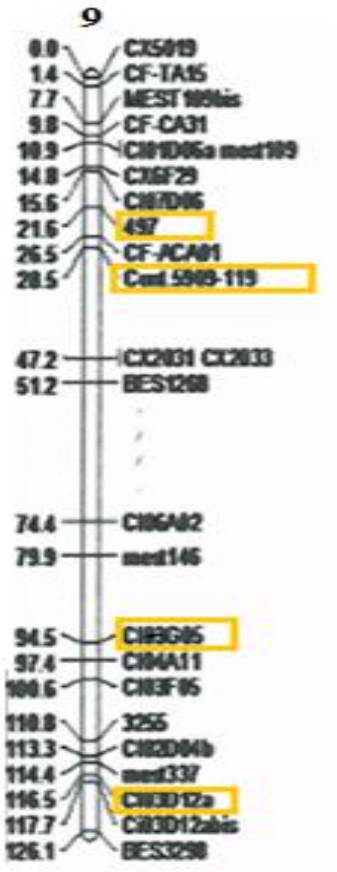
Klemantin mandarinin 8. bağlantı grubu, 170.7 cM büyüklüğünde olup 29 markör içermektedir. Bu markörlerden 3 adedi bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir. Genomun % 10.67' sini kapsamaktadır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 5.89 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Klemantin mandarinin 8. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(9). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 9. Bağlantı Grubu Bulguları

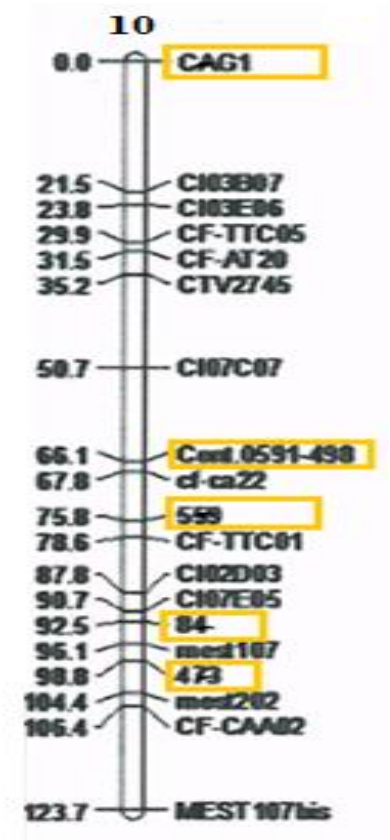
Klemantin mandarinin 9. bağlantı grubu 126.1 cM büyüklüğünde olup, 23 markör içermektedir. Dört SSR markörü bu çalışmanın sonuçlarından ve 19'u diğer ülkelerin sonuçlarından elde edilmiştir. Bu bağlantı grubu genomun % 7.88' ini kapsamaktadır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 5.84 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Klemantin mandarinin 9. bağlantı grubu.

4.3.2.1.(10). Klemantin Mandarini Genetik Haritasının 10. Bağlantı Grubu Bulguları

Klemantin mandarinin 10. bağlantı grubu 123.7 cM büyüklüğünde olup, 19 markör yer almaktadır. Bu markörlerden 5 adedi bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir. Bu bağlantı grubu genomun % 7.73' ünü kapsamaktadır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık 6.51 cM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Klemantin mandarinin 10. bağlantı grubu.

Diğer araştırmacılar tarafından turunçgil türlerine ait, yapılan haritalama çalışmalarında, Cai ve ark. (1994), RAPD ve RFLP markörleri ile *Citrus grandis* (L.) Osb. X [*Citrus grandis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]'nın BC_1 populasyonunu kullanarak 9 bağlantı grubu içeren ve 1192 cM uzunluğa sahip olan kompleks bir bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Bununla birlikte Cristofani ve ark. (1999), *Citrus sunki* ve *Poncirus trifoliata* 'ın genetik bağlantı haritalarını ve CTV' ye dirençli gen bölgesini haritalamak amacıyla yaptıkları çalışma sonucunda toplam uzunluğu 1599.20 cM olan 2 harita oluşturmuşlardır ve ayrıca haritada *Citrus sunki*'de 10 bağlantı grubu ve *Poncirus trifoliata*' da 8 bağlantı grubu oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca turunçgillerde RFLP, RAPD ve izoenzim markörleri kullanılarak yapılmış olan genetik haritalama çalışmalarına ISSR moleküler markörleri eklenerek Sankar ve ark. (2001), tarafından yapılan bu çalışmada toplam uzunluğu 874 cM olan ve 9 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturmuşlardır. Oliveira

ve ark. (2007), Citrus' un *Xf (Xylella fastidiosa)*'ye kantitatif direnç lokusunun tanımlanması amacıyla yapılan bu çalışmada, CVC' ye dirençli olduğu bilinen, 'Murcott' tangor ve 'Pera' portakal çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada fAFLP markörü ile 87 BC_1 populasyonu kullanılmış ve her bir çeşit için ayrı bir harita oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda Murcott' çeşidi için toplam uzunluğu 1651.47 cM olan ve 9 bağlantı grubu içeren bir harita oluşturulmuş. 'Pera' portakal çeşidi için toplam uzunluğu 1596.2 cM olan ve 5 bağlantı grubu içren bir harita oluşturulmuştur. Son olarak da Şahin-Çevik ve Moore (2007), Cinsler arası karmaşık {*C. grandis (L.) Osb. x [C. paradisi Macf. x P. trifoliata (L.) Raf.*]} x {[(*C. paradisi Macf. x P. trifoliata (L.) Raf.) x C. reticulata Blanco*] x [(*C. paradisi Macf. x P. trifoliata (L.) Raf.)* x *C. sinensis (L.) Osb.]}* çaprazlanmasından elde edilen bitki populasyonu içerisinden 30 ağaç rastgele seçilmiş ve bitkilerden toplanan yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda oluşturulan genetik haritanın toplam uzunluğu 314.8 cM ve markörler arasındaki ortalama harita mesafesinin 507 cM olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda Klemantin mandarinin genetik haritası bağlantı gruplarının sayısı, turunçgil genomunun haploid kromozom (n=9) sayısından bir fazla olduğu saptanmıştır. Bunun en büyük nedeninin araştırmada kullanılan lokus (primer) sayısının yeterli düzeyde olmamasından kaynaklanabilir. Primer sayısının arttırılmasıyla genomu daha fazla kapsayacak harita oluşturulacak ve beklenen 9 bağlantı grubu elde edilecektir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda aynı populasyonun kullanılarak daha fazla primerle taranması ve farklı moleküler markörler kullanılarak genomun daha fazla bölgesinin amplifiye edilmesi gerekmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Turuçgiller, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde iç ve dış pazar için üretilen önemli besin değerine sahip meyve türlerini içermektedir. Dünyada 124 milyon ton üretimi ile en büyük ekonomik öneme sahip meyve gruplarından biridir. Bununla birlikte turunçgil endüstrisi biyotik ve abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Pazar, yüksek meyve kalitesine sahip ve geniş bir derim dönemi istemektedir. Turunçgil ıslahı, dünya turunçgil endüstrisi için çok önemlidir. Fakat karmaşık ıslah sistemleri ve genetik çeşitliliğin organizasyonu turunçgil ıslahının süresini uzatmakta ve zorlaştırmaktadır. Bu nedenle moleküler ve biyoteknolojik yöntemlerin ıslah sürecinde kullanılması zorunluluk haline gelmiştir.

Genetik bağlantı haritaları belirli hedefler kapsamında yapılan melezleme çalışmaları sonucunda elde edilen populasyonlarda rekombinasyon sıklığına göre genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerini ve sırasını belirler. Özellikle çok yıllık bitkilerde melezleme sonucunda elde edilen bitkilerde uzun gençlik kısırlığı süreci, bitki boylarının büyüklüğü, melez bireylerin dış koşullarda karakterizasyonları ve değerlendirilmeleri için çok büyük alanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla klasik ıslah yöntemlerini kullanmak yüksek yatırımlar gerektirmekte ve çok zaman almaktadır (Gülşen, 2010). İşte bu nedenlerden dolayı turunçgiller gibi çok yıllık bitkilerde genetik haritalama çalışmaları önem kazanmıştır. Elde edilen genetik haritalar kısa sürede bitkilerin seleksiyonuna veya belirli özelliklerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

Turunçgiller diploid ve dokuz kromozoma sahip olması, genom büyüklüğünün diğer bitkilere göre nispeten küçük olması ve polimorfizm oranının yüksek olması nedeniyle genetik haritaların oluşturulması için uygun bir türdür. Tüm bunların yanı sıra türler ve cinsler arası melezlemelerin yapılabilmesi genetik haritalama çalışmalarında diğer bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

İyi bir genetik harita genomun her kromozomuna karşılık gelen bir linkage (bağlantı) grubu içermelidir. Her bağlantı grubu doğrusal olarak sıralanmış markör ve/veya genlerden oluşur. Turunçgil ıslahında genetik haritalamanın amacı MAS (markörler yardımıyla seleksiyon) için kullanılabilecek bir markör tanımlamaktır.

Klemantin mandarinin genetik haritanın oluşturulması amacıyla yapılan bu tez çalışması kapsamında 116 adet SSR primer çifti kullanılmıştır. Bu primerlerin 9 tanesi beklenen oranlardan (Mendel oranlarından) sapma göstermiş, 10 tanesi monomorfik, 46 primer çifti polimorfizm göstermiş ve geriye kalan 51 primer çifti ise istenilen kalitede amplifikasyon göstermemiştir. Beklenen değerdeki genotipik frekanslardan sapma ve açılımın olması segregasyon distortion (Mendel açılımına uymayan açılımlar) olarak adlandırılmakta ve haritalama çalışmalarında kullanılmamaktadır. Bu sapmalar genetik haritalarda sıklıkla görülen bir durumdur ve bitkilerde türlere, haritalamada kullanılan moleküler markörlere ve açılım populasyonuna göre değişmektedir. Mendel açılımına uymayan sapmalar çok sayıda faktörün sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Markörlerde, Mendel oranlarından sapmalar: Genler arasında görülen, eksik dominanslık, letal (öldürücü) genlerin çekinik durumda olması, epistazi gibi etkileşimler sonucunda oluşabilmektedir (Öner, 2003). Genler arasındaki etkileşimlerin yanı sıra bazı bitkilerde görülen özellikle de turunçgillerde poliembriyoni durumunun varlığı, genoma ait bir kromozom parçasının veya kromozom üzerinde bazı allellerin kaybolması sonucu hem melez bireylerin hem de gametlerin canlı kalmasına veya ölmesine etki eden veya melez bireylerde bazı özelliklerin açığa çıkmasına sebep olan yeni allel kazanımlarının meydana gelmesi gibi faktörlerde sapmalara neden olabilmektedir (Bradshaw ve Stettler, 1994). Populasyonlara ait genomik analizlerde genotiplerdeki ve istatiksel analizlerdeki hatalar beklenen açılım oranlarında meydana gelen sistematik sapmalara neden olmaktadır. Mendel açılımına uymayan sapmalar, birçok türün genetik haritalarının, oluşturulmasını etkileyen önemli faktördür. Markörler arası genetik uzaklık ve bağlantı grupları üzerindeki markörlerin sırası bu sapmalardan etkilenebilmektedir (Özatay, 2007).

Turunçgil genetik haritalama çalışmalarında “distorted segregasyon” olarak adlandırılan beklenen Mendel açılımını göstermeyen markör oranı RFLP çalışmalarında % 37 (Durham ve ark., 1992) RAPD çalışmalarında % 40 (Cai ve ark., 1994), RFLP ve izoenzim kullanıldığı haritalama çalışmalarında % 20 (Jarell ve ark., 1992) mikrosatellit markörlerinin kullanıldığı haritalama çalışmalarında % 22

olarak saptanmıştır (Kijas ve ark., 1997). Bu çalışmada SSR markörleri kullanarak oluşturulan haritada sapma oranı % 29 olarak saptanmıştır.

Klemantin mandarinin, genetik haritasının birinci aşamasında oluşturulan ve sadece bu tez çalışmasından elde edilen verilerle gerçekleştirilen genetik haritada, 26 SSR markör yer almış ve 9 bağlantı grubu elde edilmiştir. Haritanın bağlantı gruplarında yer alan markörlerinin sayısı ve sırası şu şekildedir; Haritanın 1. bağlantı grubunda 473, 84, 559 ve 178 olmak üzere toplamda dört markör yer almıştır.
İkinci bağlantı grubunda toplamda 3 (Ci03D12a, Ci03G05 ve 161) SSR markörü yer almıştır. Üçüncü bağlantı grubunda yer alan markörler sırasıyla 497 ve Cont.6458-179 markörleridir. Dördüncü bağlantı grubunda toplamda 6 SSR markörü yer almış ve bu bağlantı grubu en fazla markör sayısını içeren bağlantı grubudur. Bağlantı grubunda yer alan markörler sırasıyla Cont.6314-132, Cont.6314-214, Cont.5719-663, Cont.6286-480, Cont.5376-72, Cont.0502-208 markörleridir. Beşinci bağlantı grubunda 488 ve Cont.5874-697 markörleri yer almıştır. Altıncı bağlantı grubunda toplamda 54 ve Mest431 SSR markörleri yer almıştır. Yedinci bağlantı grubunda toplamda 3 SSR (Cont.0245-955, Cont.5708-571 ve Cont.5362-214) markörü bulunmaktadır. Sekizinci bağlantı grubunda 472 ve AC01 markörleri yer almıştır. Dokuzuncu ve son bağlantı grubunda ise AG14 ve Cont.5628-840 markörlerinin bulunduğu saptanmıştır.

Genetik haritanın II aşamasında ise bu çalışmadan elde edilen polimorfik 46 SSR markörü kullanılarak, bunlardan 33 SSR markörü ile diğer araştırma enstitüleri ve üniversitelerden gelen toplam 214 SSR primeri birleştirilmiş ve Klemantin mandarini'in genetik haritası oluşturulmuştur. Oluşturulan genetik harita 1369,40 cM büyüklüğünde olup, tüm genomun % 85'ini kapsayacak nitelikte bulunmuştur. Toplam 10 bağlantı grubu elde edilmiş ve bu bağlantı gruplarında iki markör arasındaki ortalama uzaklık 5.4 cM olarak tespit edilmiştir.

Birinci bağlantı grubunda 34 SSR markör arasında yer alan **2** SSR markörü (Cont.5628-840 ve Ci03C08) bu çalışmanın verileri ile elde edilmiştir.

İkinci bağlantı grubunda yer alan 12 SSR marköründen **2** SSR (484 ve 139) markörü bu çalışmanın sonucundan elde edilmiştir.

Üçüncü bağlantı grubunda bulunan 8 SSR marköründen **1** SSR markörü (Cont.5725-449) bu çalışmanın verileri ile elde edilmiştir.

Dördüncü bağlantı grubunda yer alan 35 SSR marköründen **7** SSR markörü (Ci02G12, 105, Cont.6286-480, Cont. 0502-208, Cont.5719-663, Cont.6314-214 ve Cont.6314-132) bu çalışmanın verileri ile elde edilmiştir.

Beşinci bağlantı grubunda yer alan 30 SSR marköründen **3**'ü (Cont.0599-511, Cont.6193-635 ve Cont5573-287) bu çalışmanın verileri ile elde edilmiştir.

Altıncı bağlantı grubunda bulunan 35 SSR marköründen **3'** ü(Cont.5485-526, Cont.0245-955 ve Cont.5362-214) bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir.

Yedinci bağlantı grubunda bulunan 22 SSR marköründen **3**' ü (GT03, AC01 ve 501) bu çalışmanın sonucundan elde edilmiştir.

Sekizinci bağlantı grubunda yer alan 29 SSR markörü içerisinden **3**' ü (173, Cont.5874-697 ve 488) bu çalışmanın verileri ile elde edilmiştir.

Dokuzuncu bağlantı grubunda bulunan 23 SSR marköründen **4**'ü (497, Cont.5909-119, Ci03G05 ve Ci03D12a) bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir.

Onuncu bağlantı grubunda yer alan 19 SSR marköründen **5**'i (CAG1, Cont.0591-498, 559, 84 ve 473) bu çalışmanın sonuçlarından elde edilmiştir.

Bu çalışma, "**Turungil Genom Projesi**" çerçevesinde halen devam etmekte olup 2011 yılında tamamlanması planlanmaktadır. Projenin sonucunda mandarin ve turunçgillerin atası olduğu düşünülen diğer bazı turunçgil türlerine ait bilgilerin de elde edilmesi beklenmektedir. Son olarak bu projenin tamamlanması ile önemli karakterleri kontrol eden genlerin tanınması ve klonlanması sağlanabilecek ileriki aşamalarda markörler yardımıyla erken seleksiyona olanak sağlayacaktır. Bilindiği gibi turunçgil ıslahı uzun soluklu çalışmaları gerektirmektedir. Oluşturulacak olan bu genetik harita ve genlere yakın markörlerin tespit edilmesi ıslah programlarına harcanan emek ve para miktarını da uzun vadede azaltacaktır.

KAYNAKLAR;

AKA-KACAR, Y., 2003. Bitkilerde DNA İzolasyonu Alatarım 2,(2) 1-3

ALWALA, S., KIMBENG, C. A., VEREMIS, J. C., GRAVOIS, K. A., 2008. Linkage Mapping and Genome Analysis in a *Saccharum* Interspecific Cross Using AFLP, SRAP and TRAP Markers. Euphytica. 164: 37-51.

ANONİM, 2009. www.genetikbilimi.com

ANONİM, 2010a. www.citrusvariety.ucr.edu

ANONİM, 2010b. www.citrusvariety.ucr.edu

BAIRD, W.V., BALLARD, R.E., RAJAPAKSE, S., ABBOTT, A.G., 1996. Progress in Prunus Mapping and Application of Molecular Markers to Gerplasm Improvement. Hort Sci. 31(7):1099-1106.

BARKLEY, A.N., 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.

BOYACI, H.F., 2007. Patlıcanlarda fusarium solgunluğuna dayanıklılık. Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 97s.

BRADSHAW, H.D, and STETTLER, R.F., 1994. Molecular Genetics of Growth and Development in Populus 2. Segregation Distortion due to Genetic Load. Theor. Appl. Genet. 89: 551–558.

BURR, B., BURR, F.A., THOMPSON, K.H., ALBERTSEN, M.C., STUBER, C.W., 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics, 118; 519-526.

BÜYÜKÜNAL BAL, E.B., 2003. Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 6(2): 34-40

CAI, Q., GUY, C.L., MOORE, G.A., 1994. Extension of the linkagemap in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold- acclimation responsive loci. Genetics., 89: 606-614.

CHEN, C., BOWMAN, K.D., CHOI, Y.A., DANG, P.M., RAO, M.N., HUANG, S., SONEJI, J.R., MCCOLLUM, T.G., GMITTER, F.G., 2008. EST-SSR genetic maps for Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. Tree Genetics & Genomes, 4:1–10.

CORAZZA-NUNES, M.C., MACHADO, M.A., NUNES, W.M.C.,CRISTOFANI, M., TARGON, M.L.P.N., 2002. Assessment of Genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos *(C. maxima (Burm.) Merr.)* using RAPD and SSR markers. *Euphytica.* 126:169-176.

CRISTOFANI, M.A., MACHADO, V.M., NOVELLI, A.A., DE SOUZA, M.L., TARGON, P.N., 2000. Construction of Linkage Maps of *Poncirus trifoliate* and *Citrus sunki* Based on Microsatellite Markers. Proc. Int. Citricult. IX Congr. p. 175-178.

ÇALIŞKAN, 2005. RAPD analizi ile güllerde *(rosa sp.)* genetik tanımlama. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 84s

DALKILIÇ, Z., 1999. Identification and Mapping of Genes for Alternaria and Phytopthora Disease Resistance in *Citrus* Hybrids. Univ. Florida. Ph.D. dissertation.

DENG, Z. N., GENTILE, A., NICOLASI, E., DOMINA, F., VARDI, A., and TRIBULATO, E., 1995. Identification of *in vivo* and Lemon Mutants by RAPD Markers. Journal of Horticultural Science. 70(1): 117-125.

DENG, Z.N. GENTILE, A., NICOLOSI, E., CONTINELLA, G., TRIBULATO, E., 1996. Parentage Determination of some Citrus Hybrids by Molecular Markers. Proc. Int. Soc. Citricult. VIII. Congr. 2: 849-854

DENG, Z., HUANG, S., LING, P., YU, C., TAO, Q., CHEN, C., WENDELL, MK., ZHANK, H.B., GMİTTER JR, F.G., 2001. Fine genetic mapping and BAC contig development fort the citrus tristeza virus reisistance gene locus in Poncirus trifoliata(Raf.) Mol Genet Genomics., 265: 739-747.

DUBCOVSKY, J., LUO, M.C., ZHON G.Y., BRANSTEITTER R., DESAI A., KILIAN, A., KLEINHOFS, A., DVORAK, J., 1996. Genetic Map of Diploid Wheat, *Triticum mmococcum* L., and Its Comparison With Maps of *Hordeum uulgare* L. Genetics., 143 983-999.

DURHAM, R.E., LIOU, P.C., GMITTER JR, F.G., MOORE, G.A., 1992.Linkage of restriction fragment length polimorphisims and isozymes in Citrus.Theor Appl Genet., 84:39-48.

ECHT, C.S., KNAPP, S., LIU, B.H., 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using GMendel 2.0. Maize Genet. Coop. Nwsl., 66, 27-29.

ERGÜL, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmak izi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 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, 2009. Statisical database of agricultural production. http://faostat.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. App. Genet. 96:812-822.

FRENGE, M., ANGEL, F., GOMEZ, R., RODRIGUEZ, F., CHAVARRIAGA, P., ROCA, W., TOHME, J., BONIERBALE, M., 1997. A molecular genetic map of cassava (Manihot esculenta Crantz). Theor Appl Genet., 95 : 431-441.

GARCIA, R., ASINS, M.J., FORNER, J., CARBONELL, E.A., 1999. Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. Theor Appl Genet., 99: 511-518.

GARCIA, R., ASINS, M. J., CARBONELL, E.A., 2000. QTL Analysis of Yield and Seed Number in *Citrus*. Theor. Appl. Genet. 101:487-493.

GMITTER JR, F.G., XİAO, S.Y., HUANG, S., HU, X.L., GARNSEY, S.M., DENG, Z., 1996. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. Theor Appl Genet., 92:688-695.

GÖKSEL, Ç., 1999. RAPD Markörleriyle Bazı Mandarin Çeşitlerinin Tanımlanması.Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

GRAHAM, J., SMITH, K., MACKENZIE, K., JORGENSON, L., HACKETT, C., and POWELL, W., 2004. The Construction of A Genetic Linkage Map of Red

Raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) Based on AFLPs, Genomic-SSR and EST-SSR Markers. Theor. Appl. Genet., 109: 740-749.

GÜLŞEN, O., UZUN, A., KAFA, G., 2006 Turunçgillerde Vegetatif Özelliklerin Kalıtımı: Üç Farklı F1 Populasyonunda Çöğür Gelişimi ve Kendileme Depresyonu, Alatarım Dergisi, *5 (1): 1-9*

GÜLŞEN, O., UZUN, A., CANAN, İ., SEDAY, U., CANİHOS, E., 2010. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. Euphytica; 173:265-277.

HARUSHIMA,Y.,YANO,M.,SHOMURA,A.,SATO,M.,SHIMANO,T.,KUBOKI,Y., YAMAMOTO, T., LIN,S.Y., ANTONIO,B.A., PARCO, A., KAJIYA, H.,HUANG, N., YAMAMOTO K., NAGAMURA, Y.,KURATA, N.,KHUSH G.S.,SASAKI, T., 1998. A High-Density Rice Genetic Linkage Map with 2275 Markers Using a Single F_2 Population. Genetics., 148: 479–494

JARRELL, D.C., ROOSE, M.L., TRAUGH, S.N., KUPPER, R.S., 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. Theor Appl Genet 84: 49-56.

JOOBEUR,T., VIRUEL, M.A.,DE VICENTE,M.C.,JAUREGUI, B., BALLESTER, J., DETTORI, M.T., VERDE, I.,TRUCO, M. J., MESSEGUER, R.,BATLLE, I., QUARTA, R., DIRLEWANGER, E., ARUS, P., 1998. Construction of a saturated linkage map for Prunus using an almond3peach F_2 progeny. Theor Appl Genet., 97: 1034-1041.

KARAHOCAGİL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.

KIYGA, Y., 2009. Osmanlı x Camarosa çilek melezlerinden morfolojik ve pomolojik karakterizasyonu. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Hatay, 45s.

KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S., THOMAS, M.R., 1995. An evaluation of sequence-tagged microsatellite-site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome., 38: 349-355.

KIJAS, J.M.H., THOMAS, M.R., FOWLER, J.C.S., ROOSE, M.L., 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. Theor Appl Genet., 94: 701-706.

KUBISIAK, T.L., NELSON, C.D., NANCE, W.L., STINE, M., 1995. RAPD Linkage Mapping in a Longleaf Pine x Slash Pine F1 Family. Theor. Appl. Genet., 90: 1110-1127.

LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, DALY, M.J., LINCOLN, S.E. AND NEWBERG, L. 1987. MAPMAKER, An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1; 174-181.

LANDRY B.S., KESSELI R.V., FARRARA, B., MICHELMORE R.W., 1987 A Genetic Map of Lettuce *(Lactuca sativa* L.) With Restriction Fragment Length Polymorphism, Isozyme, Disease Resistance and Morphological Markers. Genetics., 116: 331-337.

LA ROSA, R., ANGIOLILLO, A., GUERRERO, C., PELLEGRINI, M., RALLO, L., BESNARD, G., BERVILLE, A., MARTIN, A., 2003. A First Linkage 178 Map of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars Using RAPD, AFLP, RFLP and SSR Markers. Theor. Appl. Genet. 106: 1273-1282.

LAVI, U., CREGAN, P., SCCHAP, T., and MILLEL, J., 1994. Amplification and Breeding of Perennial Fruit Crops. In J. Janick (ed) Plant Breeding Reviews. John Wiley Sons, Inc: NY Vol:397-401.

LIOU, P.C., GMİTTER JR, F.G.,MOORE, G.A.,1996. Charecterization of the Citrus genome through analysis of restriction fragment length polimorpisims. Theor Appl Genet., 92: 425-435.

LYON, M.T., FEDERICI, C.T., KAÇAR, Y., CHEN, C., O'MALLEY, D., CHAPARRO, J.X., GMITTER JR, F.G., ROOSE, M.L., 2007. SSR based linkage maps for sweet orange and trifoliate orange Plant & Animal Genome XV, San Diego, C.A., January 13-17.

LURO, F., LAIGRET, F., LORIEUX, M., OLLITRAULT, P., 1996. Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. Proc Intl Soc Citricult 2:862–866

MALIEPAARD, C., ALSTON, F.H., VAN ARKEL, G., BROWN, L.M., CHEVREAU, E., DUNEMANN, F., EVANS, K.M., GARDINER, S., GUILFORD, P., VAN HEUSDEN A.W., JANSE, J., LAURENS, F., LYNN,

J.R., MANGANARIS, A.G., DEN NIJS, A.P.M., PERIAM, P., RIKKERINK, E., ROCHE, P., RYDER, C., SANSAVINI, S., SCHMIDT H., TARTARINI, S., VERHAEGH, J.J., GINKEL, M.V., KING, G.J., 1998. A ligning male and female linkage maps of apple (Malus pumila Mill.) using multi-allelic markers. Theor Appl Genet., 97: 60-73.

MANLY, K.F., ELLIOT, R.W., 1991. MapManager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. Mammalian Genome, 1; 123-126.

MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R., 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. Genome., 38:715-723.

NICOLOSI, E., DENG, Z. N., GENTILE, A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., TRIBULATO, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor. Appl. Genet., 100: 1155-1166.

NOVELLI, V. M., TAKITA, M. A., MACHADO, M. A., 2004. Identification and analysis of single nucleotide polymorphism (SNPs) in *Citrus*. Euphytica, 138: 227–237.

NOZAKI, T., KUMAZAKI, A., KOBA, T., ISHIKAWA, K., ILKEHASHI, H., 1997. Linkage analysis among loci for RAPDs, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L. Euphytica., 95: 115-123.

OLIVEIRA, R.P., VILDOSO, C.I.A., CRISTOFANI, M., MACHADO, M.A.,2004. Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*, Genet. Mol. Biol.vol .27 no.3 São Paulo, Print ISSN., 1415-4757.

OLIVEIRA, AC., BASTIANEL, M., CRISTOFANI, M., AMARAL, AM, MACHADO, MA., 2007. Development of genetic maps of the citrus varieties ‘Murcott’ tangor and ‘P_ra’ sweet orange by using fluorescent AFLP markers. Appl Genet 48(3), pp. 219–231.

ÖNER, C., 2003. Ökaryotlarda Gen Bağlantısı (Linkaj), Krosover ve Haritalama, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, Ankara, 816 s.

ÖZATAY, Ş., 2007. Mercimek genomunun AFLP, RAPD, ISSR ve bazı morfolojik markörler kullanılarak haritalanması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı; Doktora tezi, 64s.

ÖZCAN, S., GUREL, E., BABAOĞLU, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, ISBN: 975-6652-05-5.

PARAN, I., MICHELMORE, R.W., 1993. Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theor. Appl. Genet. 85:985-993.*

PATERSON, A.H., 1996. Making Genetic Maps. IN: Paterson AH (ed), Genome Mapping in Plants. Academic Pres, New York, p.23-27.

RAFALSKI, J. A., and TINGEY, S. V., 1993. Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsattellites and Machines. TIG, 9(8): 275-279.

RAJAPAKSE, S., BELTHOFF, L.E., HE, G., ESTAGER, A.E., SCORZA, R., VERDE, I., BALLARD, R.E., BAİRD, W.V., CALLAHAN, A., MONET, R., ABBOTT, A.G., 1995. Genetic Linkage Mapping in Peach Using Morphological, RFLP and RAPD Markers. Theor. Appl. Genet., 90:503-510.

REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMAN, K.A., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A., 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc.Natl.Acad.Sci., USA 89, 1477-1481.

RIAZ, S., DANGL, G.S., EDWARDS, K.J. and MEREDITH, C.P., 2004. A Microsatellite Based Framework Linkage Map of *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet., 108: 864–872.

RICHMOND, T.A., SOMERVILLE, C.R., 2001. Integrative Approaches to Determining Csl Function.Plant Mol. Biol 47: 131-143.

ROOSE, M.L., 2000. Linkage Mapping and Marker-Assisted Selection in *Citrus*. In: Proc. Int. Soc. Citriculture. IX Cong. pp.69-70.

ROOSE, ML., 2007. Mapping and Marker-assisted Selection. Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside, CA:92521.

RUIZ, C., ASINS, M.J., 2003. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. Theor Appl Genet 106: 826-836.

SANKAR, A.A., MOORE, G.A., 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. Theor Appl Genet., 102: 206-214.

SARGENT, D.J., DAVIS, T.M., TOBUTT, K.R., WILKINSON, M.J., BATTEY, N.H., SIMPSON, D.W., 2004. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid Fragaria. Theor Appl Genet ., 109: 1385–1391.

SCHLOTTERER, C., TAUTZ, D., 1993. Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. Nucleic Acid Research., 20:211-215.

SIMONE, M. De., RUSSO, M.P., PULEO, G., MARSAN, P.A., LORENZONI, C., MAROCCO, A., REFORGIATO, G.R., 1998. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. Fruits 53: 383-390.

SONG, Q.J.,·MAREK, L.F., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., CONCIBIDO, V.C., DELANNAY , X., SPECHT, J.E., CREGAN P.B., 2004. A new integrated genetic linkage map of the soybean. Theor Appl Genet., 109:122–128.

SOOST, R.K., ROOSE, M.L., 1996. Citrus. In: Fruit Breeding. Vol. I. J. Janick ve J. N. Moore. (eds.).pp. 256-323.

STAM, P 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package, JoinMap. Plant J., 3; 739-744.

SUITER, K.A., WENDEL, J.F. CASE, J.S. 1983. Linkage-1, A pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. J. Hered., 74; 203-204.

ŞAHİN-ÇEVİK M., MOORE, G., 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 Turk J Bot (31) 79-86.

TAMAM, A., 2008. Bazı avakado (*Persea americana Mill.*) çeşitlerinin morfolojik ve moleküler karekterizasyonu.Master tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana,113s.

TOPKAYA, Ş., 2008. Domateste erken yanıklık hastalığına dayanıklılık sağlayan genlerin moleküler markörler yardımıyla genetik haritalaması ön çalışmaları. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 57s.

TORRES, A.M., MAU, L.T., WILLIAMS, T.E., SOOST, P.K., 1985. Segregation distortion and linkage of Citrus and Poncirus isozyme genes. J Hered 76: 289-294.

TOZLU, I., GUY, C.L., MOORE, G.A., 1999a. QTL analysis of Na+ and Cl- accumulation related traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and non-saline environments. Genome 42: 692-705.

TOZLU, I., GUY, C.L., MOORE, G.A., 1999b. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and non-saline environments. Genome 42: 1020-1029.

TRAVIS, S.E., RITLAND, K., WHITHAM, T.G. and KEIM, P., 1998. A Genetic Linkage Map of Pinyon pine (*Pinus edulis)* Based on Amplified Fragment Length Polymorphisms. Theor. Appl. Genet., 97: 871-880.

TUZCU, Ö. 2002. Turunçgil Lisans Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (Yayınlanmamış).

VENKATESWARLU, M., RAJE URS, S., SURENDRA NATH, B., SHASHIDHAR, H. E., MAHESWARAN, M., VEERAIAH, T. M. And SABITHA, M. G., 2006. A First Genetic Linkage Map of Mulberry (*Morus* spp.) Using RAPD, ISSR and SSR Markers and Pseudo-testcross mapping Strategy. Tree Genetics and Genomes, 3: 15-24.

VAN OOJIEN, JW., 2006. JoinMap 4.0, software fort he calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.

VARLI, İ., 2009. Microsatellit (SSR) DNA markörlerinin mercimek genom haritalamasında kullanılması. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Şanlıurfa, 48s

VOORRIPS, RE., 2002. MapChart : software fort he graphical presentation of linkage maps and QTLs. Heredity 93: 77-78

WALTON, M., 1993. Moleculer Markers: Which ones to use? Seed World July 1993, p: 23-29.

WEBER, C.A., MOORE, G.A., DENG, Z., GMITTER JR, F.G., 2003. Mapping freeze tolerance quantitative trait loci in a *Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata* F1 pseudo-testcross using molecular markers. J Amer Soc Hort Sci 128: 508-514.

WEBBER, HJ., REUTHER, W., LAWTON, W., 1967. The Citrus İndustry Volume 1 (WEBER, HJ., REUTHER, W., BATCHELOR, LD Edited), Unıted States of America, Library of Congress Catalog Card No: 67-63041, pp 538.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFAELSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acid Res. 18(22): 6531-6535.

YAŞA, Z., 2005. Asmada önemli vegetatif ve generatif karakterler ile hastalıklara dayanım özelliklerine yönelik genom haritalaması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 123s.

YEŞİLOĞLU, T., 2009. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgiller I Ders Notları (Yayınlanmamış)

YILDIRIM, A., KANDEMİR, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, (Ed. Özcan,S., Gürel, E., Babaoğlu, M.) Selçuk Üniversitesi Basımevi.

YILDIZ, M., 2010. Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren P_1 ve Y_2 genlerinin haritalanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 226s

YU, K., PARK, J., POYSA, V., GEPTS, P., 2000. Integretaion of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Moleculer Linkage Map of Common Bean (Phaseolus vulgaris L.). The A marican Genetic Association., 91: 429-434.

ZIETJIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20:176–183.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 2003 yılında başladığı Ç.Ü. Fen Edebiyat Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında yüksek lisans öğrenimine başladı.