ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammet Mustafa SEZER

BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA KURAKLIK İLE İLİŞKİLİ BAZI HAREKETLİ GENETİK ELEMENTLERİN (TRANSPOZON) AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA KURAKLIK İLE İLİŞKİLİ BAZI HAREKETLİ GENETİK ELEMENTLERİN (TRANSPOZON) AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Muhammet Mustafa SEZER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2021, Sayfa: 85
Jüri : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜTÜNCÜ

Turunçgiller, *Rutaceae* familyasının ticari olarak önemli bir cinsidir ve Dünyada yaygın olarak yetiştirilen meyve grubudur. Dünyada tarım alanlarına etki eden stres faktörleri göz önüne alındığında kuraklık stresi etki ettiği alan bakımından %26'lık payla en büyük orana sahiptir. Bu durumda kuraklığa dayanıklı genotiplerin geliştirilmesi oldukça önem kazanmaktadır.

Transpozonlarca zengin turunçgil bitkilerinde transpozon çalışmaları önem kazanmıştır. Transpozonların, bitki genomlarının ortak bileşenleri olduğunu, transkripsiyon ve entegresyon seviyelerinde işlevsellik gösterdiklerini, transpozonların miktar ve transpoze etme yetenekleri onları potansiyel markör haline getirmiştir. Ayrıca transpozonlar zengin bir polimorfizm kaynağı olarak da hizmet ederler. Bu çalışmada; ilk defa Cs18SrR, Cs_Pol-1, CsCLCoy_1, CsCc1-8, Retro_Cc1_32, Sire_Cc1, Sire_Cc1_74 ve Sire_Cc1_83 transpozonlar, kuraklık stresi altında, turunçgil anaçları olarak kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu, Kleopatra mandarin, Makrofilla ve Kaba limon turunçgil anaçlarında çalışılmıştır. İncelenen genotiplerin kök ve yaprak dokularından örnek alınmıştır. Kuraklık stresi uygulanmış 4 farklı anaç genotipinden gen fonksiyonu ve genom üzerinde önemli etkileri bulunan bazı transpozon genlerinin ifade seviyeleri eşzamanlı PCR ile ölçülmüştür.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile kuraklık stresi altındaki bazı turunçgillerin geliştirdiği moleküler düzeyde değişimleri ile ilgili literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır. Elde edilen sonuçlarla, genotipler arasında kullanılan retrotranspozonların gen ekspresyon seviyeleri tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kuraklık Stresi, *Citrus* L., Real-Time PCR, Transpozonlar, Gen İfadesi

ABSTRACT

MSc THESIS

COMPARISON OF THE ACTIVITIES OF SOME MOBILE GENETIC ELEMENTS (TRANSPOSON) ASSOCIATED WITH DROUGHT IN SOME CITRUS ROOTSTOCKS

Muhammet Mustafa SEZER

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2021, Pages: 85
Jury : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Assoc. Prof. Dr. Özhan ŞİMŞEK
: Asst. Prof. Dr. Mehmet TÜTÜNCÜ

Citrus is a commercially important genus of the *Rutaceae* family and is a widely grown fruit group in the world. Considering the agricultural land used in the world, drought stress has the highest rate of 26% among the stress factors. In this case, it is very important to develop drought-resistant genotypes.

Transposon studies have gained importance in citrus plants rich in transposons. Transposons are common components of plant genomes, functioning at transcription and integration levels, and their quantification and transposing abilities make them potential markers. Transposons also serve as a rich source of polymorphism. In this study, Cs18SrR, Cs_Pol-1, CsCLCoy_1, CsCc1-8, Retro_Cc1_32, Sire_Cc1, Sire_Cc1_74 and Sire_Cc1_83 transposons were studied for the first time under drought stress, Tuzcu 31-31, Cleopatra mandarin, Macrophylla and Rough Limon used as citrus rootstocks plants were studied. Samples were taken from the root and leaf tissues of the examined genotypes. Expression levels of some transposon genes, which have important effects on gene function and genome, were measured by real-time PCR in different 4 rootstock genotypes that were subjected to drought stress.

As a result, with this thesis study, new information has been brought to the literature about the changes at the molecular level developed by some citrus fruits under drought stress. With the results obtained, the gene expression levels of the retrotransposons used between genotypes are discussed.

Key words: Drought Stress, *Citrus* L., Real-Time PCR, Transposons, Gene Expression

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller, tropik ve subtropik iklim kuşağında yetişen önemli bir meyve grubudur. Anavatanı Güneydoğu Asya olmasına rağmen besin içeriğinin zenginliği ve ekonomik değerinin yüksek olması turunçgil meyve grubunun, dünyada çok geniş bir coğrafik alanda yetiştirilmesine olanak tanımıştır. Turunçgiller, portakal, limon, mandarin ve altıntop gibi "*Citrus*" cinsine ait türleri içermektedir. Zengin C vitamini içeriğine sahip olan turunçgiller insan sağlığı için oldukça önemlidir.

Dünyada turunçgil yetiştiriciliği 100'den fazla ülkede yapılmaktadır. Turunçgiller arasındaki en iyi bilinen ve üretimi en yaygın yapıldığı türleri; portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limon (*Citrus limon* (L.) Burm. F), mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) ve altıntop (*Citrus paradisi* Macf.)'dur. Turunçgillerin dünya ekonomisindeki yeri gün geçtikçe artmaktadır.

Akdeniz havzası dünya turunçgil üretiminde önemli bir yere sahiptir. Akdeniz havzası içerisinde yer alan ülkemiz, turunçgil yetiştiriciliği bakımından uygun ekolojik koşullara sahiptir. Ülkemizde aktif olarak turunçgil yetiştiriciliği yapılmasına rağmen, standart ıslah yöntemleriyle çok az çeşit geliştirilmiştir. Aynı zamanda ülkemizde turunçgil meyve grubu ile ilgili moleküler ve genetik tabanlı çalışmalar sınırlı olup bu sınırlı çalışmalar turunçgil genomunun yeterince anlaşılamamasına neden olmuştur. Bu nedenle, moleküler yöntemlerin kullanımı değerli genetik bilgilerin elde edilmesine ve elde edilen bilgilerin ıslah programlarında verimli ve etkin bir şekilde kullanılmasına olanak tanıyabilir.

Hareketli genetik elementler olan transpozonlar (Transpoze edilebilir elementler), bencil genetik faktörler olarak tanımlanmaktadırlar ve genellikle hem kopyala-yapıştır (Retrotranspozon) hem de kes ve yapıştır (DNA transpozonu) mekanizmaları aracılığıyla bitki genomu içindeki konumlarını otonom olarak değiştirmektedirler. Transpoze elementlerin (TE), uzun bir süre bir işlevi olmadığı düşünüldüğünden bu genetik elementlere "önemsiz genler" adı verilmiştir.

Genomun büyük bir kısmını oluşturan bu elementler, mobil DNA fragmanları olarak da adlandırılmıştır.

Hareketli genetik elementler olarak tanımlanan Transpoze edilebilir elementlerin, bitki genomunun genişlemesine ve boyutunun artmasına neden olan başlıca faktör olduğu bilinmektedir. Farklı bitki taksonlarının transpozon içeriği, değişkenliği ve fiziksel dağılımı ile ilgili ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları bitki genom organizasyonunun ve evrimsel sürecinin anlaşılmasına büyük katkı sunmuştur. Çok sayıda yer değiştirebilir element, gen ekspresyonunu değiştirerek, stres koşullarına yanıt olarak aktifleşmektedir. TE'ler stresi engellemese bile, farklı çevresel streslere yanıt olarak gen ifadesini değiştirebilir ve stres koşullarında gen regülasyonlarını düzenleyebilmektedirler.

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az miktarda RNA ile hücrede oluşan transkriptlerin saptanmasına ve gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesine olanak tanımaktadır.

Turunçgillerin yaygın olarak yetiştirildiği Çukurova bölgesinde görülen yıllık düşük yağış miktarı ve yüksek sıcaklık sonucu turunçgiller kuraklık stresine maruz kalmaktadır. Kuraklık stresi turunçgillerin gelişimini ve büyümesini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür. Bu durum turunçgil bitkilerinde çeşitli biyolojik tepkilere sebep olup, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler olayları da etkileyerek bitkinin negatif koşullara göre dengeyi koruması için tolerans sistemleri gelişmesini sağlamaktadırlar. Global çapta kullanılabilen tarım arazilerine etki eden çevresel stres etmenleri göz önünde bulundurulduğunda, kuraklık stresinin %26, mineral madde stresinin %20 ve soğuk stresinin %15 oranında etki ettiği tespit edilmiştir. Bunların dışındaki %29’luk bölüm, diğer stres etmenleri etkisinde iken %10’luk kısmı herhangi bir stres etkisi altında değildir.

Tez çalışmasında LTR (Long Terminal Repeats) Retrotranspozon gen ailesine ait yedi farklı genin Tuzcu 31-31, Kleopatra mandarin, Kaba Limon ve Makrofilla anaç genotiplerinde gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve genotipler arasında evrimsel süreçte oluşan retrotranspozon aktivitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda PEG6000 ile %20 kuraklık stresi uygulanmış ve kuraklık stresi uygulanmamış kontrol grubu olmak üzere 4 farklı turunçgil anacı kullanılmış olup bunların kuraklık stresi altında ve kuraklık mekanizması ile ilişkili önemli bir mobil genetik oyuncu olan bazı retrotranspozonların gen ifade düzeyleri analiz edilmiştir. İlgili retrotranspozonlar ilk defa bu çalışmada Tuzcu 31-31 turuncu, Kleopatra mandarin, Makrofilla ve Kaba limon turunçgil anaçlarında gen düzeyinde ifade seviyeleri ölçülmüştür. Retrotranspozonların, yapısal evrimin önemli ve çeşitli bir bileşeni olduğu düşünüldüğünde; özellikle bu retrotranspozonların kuraklık mekanizmasında görevlerinin daha da iyi anlamlandırılması için daha başka bitki türlerindeki gen aktivitelerine araştırılması, farklı retrotranspozonların ekspresyon seviyelerinin çalışılması, kuraklık stresine tepki veren retrotranspozonların diğer türlere aktarılması ve bulguların analiz edilmesi gibi yaklaşımlar ile daha da somut sonuçların ortaya çıkması sağlanacaktır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşturulmasında ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesinde bana zaman ayıran ve bilgilerini paylaşan Sayın Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜTÜNCÜ'ye,

Değerli zamanını ve bilgilerini paylaşan tezimin uygulanması, yazımı ve yorumlanması aşamalarında her türlü desteğini esirgemeyen değerli Biyolog Dr. Emine ACAR'a, Doktora Öğrencisi Melike CENGİZ'e ve Yüksek Lisans Öğrencisi Eda ZEKAİ'ye,

Bitkisel materyalin sağlanmasında Çukurova Üniversitesi Subtropik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne,

Hayatım boyunca beni en iyi şekilde yetiştiren, her anlamda destek olup hedeflerimden geri bırakmayan, hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Babam Ahmet SEZER'e, Annem Hatice SEZER'e, kardeşlerim Ecem SEZER EREN ve Sezen SEZER'e,

Hayatımın her alanında benim yanımda olan, destekleyen ve her zaman varlığını hissettiren hayat arkadaşım Büşra NİZAMOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
KISALTMALAR XVI
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
3. MATERYAL METOT 21
3.1. Materyal 21
3.1.1. Bitkisel Materyaller 21
3.2. Metot 24
3.2.1. Tohumların Sterilizasyonu 24
3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi 25
3.2.3. Stres Uygulamaları 27
3.2.4. Moleküler Analizler 28
3.2.5. RNA İzolasyonu 28
3.2.6. RNA Örneklerinin Kalite ve Kantite Tayini 31
3.2.7. Primer Optimizasyonu 32
3.2.8. cDNA Kütüphanelerinin Hazırlanması 33
3.2.9. cDNA Sentezi Döngü Koşulları 33
3.2.10. Real Time PCR Reaksiyonları 34
3.2.11. Real-time PCR Amplifikasyonu 34
3.2.12. Verilerin Analiz Edilmesi ve Gen Ekspresyon Profillerinin Oluşturulması 35

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 37
4.1. cDNA Sentezi ve Primer Optimizasyonuna Ait Sonuçlar 40
4.2. Genotiplere Ait Dokuların Gen İfade Düzeyleri 41
4.3. Tuzcu 31-31 Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri 42
4.4. Kleopatra Mandarin Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri 49
4.5. Makrofilla Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri 56
4.6. Kaba Limon Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri 63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 75
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 85

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Türkiye'de yıllara göre turunçgil üretimi, tüketimi, kişi başına tüketimi ve meyve fiyatları değerleri (FAO 2020, TÜİK 2020) 3
Çizelge 3.1. PCR reaksiyonları için kullanılacak reaktifler ve hacimleri 32
Çizelge 3.2. Primerlere ait Tm sıcaklıkları 33
Çizelge 3.3. cDNA sentezinde kullanılacak reaktifler ve hacimleri 33
Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılacak genlere ait bilgiler 34
Çizelge 3.5. Real-time PCR reaksiyonları için kullanılacak reaktifler ve miktarları 35
Çizelge 4.1. RNA Örneklerine Ait Değerler (T: Tuzcu 31-31, K: Kleopatra Mandarin, M: Makrofilla, L: Kaba Limon) 39

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Yıllara göre dünya turunçgil üretim miktarlarına ait veriler (Bin ton) 2
Şekil 1.2. Akdeniz Bölgesi'inde bulunan illere ait turunçgil üretim değerleri 3
Şekil 1.3. Türkiye'de bazı önemli turunçgil grubu meyvelerin üretim değerleri 4
Şekil 1.4. Transpozon mekanizmaları (LINE elemanları 6
Şekil 1.5. Bir retrotranspozonun yaşam döngüsünün gösterimi..... 8
Şekil 3.1. Tuzcu 31-31 turuncu 21
Şekil 3.2. Kaba Limon anacı 22
Şekil 3.3. Kleopatra Mandarin..... 23
Şekil 3.4. Makrofilla 24
Şekil 3.5. Tohumların yüzey sterilizasyonu aşaması..... 25
Şekil 3.6. Tohumların çimlendirilmesi amacı ile hormonsuz MS besi yerine alınması 26
Şekil 3.7. Kültüre alınan tohumların çimlenmesi 26
Şekil 3.8. Çimlenen bitkilerin stres ortamına aktarılması aşamaları (a. Bitkilerin MS ortamında çimlenmesi b. Ortamdan çıkarılması c. PEG6000 ortamına aktarılması d. yoğun PEG6000 içeren ortamda bekletilmesi) 27
Şekil 3.9. Stres uygulamasından sonra bitkilerin kök ve gövde olarak ayrılması sonrası etiketlenmiş alüminyum folyolara aktarılması aşamaları..... 28
Şekil 3.10. Anaçlara ait kök dokularının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi 29
Şekil 3.11. RNA izolasyonu aşamaları (a: Santrifüj işlemi, b: Süpernatantın alınması, c: Pelete TE buffer eklenmesi)..... 31

Şekil 3.12. a) RT-PCR amplifikasyonu için reaktiflerin hazırlanması b) Mix hazırlanması c) RT-PCR için plate hazırlanması 35
Şekil 4.1. Kuraklık stresi uygulanmış genotiplerin yaprak ve kök dokularının alınması 38
Şekil 4.2. Bazı RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (*A; 100 kb DNA Ladder*) 40
Şekil 4.3. Genotiplere ait cDNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü (*A; 100 kb DNA Ladder, Numaralar Çizelge 4.1'deki Örnek Numaralarına göre sıralanmıştır*.) 41
Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Cs_Pol-1 genindeki ekspresyon seviyeleri 42
Şekil 4.5. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri 43
Şekil 4.6. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların CsCc1-8 genindeki ekspresyon seviyeleri 44
Şekil 4.7. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri 45
Şekil 4.8. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri 46
Şekil 4.9. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1-74 genindeki ekspresyon seviyeleri 47
Şekil 4.10. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1-83 genindeki ekspresyon seviyeleri 48
Şekil 4.11. Kleopatra mandarin genotipine ait dokuların Cs_Pol_1 genindeki ekspresyon seviyeleri 49
Şekil 4.12. Kleopatra mandarin genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri 50
Şekil 4.13. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların CsCc1-8 genindeki ekspresyon seviyeleri 51

Şekil 4.14. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri 52
Şekil 4.15. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri 53
Şekil 4.16. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1_74 genindeki ekspresyon seviyeleri 54
Şekil 4.17. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1_83 genindeki ekspresyon seviyeleri 55
Şekil 4.18. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_Pol-1 genindeki ekspresyon seviyeleri 56
Şekil 4.19. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri 57
Şekil 4.20. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri 58
Şekil 4.21. Makrofilla genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri 59
Şekil 4.22. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri 60
Şekil 4.23. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1-74 genindeki ekspresyon seviyeleri 61
Şekil 4.24. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1-83 genindeki ekspresyon seviyeleri 62
Şekil 4.25. Kaba limon genotipine ait dokuların Cs_Pol_1 genindeki ekspresyon seviyeleri 63
Şekil 4.26. Kaba limon genotipine ait dokuların CsCLCoy_1 genindeki ekspresyon seviyeleri 64
Şekil 4.27. Kaba limon genotipine ait dokuların CsCc1_8 genindeki ekspresyon seviyeleri 65

Şekil 4.28. Kaba limon genotipine ait dokuların Retro_Cc1_32 genindeki ekspresyon seviyeleri 66
Şekil 4.29. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri 67
Şekil 4.30. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1_74 genindeki ekspresyon seviyeleri 68
Şekil 4.31. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1_83 genindeki ekspresyon seviyeleri 69

KISALTMALAR

m	: Metre
°C	: Santigrat derece
mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
mm	: Milimolar
g	: Gram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
M	: Molarite
dk	: Dakika
∞	: Sonsuz
sn	: Saniye
rpm	: Revolutıon per minute (Dakikadaki devir sayısı)
ddH2O	: Deiyonize su
LiCl	: Lityum klorür
EDTA	: Ethilendiamin tetraasetik asit
TE	: Tris EDTA
CTAB	: Cetyltrimeyhhylamonium bromide
NaCl	: Sodyum klorür
TBE	: Tris Borate EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
PPO	: Polifenol oksidazın
CaCl2	: Kalsiyum Klorür
Gb	: Giga baz çifti
Mb	: Mega baz çifti
Kb	: Kilo baz çifti

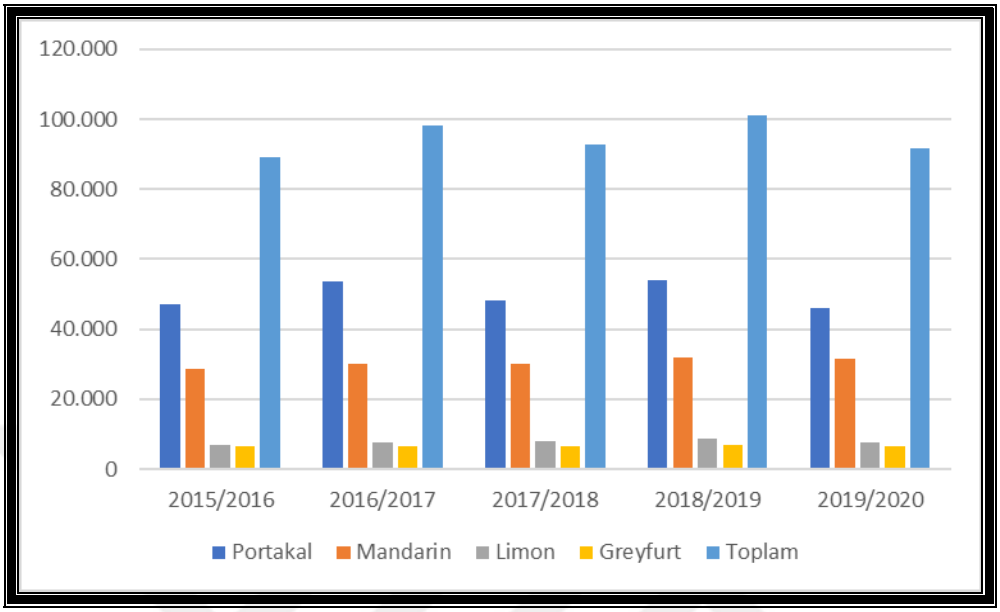
bç	: Baz çifti
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	: Kantitatif real time PCR
Tm	: Erime Sıcaklığı
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SSR	: Sımple Sequence Repeats(Basit Dizi Tekrarları)
SNP	: Sıngle nucleotide polymorphısm(Tek Nükleotid Farklılıkları)
mRNA	: Mesajcı RNA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
rRNA	: Ribozomal RNA
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
RT	: Ters transkriptaz ‘reverse transcriptase’
RTN	: Bitki retrotranspozonu
SINE	: ‘Short interspersed elements’
LINE	: ‘Long interspersed nuclear elements’
PEG	: Polietilen Glikol
IRAP	: Retrotranspozonlar Arası Güçlendirilmiş Polimorfizm

1. GİRİŞ

Turunçgiller, dünya genelinde tropik ve subtropik iklimde yetişen önemli bir meyve grubudur. Anavatanı Güneydoğu Asya olmasına rağmen besin içeriğinin zenginliği ve ekonomik değerinin yüksek olması turunçgil meyve grubunun, dünyada çok geniş bir coğrafik alanda yetiştirilmesine olanak tanımıştır (Dambier ve ark, 2011). Turunçgil yetiştiriciliği, yaklaşık 40° Kuzey ve 40° Güney enlemleri arasında kalan bölgelerde yaygın olarak yapılmaktadır (Ollitrault ve ark, 2012). Diploid kromozom yapısına sahip *Citrus* L., *Rutaceae* ailesinin *Aurantioideae* alt ailesine aittir (Biswas, 2010). *Aurantioideae*, 33 cinsten oluşan *Rutaceae*'nin yedi alt ailesinden biridir (Uzun ve ark, 2009; Amar, 2013).

Alem: *Plantae*
Bölüm: *Magnoliophyta*
Sınıf: *Magnoliopsida*
Takım: *Sapindales*
Familya: *Rutaceae*
Alt familya: *Aurantioideae*
Takım: *Citreae*
Cins: *Citrus* L.

Dünyada turunçgil yetiştiriciliği 100'den fazla ülkede yapılmaktadır. Önde gelen Turunçgil üreticisi ülkeler; Çin, Brezilya, ABD, Hindistan, Meksika ve İspanya'dır (Amar, 2013). Dünyada 2019-2020 yılları arasında yaklaşık 157 milyon ton turunçgil üretimi yapılmıştır (FAO, 2020). Türkiye ise dünyada 8., Avrupa'da 2. sırada yer almaktadır. Turunçgiller arasındaki en yaygın üretilen ve bilinen türler; portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limon (*Citrus limon* (L.) Burm. F), mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) ve altıntop (*Citrus paradisi* Macf.)'dur (Ruiz, 2002). USDA (United States Department of Agriculture) verilerine göre dünyada 2020 yılında 46 milyon ton portakal, 31 milyon ton mandarin, 7,5 milyon ton limon, 6,5 milyon ton altıntop üretimi yapılmıştır (Şekil 1.1).

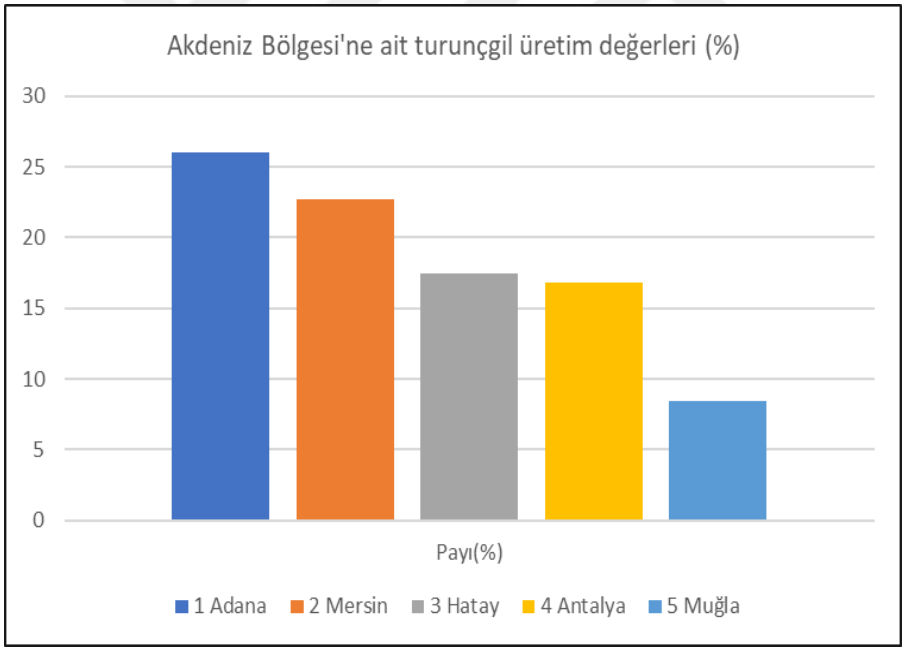


Şekil 1.1. Yıllara göre dünya turunçgil üretim miktarlarına ait veriler (Bin ton) (USDA, 2020)

Turunçgillerin ekonomik değerinin yüksek olması, dünya pazar payındaki öneminin gün geçtikçe artmasına neden olmuştur. Pazar payında görülen artışlar, özellikle Akdeniz havzasında bulunan ülkelerde turunçgil yetiştiriciliğinin artmasına olanak tanımıştır (Yeşiloğlu ve ark, 2013). Akdeniz havzası dünya turunçgil üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bu bölgedeki ülkeler toplam turunçgil üretiminin %17,2'sini karşılamaktadır. Akdeniz havzası içerisinde yer alan ülkemiz, turunçgil yetiştiriciliği bakımından uygun ekolojik koşullara sahiptir. Dünya turunçgil üretimi yaklaşık 92 milyon ton iken, Türkiye'nin üretimi 4,3 milyon tondur (FAO, 2020) (Çizelge 1.1). Türkiye'de bu büyüklükteki üretimi sağlayan başlıca türler; mandarin, portakal, altıntop ve limondur (Şekil 1.3). Türkiye turunçgil üretiminin %84,2'sini Akdeniz Bölgesi karşılamaktadır (Şekil 1.2).

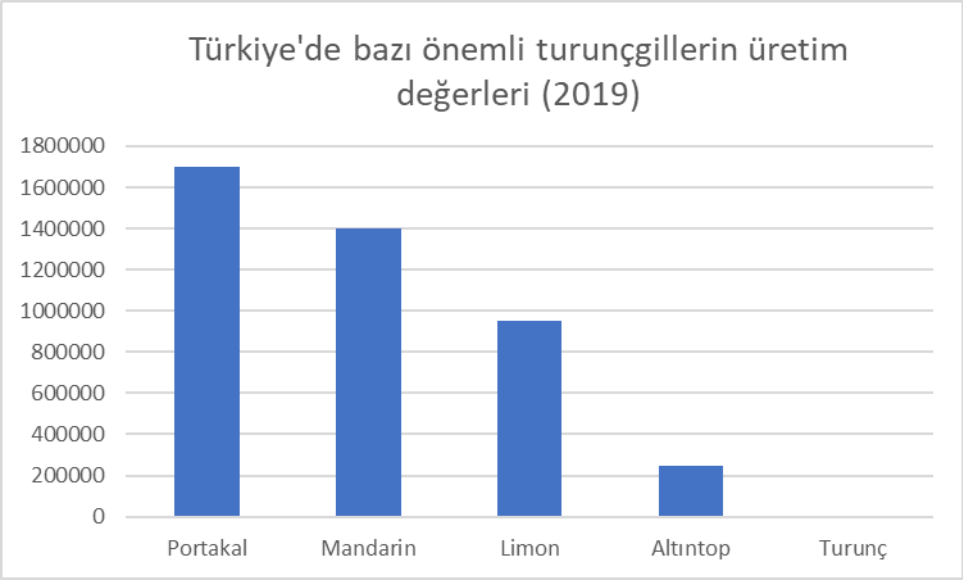
Çizelge 1.1. Türkiye'de yıllara göre turunçgil üretimi, tüketimi, kişi başına tüketimi ve meyve fiyatları değerleri (FAO 2020, TÜİK 2020)

Piyasa yılı	Üretim (Ton) (FAO)	Tüketim (Ton) (FAO)	Kişi başına tüketim (Kg) (FAO)	Meyve fiyatları, TL/Kg (TÜİK)
201 /'20	4301415	2335623	28,08	1,48
2018/'19	4902052	2695857	32,87	1,04
2017/'18	4769726	2318613	28,69	0,77
2016/'17	4293007	2315981	29,01	0,65
2015/'16	3975873	2304380	29,26	0,56
2014/'15	3783517	2237677	28,8	0,59
2013/'14	3681158	2180394	28,44	0,54



Şekil 1.2. Akdeniz Bölgesi'inde bulunan illere ait turunçgil üretim değerleri (TÜİK 2020)

Türkiye'de turunçgil üretimi ve ihracatında önemli bir yere sahip olan ana üretim merkezi Çukurova'dır. Türkiye'de 2019 yılında 1,7 milyon ton portakal, 950 bin ton limon, 250 bin ton altıntop, 1,4 milyon ton mandarin ve 2230 ton turunç üretimi yapılmaktadır (Şekil 1.3). Çukurova'da turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı iller, Mersin, Adana ve Hatay'dır. Üretim yapılan iller ve üretim değerleri Şekil 1.2'de görülmektedir (Yeşiloğlu ve ark, 2013).



Şekil 1.3. Türkiye'de bazı önemli turunçgil grubu meyvelerin üretim değerleri (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2019)

Ülkemizde aktif olarak turunçgil yetiştirilmesine rağmen, standart ıslah yöntemleriyle çok az çeşit geliştirilmiştir. Yaygın olarak yetiştirilen çeşitler, göz mutasyonlarından veya güçlü fidanlardan geliştirilmiştir. Aynı zamanda moleküler ve genetik tabanlı çalışmaları da kısıtlamış olup, turunçgil genomunun yeterli düzeyde anlaşılmasını sınırlandırmıştır. Bu nedenle, moleküler yöntemlerin kullanımı değerli genetik bilgilerin elde edilmesine ve elde edilen bilgilerin ıslah

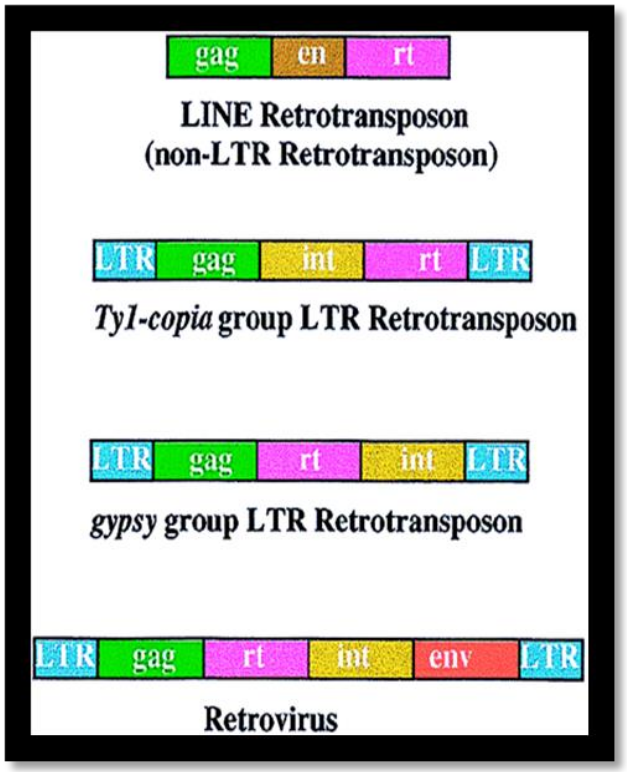
programlarında verimli ve etkin bir şekilde kullanılmasına olanak tanıyabilir (Liou, 1996).

Hareketli genetik elementler olan transpozonlar (Transpoze edilebilir elementler), bencil genetik faktörler olarak tanımlanmaktadırlar ve genellikle hem kopyala-yapıştır (Retrotranspozon) hem de kes ve yapıştır (DNA transpozonu) mekanizmaları aracılığıyla bitki genomu içindeki konumlarını otonom olarak değiştirmektedirler (Sahebi ve ark, 2018). Transpoze elementlerin (TE), uzun süre bir işlevi olmadığı düşünüldüğünden bu genetik elementlere "önemsiz genler" adı verilmiştir. Genomun büyük bir kısmını oluşturan bu elementler, mobil DNA fragmanları olarak da adlandırılmıştır.

Transpozonlar, ilk olarak mısırda (*Zea mays*), yaprak renk desenlerinin olağandışılığının gözlemlenmesinin ardından keşfedilmiştir. Geçtiğimiz 30 yıldaki çalışmalar, TE'lerin gen ekspresyonunu ve yapısını, kromozomun yeniden düzenlemesini ve genom boyutunun değişmesinde önemli roller oynadığını göstermiştir. Bu ve diğer işlevler aracılığıyla transpozonların, önemli genetik çeşitlilik kaynağı oldukları bildirilmiş ve bu nedenle bitkilerin genomları ile ilişkili bilgilerin edinilmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Felice, 2008; Meng, 2020).

Transpoze edilebilir elementler, bitki genomunun genişlemesine ve boyutunun artmasına neden olan başlıca faktördür. Farklı bitki taksonlarının transpozon aktivitesi, değişkenliği ve fiziksel dağılımı ile ilgili ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları bitki genom organizasyonunun ve evrimsel sürecinin anlaşılmasına büyük katkı sunmuştur (Felice, 2008). Transpozonlar, sahip oldukları mekanizmaya göre iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Kes ve yapıştır mekanizmasına sahip DNA transpozonları ve kopyala-yapıştır mekanizmasına sahip retrotranspozonlar (Sahebi ve ark, 2018). Retrotranspozonlar üç türe ayrılır: uzun terminal tekrarlı (*LTR*) retrotranspozonlar, kısa serpiştirilmiş benzeri öğeler (SINE benzeri öğeler) ve uzun serpiştirilmiş benzeri öğeler (HAT benzeri öğeler). Ty1-copia benzeri eleman, yapısal olarak retrovirüslere yüksek düzeyde benzerlikler

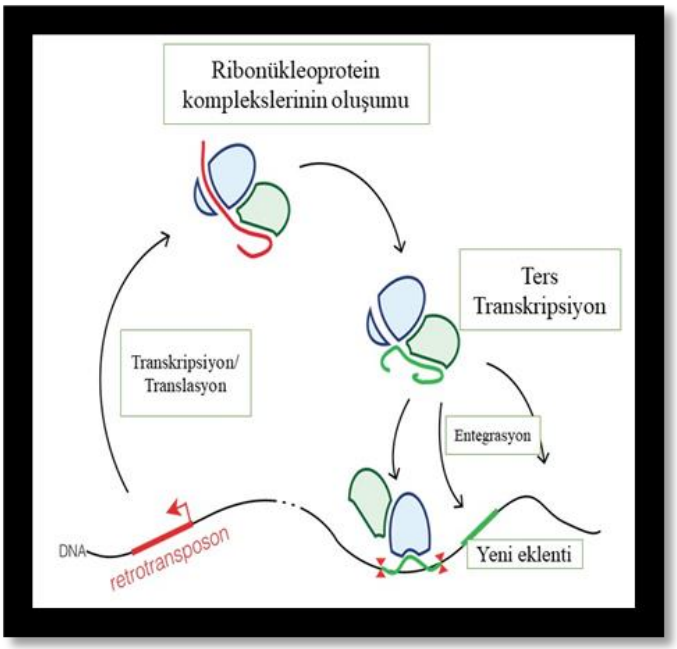
gösteren bir *LTR* retrotranspozondur. Temel farkı ise, *LTR* retrotranspozonlarının retrovirüslerdeki viral kılıf proteinlerini kodlayan env genlerinin olmamasıdır. *LTR* retrotranspozonları ayrıca iki gruba ayrılmaktadır: Ty1 copia ve Ty3 *gypsy*. *Copia* ve *gypsy* grupları arasındaki temel yapısal fark, pol genlerindeki ters transkriptaz (RT) ve integraz alanlarının sıralamasıdır (Şekil 1.4). Hem *gypsy* benzeri hem de copia benzeri retrotranspozonlar ilk olarak mısır genomunda ve ardından diğer birçok bitki genomunda tanımlanmıştır (Felice, 2008).



Şekil 1.4. Transpozon mekanizmaları (LINE elemanları (*LTR* olmayan retrotranspozonlar), iki *LTR* retrotranspozon (Gypsy ve Ty1-copia grubu) ve retrovirüs grubu. Yapısal alanlar: tr, endonükleaz; rt, ters transkriptaz; *LTR*, uzun terminal tekrarı; int, integral; env, zarf glikoproteini.)

LTR retrotranspozonlarının transpozisyonları üzerine bulunan bilgilerin bir kısmı maya retrotranspozonları hakkında gerçekleştirilen çalışmaların neticesinde bulunmuştur (Voytas ve Boeke, 2002) ve değişik konaklardan gelen birbirine benzeyen *LTR* retrotranspozonların arasında da bu mekanizmanın büyük ölçüde benzer olduğu varsayılmaktadır. Bir retrotranspozonun RNA'sı, 5' *LTR* içinde yer alan bir promotördeki RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Hücresel genlerin büyük kısmında görüldüğü üzere transkripsiyon TATA kutusunun ardından bağlamaktadır. RNA bunun ardından ters transkripsiyonun gerçekleştirilmesi ve integrasyon aşamalarında yararlanılması için ihtiyaç duyulan proteinleri sentezlemek için sitoplazma içerisinde okunmaktadır. İki RNA molekülü bir VLP (Virus-Like Particle) dahilinde paketlenir ve RNA'dan ters transkripsiyon reaksiyonu süresince tam uzunlukta cDNA kopyasını meydana getirir. Retrotranspozonun diğer kopyası genoma tekrardan ilave edilir (Havecker vd, 2004). Konak genoma cDNA kopyalarının ilave edilmesi, retrovirüslerin ve *LTR* retrotranspozonlarının yaşam döngüsünün tamamlanabilmesi için mühim olan bir adımdır. *LTR* retrotranspozonlarının hücre içi teorik yaşam döngüsü şekil 1.5'te verilmiştir.

Genoma dahil olabilme adımları şu şekildedir: *LTR* uçlarının bağlanması ve işlenmesi, konak genomda hedef DNA'nın belirlenmesi ve ayırımlanması, *LTR* dizileri ve hedef DNA'nın kaynaşması. Birinci adım sitoplazma üzerinde meydana gelirken diğer adımlar nükleus üzerinde olur (Sabot ve Schulman, 2006).



Şekil 1.5. Bir retrotranspozonun yaşam döngüsünün gösterimi (Sabot ve Schulman 2006)

Retrotranspozonlar, hemen hemen tüm ökaryotların genomlarında bol miktarda bulunmaktadır özellikle bitkilerde sayısızdırlar. Bitkilerde, *LTR* retrotranspozonları, *LTR* olmayan akrabalarına göre daha yoğun ve aktiftirler. Pek çok bitkide, toplam DNA'nın %40 ile 70'i arası *LTR* retrotranspozonlarından oluşmaktadır. En yaygın retrotranspozonlar genom boyunca dağılmış olsa da tahıllarda ve turunçgillerde genellikle iç içe geçmiş olarak ve gen bölgelerini çevreleyen 'retrotranspozon denizleri' olarak adlandırılan geniş alanlarda lokalize olmaktadırlar. *LTR* retrotranspozonları, iki ucu arasında bölünmüş *LTR*'nin tek bir kopyasını içeren neredeyse tam uzunlukta bir RNA transkripti üretmek için bütünleşmiş bir elemanın bir *LTR*'sinden kopyalanımaktadır (*LTR*, eleman için hem başlangıç bölgesini sağlar). Bu RNA daha sonra kromozom dışında ters transkripsiyona tabi tutulmakta ve genoma tekrar entegre olan tam uzunluktaki transpoze elementi yeniden oluşturmaktadır (Kalendar, 2011). *LTR*'lerin içinde, ters

transkripsiyon için hazırlama bölgeler bulunmaktadır. Retrotranspozonun büyük merkezi kısmı, RNA'nın eklendiği virüs benzeri bir partikülün yapısal bileşenlerini, ters transkriptaz ve integraz enzimleriyle birlikte kodlamaktadır. Bununla birlikte, retrotranspozonlar, retrovirüsler gibi yeni bireyleri enfekte etmek için genomdan kaçmak yerine, yeni kopyaları yalnızca konak genomlarına yerleştirmekte ve entegrasyonla gen havuzuna yeni bir polimorfizm kazandırmaktadır (Felice, 2008).

Retrotranspozonlar, markör sistemleri ile parmak izleri oluşturmak veya gen ekspresyon analizi ile genom boyunca artan transkript düzeyini belirlemek amacıyla moleküler düzeydeki çalışmalarda kullanılırlar. Markör sistemleri, belirli retrotranspozon ailelerinin üyelerini saptamak için çoklu odak profilleri oluşturmaktadır. Bu nedenle retrotranspozonlar, aktif fragmentler tarafından üretilen yeni polimorfizm düzeyini belirlemek için mükemmel bir fırsat oluşturmaktadır. Gen ekspresyon düzeyi ise, kopyala-yapıştır mekanizması ile çalışan retrotranspozonların, genom boyunca dağılmalarının ve genomda sahip oldukları yoğunlukların kantitatif olarak tayinine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, retrotranspozon temelli moleküler analizler, bir retrotranspozona karşılık gelen primer ve hedef genomun bir bölümünü eşleştiren ve bu reaksiyonu amplifiye eden PCR sistemlerine dayanır (Amar ve ark, 2013).

RT-PCR; hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az miktarda RNA ile hücrede oluşan transkriptlerin saptanmasına ve gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesine olanak tanımaktadır (Okutucu ve ark, 2003).

Bitkiler, kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik streslere ve patojen, mantar gibi biyotik streslere maruz kalmaktadırlar. TE'ler, bitki-abiyotik/biyotik stres etkileşimleri sırasında genetik plastizitenin başlatılmasında kritik roller oynamaktadır. Çok sayıda yer değiştirebilir eleman, gen ekspresyonunu değiştirerek, stres koşullarına yanıt olarak aktifleşmektedir. TE'ler stresi

engellemese bile, farklı çevresel streslere yanıt olarak gen ifadesini değiştirebilir ve stres koşullarında gen regülasyonlarını düzenleyebilmektedirler (Sahebi ve ark, 2018).

Kuraklık stresi turunçgillerin gelişimini ve büyümesini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür. Bu durum turunçgil bitkilerinde çeşitli biyolojik tepkilere sebep olup, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler olayları da etkileyerek bitkinin negatif koşullara göre dengeyi koruması için tolerans sistemleri gelişmesini sağlamaktadırlar (Şimşek, 2018). Dünya çapında kullanılabilen tarım arazilerine etki eden çevresel stres etmenleri göz önünde bulundurulduğunda, kuraklık stresinin %26, mineral madde stresinin %20 ve soğuk stresinin %15 oranında etki ettiği tespit edilmiştir. Bunların dışındaki %29'luk bölüm, diğer stres etmenleri etkisinde iken %10'luk kısmı herhangi bir stres etkisi altında değildir (Kalefetoğlu ve ark, 2005).

Tez çalışmasında Tuzcu 31-31 turuncu, Kleopatra Mandarin, Kaba Limon ve Makrofilla anaçlarının *LTR* Retrotranspozon aktivitelerinin ve *in vitro* kuraklık stresi koşullarında retrotranspozon genlerinin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda anaçlar arasında evrimsel süreçte oluşan retrotranspozon aktivitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bugüne kadar transpozonlarla ilgili pek çok bitkide çalışma yapılmıştır. Bunlardan turunçgillerde yapılan başlıca çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

Asíns ve ark. (1999), dünyada turunçgil çeşitlerinden çoğunun (Washington Navel, Satsuma, Clementine) somatik mutasyonlar sonucu ortaya çıktığını ileri sürmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada, *C. sinensis, C. grandis, C. clementina, Prunus armeniaca* ve *Prunus amygdalus* türlerine ait genotiplerde, *copia* benzeri retrotranspozonların amplifikasyonunu amaçlamışlar, amplifikasyon ürünlerini klonlama ve sekans analizi için kullanmışlardır. Klonlanan ürünler, Southern-blot hibridizasyon çalışmasında prob olarak kullanılmıştır. Hibridizasyon sonuçları *copia* benzeri retrotranspozonların, turunçgil genomuna entegre olduğunu ve çoklu kopyalarının mevcut olduğunu göstermiştir. *Citrus* ve *Prunus* genom boyutuna uygun *P. armeniaca* genomunda yalnızca 1-3 kopya tespit edildiği bildirilmiştir. Klonlara ait dizi analizi sonucunda elde edilen sekans bilgileri gen bankalarına teyit ettirilmiştir. Elde edilen sekans verilerinin gen bankalarında bulunan verilerle homolog sekanslar içerdiği görülmüştür. Homolog dizilere benzer olan sekansların, *copia* benzeri retrotranspozonlara karşılık geldiği tespit edilmiştir. Homolog dizilerin küme analizi yapıldığında, aynı genotiplere ait retrotranspozon alanları arasında büyük bir heterojenite gözlenmiştir. Bu bulgular, evrimsel süreçte retrotranspozonların, yatay gen transferleri şeklinde hareket ettiğini göstermiştir. Retrotranspozonların turunçgil genomu boyunca oldukça yoğun miktarlarda olduğu bildirilmiştir. Aktif bir retroelementin olası bir rekombinasyondan kaçınmak için, transgenlerin bir viral genomun parçası olup olmadığının anlaşılması ve transgenik bir turunçgil bitkisinin ticarileştirilmesinden önce dikkat edilmesi gereken bir husus olduğu tavsiye edilmiştir.

Bernet ve Asíns (2003), transpoze edilebilir elementlerin, turunçgil genomunun evriminde önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, *Citrus* ve *Poncirus*'da *gypsy* retrotranspozonların genomik dağılımını

araştırmışlardır. *Gypsy* gibi retrotranspozonların pol kodlama gen bölgesi, *C. clementina* genotipinden izole etmişlerdir. Yapılan çalışmada *Poncirus trifoliata*'nın bazı retroelementleri arasında yüksek benzerlik bulmuşlardır. *Gypsy* benzeri öğelerin iç içe geçmiş kopyaları, *Citrus* ve *Poncirus* genomları boyunca dağılmış olduğunu göstermişlerdir. Genomik dağılımla ilgili sonuçlar, bu elementlerin her iki cinsin ayrışmasından önce ortaya çıktığını ve daha sonra ayrı ayrı evrimleştiğini göstermişlerdir. Çalışmada, *gypsy* ve *copia* tipi retrotranspozonlara dayalı IRAP markörlerin farklı şekilde dağıldığını görmüşlerdir, bu nedenle *gypsy* tabanlı IRAP markörlerin özellikle hastalık direncini incelemek ve haritalamak için *Citrus*'ta yeni, tamamlayıcı bir moleküler markör olabileceğini kanıtlamışlardır.

Tao ve ark. (2006) retrotranspozonların turunçgillerde, genetik kararsızlıkla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla, bir yaşındaki fidanlarda, çiçek açabilen ve meyve verebilen mutant üç yapraklı anacında (PTO) kopya (*copia*) benzeri retrotranspozonların varlığını araştırmışlardır. Çalışmada, genotiplere ait cDNA kütüphanelerinden klonlanan fragmentler analiz edilmiştir Analiz sonucu retrotranspozonlar, iki alt gruba ayrılmıştır. Parçalardan biri (RT7) bir prob olarak kullanılmış ve genomik hibridizasyonla bu bölgenin yalnızca bir kopyasının PTO genomunda mevcut olduğunu bildirmişlerdir. *Copia* benzeri retrotranspozonların, parmak-izine dayanan ters sekans etiketli tekrar (ISTR) analizini gerçekleştirmişlerdir. PTO çiçeklerinde ve yapraklarında transkripsiyonel aktivite olmamasına rağmen sonuçlarında, PTO mutantlarında, erken gelişme özelliği ile ilişkili olabileceği düşünülen kopya benzeri retrotranspozonların yeni transpozisyonunun meydana geldiğini göstermişlerdir.

Rico-Cabanas ve Martínez-Izquierdo (2007), *LTR* retrotranspozonların, özellikle bitki genomları olmak üzere genel ökaryot genomların yaygın bileşenleri olduğunu vurgulamışlardır. Bitkilerde, *LTR*'lerin somatik dokularda, transkripsiyonel olarak aktif olmadığı düşünülse de bazıları için belirli koşullar altında aktivasyonunun mevcut olduğunu bildirmişlerdir. *C. sinensis* genomundaki

LTR'lerin araştırılması amacıyla PCR analizi gerçekleştirmişlerdir. Tüm *LTR*, genomun yaklaşık %23'ünü oluşturduğunu kopya (*copia*) grubunun *gypsy* grubundan daha yüksek olduğu rapor etmişlerdir. Transpozonlara ait filogenetik analizde, CIRE1 ila CIRE7 adlı yedi yeni kopyanın RTN ailesine eklediklerini bildirmişler ve turunçgillerde, CIRE1 olarak tanımlanan retrotranspozon hakkında bilgi vermişlerdir. CIRE1 retrotranspozonu *C. sinensis* genomunun %2,9'unu anlamada katkı sağladığını vurgulamışlardır.

Liu ve ark. (2009) tomurcuk mutasyonlarının genellikle turunçgillerde ortaya çıktığını ifade etmişler ve mutant seçiminin turunçgillerdeki en önemli çeşitlilik kanallarından biri olduğunu ifade etmişlerdir. Bununla birlikte, tomurcuk mutasyonunu nadiren incelemişlerdir. Portakalda farklı genleri tanımlamak için hibridizasyon ve mikrodizi analizi yapmışlardır. Klonlardan toplam 267 transkript elde edilmiş ve bunların 182'si (%68,2), bilinen gen ifadeleriyle benzerlik gösterdiğini (E-değeri <1310210) paylaşmışlardır. Meyve gelişimi aşamasındaki tomurcuk mutasyonunda az sayıda genin ekspresyon düzeyinde değişiklik olduğunu görmüşlerdir. Yapılan analizler sonucunda, farklı şekilde ifade edilen genlerin %95,1'inin likopen birikiminin başlamasıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Metabolik süreç ve biyolojik düzenleme ile ilgili transkriptlerin ekspresyonunda farklılıkların olduğunu belirtmişlerdir. Bu genlerin, organik asit metabolizması, lipid metabolizması gibi birçok biyolojik aktiviteyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Biswas ve ark. (2010) yaptığı çalışmada, retrotranspozonların, bitki genomlarının ortak bileşenleri olduğunu, transkripsiyon ve entegresyon seviyelerinde işlevsellik gösterdiklerini, transpozonların miktar ve transpoze etme yeteneklerinin onları potansiyel markör haline getirdiğini ileri sürmüşlerdir. Bu amaçla, *Citrus* cinsi ve ilgili taksonlar için IRAP (inter retrotransposon amplified polimorphism) ve REMAP (retrotransposon-microsatellit amplified polimorphism) temelli DNA markör analizini yapmışlardır. Hem IRAP hem de REMAP markörle test edilen genotipler arasında önemli bir varyasyon olduğu görülmüştür. ISSR,

IRAP ve REMAP analizi sonucunda, 250 ile 2.000 bç arasında değişen 113 polimorfik bant elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan primer kombinasyonu başına ortalama sekiz ve toplamda 94 polimorfik bant tespit edilmiştir ve polimorfizm düzeyi %84 olarak bulunmuştur. IRAP ve REMAP' analizlerinde elde edilen veriler kullanılarak bir dendogram oluşturulmuştur. Kümeleme analizi, matriksler arasında 0.77 korelasyonla iyi bir uyum olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışma sonucunda, turunçgil grubunun geniş bir heterojenite sergilediği rapor etmişlerdir.

Butelli ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, kan portakalındaki (*C. sinensis*), antosiyanin biyosentezinde görülen artışın retrotranspozon kaynaklı olduğunu bildirmiştir. MYB transkripsiyon faktörü aktivatörü olan Ruby'i kodlayan gen bölgesine yakın bir alana, *Copia* benzeri bir retrotranspozonun eklenmesi ile antosiyanin üretiminde artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Retotranspozon, Ruby gen ifadesini kontrol eden ve soğuk stresi ile indüklenen bir gendir. Elde edilen sonuçlar, retroelementlerin aktarılması ve rekombinasyonunun *Citrus*'ta önemli genetik varyasyon kaynağı olduğunu göstermişlerdir.

Varonova ve ark. (2014) sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) genomunda retrotranspozon benzeri sekansların strese bağlı transkripsiyonel aktivasyonunu araştırdığı çalışmada sarıçam bitkileri kuraklık stresine maruz bırakıldıktan sonra salisilik asit ve absisik asit uygulaması yapılmıştır. Elde edilen verilere göre çeşitli stres koşulları altında farklı şekilde ifade edilen bazı retrotranspozon sınıflarının tespit edildiğini görmüşlerdir.

Makarevitch ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, Transpoze elementlerin (TE), çevre şartlarına bağlı gerçekleşen değişimlere verdiği tepkide gen ifadesi üzerindeki etkisini tahlil etmek üzere, bazı abiyotik streslere maruz kalan mısır fidelerinde gen ve TE transkript seviyeleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, abiyotik strese tepki olarak düzenlenmiş genlerin %20'sine kadar ve sadece strese cevap olarak ifade edilen genlerin %33 kadarının etkilenmesi TE ailesinin yukarı regüle edilmiş gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Yapılan bu çalışma sonucunda TE'lerin varlığı ile gen ekspresyonunun strese duyarlı yukarı regülasyonu arasında güçlü bir bağ oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Tan ve ark. (2015), poliploidi seviyesinin bitkilere, çevresel stres faktörlerine karşı daha iyi bir tolerans sağladığını vurgulamışlardır ve tetraploid turunçgil anaçlarının diploide oranla daha güçlü bir toleransa sahip olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu amaçla, Çin'e özgü özel bir turunçgil genotipi olan ve demir eksikliğine toleranslı turunçgil anacını (*C. junos Sieb. Ex Tanaka*) kullanmışlardır. Çalışmada tetraploidizasyonun neden olduğu metabolomik ve transkriptomik değişiklikleri ve kapsamını incelemişlerdir. Elde edilen veriler diploid türlere ait verilerle karşılaştırıldığında, tetraploidde stresle ilişkili genlerde ekspresyon seviyelerinde aşırı artışların olduğu ve stresle ilişkili metabolitlerde yüksek birikimlerin oluştuğu görülmüştür. Sonuç olarak, stres toleransı için poliploid seviyenin yararlı olabileceği vurgulamışlardır.

Butelli ve ark. (2017), mandarin (*C. reticulata*), citron (*C. medica*) ve pummelo (*C. maxima*)'nun, *Citrus* cinsinin önemli türleri olduğunu vurgulamış ve turunçgillerin en bilinen ticari çeşitlerini oluşturan türler arası melezlerin ebeveynlerini portakal, turunç, klemantin mandarini, limon ve altıntopun oluşturduğunu belirtmişlerdir. *Citrus* cinsinin birçok türündeki genç yapraklarında ve çiçeklerinde antosiyanin üretildiğini ancak mandarin ve pummelo çeşitlerinde antosiyanin üretilmediğini, antosiyanin biyosentezini kontrol eden bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlayan Ruby geninin aktivitesini, *Citrus* türünün farklı kültürlerinde araştırmışlardır. Beyaz bir limon mutantında Ruby genin işlevsel olmadığını, böylece de Ruby'nin *Citrus*'ta antosiyanin üretiminde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. *Citrus* türlerinde Ruby gen aktivitesindeki farklılıklarının nokta mutasyon ve retrotranspozon aktivitelerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu durumun antosiyanin kaynaklı pigmentasyon varyasyonlarına neden olduğu ve retrotranspozon elementlerin nokta mutasyonlarını indükleyici etkilerinden ve transpozon eklenmelerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ruby'nin allelik yapısının farklı tür ve çeşitlerde karşılaştırılmasının, farklı

Turunçgil türlerindeki taksonomik ilişkilerin çoğunun açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olacağı sonucuna varmışlardır.

Huang ve ark. (2018), bitkilerde meyve renginin evrimini ilgi çekici bulmuşlardır. Turunçgil meyvesinin, antosiyaninleri sentezleme yeteneğini defalarca kazandığı ve kaybettiğini vurgulamışlardır. Yabani turunçgil türlerinin yapraklarında antosiyanin biriktirebildiğini, buna karşılık, ticari turunçgillerin, antosiyanin biriktirme yeteneğini kaybettiğini öne sürmüşlerdir. Turunçgillerde bilinen bir antosiyanin aktivatörü olan Ruby1'e bitişik yeni bir MYB düzenleyici gen olan Ruby2'yi incelemişlerdir. Ruby2 allellerinin, antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinde bazı etkilere sahip olabildiğini, AbRuby2 geninin turunçgil yapraklarında antosiyanin biyosentez aktivatörü domaini olduğunu ve CgRuby2Short geninin antosiyanin baskılayıcı bir domain içerdiğini bulmuşlardır. Farklı turunçgil türlerinde yapılan diğer araştırmalarında, Ruby2 – Ruby1 genlerin yabani ve kültüre alınmamış turunçgillerde farklı bazı işlevlere sahip olabileceğini vurgulamışlardır.

De Felice ve ark. (2018), bitki genomunun, büyük ölçüde, genomların ve diğer gen yapılarını yeniden düzenleyebilen ve ayrıca çeşitli faaliyetler yoluyla gen düzenlemesini etkileyen hareketli DNA fragmanlarından oluştuğunu söylemişlerdir. Ty1-*copia* benzeri retrotranspozon, bitki aleminin toplam DNA içeriğinin büyük bir bölümünü temsil eden yaygın bir yer değiştirebilir elementler sınıfı olduğunu öne sürmüşlerdir. Çalışmalarında, yeni bir retrotranspozon benzeri dizi izole etmişler ve bilinen elementlerin homolojisine dayalı olarak Ty1-kopya benzeri ters transkriptaz alanı (CLCoy1) olarak tanımlamışlardır. Floresan *in situ* hibridizasyon ile CLCoy1'in esas olarak *Citrus* kromozomları boyunca telomerik ve alt telomerik bölgelerde bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır. CLCoy1, genomunun %3,6'sını oluşturduğunu ve ilginç bir şekilde, transpozonların çoğunlukla bir türe özgüyken, bu retrotranspozonun *C. aurantium, Fortunella margarita* ve *C. paradisi* gibi diğer Citrus türlerinde de tanımlanmış olduğunu, ancak *Poncirus trifoliata*'da görülmediğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca yaralanma, tuz

ve kuraklık stresinin *C. limon'*da bu yeni retroelementin transkripsiyonel aktivasyonunu belirlemişlerdir. Yeni Ty1-*copia* benzeri elementi olan CLCoy1'un, Turunçgil türlerinin evrimi sırasında genom yapısını ve boyutunu şekillendirmede önemli bir rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir.

Du ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, uzun terminal tekrarlı retrotranspozonların (*LTR*-RT'ler) bitki genomunun büyük bir kısmını oluşturduğu ve güçlü bir moleküler markör sistemi olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. *C. x clementina* genomuna ait bilgiler, 2011 yılından itibaren erişime açık olmasına rağmen özellikle *LTR*-RT markör sisteminin gelişimi için tüm genom bilgisinin kullanılmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu amaçla, yapı tabanlı (*LTR*_FINDER) ve homoloji tabanlı (RepeatMasker) programlama yöntemleri kullanılarak *C. x clementina* genomunda 3959 tam uzunlukta *LTR*-RT tanımlamışlardır. *LTR* RT ailesi ilk olarak protein alanına göre *gypsy* ve *copia* süper aileleri olarak sınıflandırılmış ve ardından *LTR* sekans benzerliğine göre 1074 aile halinde gruplandırılmıştır. 350 üyeden oluşan *copia* ailesi, Retrofit, Tork, Sire ve Oryco olacak şekilde dört sınıf altında, 178 üyeden oluşan *gypsy* ailesi Athila, Tat, Renia, CRM, Galadriel ve Del olmak üzere altı sınıfta toplanmıştır. Korunmuş *LTR* bölgelerinden geliştirilen 17 inter-retrotranspozon IRAP markörü tasarlanmış, "Valencia" ve "Ananas" portakallarına (*C. x sinensis*) ait 24 klonun ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Clementine genomundan geliştirilen *LTR*-RT markörlerinin *Rutaceae* ailesine aktarılabildiği ve bu transpozonların genetik analizi için mükemmel bir araç olduğunu vurgulamışlardır.

Borreda ve ark. (2019), *Citrus* cinsinin ortak atadan türetilmesinin, büyük iklim değişikliklerinin yaşandığı bir dönemden başlandığını öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada, mevcut *Citrus* türlerinin ortaya çıkmasına neden olan çeşitlendirme sürecindeki *Citrus LTR* retrotranspozonlarının aktivitelerindeki değişiklikleri rapor etmişlerdir. Bu amaca ulaşmak için, turunçgillerin evrimsel sürecinin ilk dört saf türünün, bu türlerden türetilen son turunçgil türünün bir grubu olduğunu analiz etmişlerdir. 30.000'den fazla retrotranspozonu, 10 türde gruplandırılmışlardır. *LTR*

retrotranspozon aktivitesinin, üç farklı modelden birine özgü bir değişim modelini izlediğini ortaya çıkarmışlardır. Bazı genomların, mevcut turunçgil türlerini doğuran ataların radyasyonu sırasında aniden durdurulduğunu söylemişlerdir. Genomların çoğunda, SIRE soyundan gelen elementlerin retrotranspozon aktivitesi, Turunçgil türleşmesinden hemen önce en yüksek seviyesine ulaşırken, Retro elementleri için sürekli olarak büyümekte olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu gözlemlere dayanarak, Turunçgil retrotranspozonlarının, adaptasyonla ilgili genetik yanıtın bir parçası olarak türleşmeyi yönlendiren stres koşullarına yanıt verebileceğini önermektedirler. Böylece her türün gelişen koşullarının, hareketli elementlerin çoğalmasını kontrol eden genomun iç düzenleyici mekanizmaları ile etkileşime girdiğini varsaymaktadırlar.

Butelli ve ark. (2019), bazı turunçgil çeşitlerinde, düşük seviyede meyve asitliğini, yapraklarda ve çiçeklerde antosiyanin pigmentlerinin ve tohumlarda ise proantosiyanidinlerin bulunmaması ile ilişkilendirmişlerdir. Doğal varyasyondan yararlanan Butelli ve ark. (2019), bu pleiotropik fenotipin, bir bHLH (sarmal-döngü-sarmal) transkripsiyon faktörünü kodlayan Noemi geni mutasyonunun sonucu olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, turunçgilde flavonoid pigment üretimi ve meyve asitliğinin düzenlenmesi için Noemi geninin varlığının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ticari olarak kullanılan asitsiz özelliğe sahip çeşitlerde, asitsizlik fenotipinin bazı retrotranspozonlarla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır.

Çiçek (2019) yapmış olduğu çalışmada kavun bitkisinde kuraklık mekanizmasına karşı dayanıklılık mekanizmasını anlamak ve araştırmak için kuraklığa hassas ve dayanıklı iki genotip seçmiş, bu genotipler kullanılarak amaca yönelik bazı morfolojik, fizyolojik ve moleküler analizler gerçekleştirmiştir. Kuraklık stresi altındaki gruplarda önemli moleküler, fizyolojik ve morfolojik değişimler olduğu gözlemlemiştir. Ayrıca kavun bitkisinde bu çalışmada ele alınan retrotraspozonların ifade seviyesi tek tip bir ifade profili sergilemeyip genel olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Ek olarak farklı türlerden alınan bu söz konusu transpzonlara ait transkriptlerin kavun bitkisinde de uygun bir şekilde gen

düzeyinde ifade edildiği ve bunların türler arası transfer olabileceğini vurgulamıştır.

Zheng ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, genotip-fenotip ilişki analizi için *P. trifoliata, C. reticulata, C. grandis, C. sinensis* türlerinden yararlanarak geliştirdikleri 117 hibrit turunçgil genotiplerini kullanmışlardır. Karotenoid-cleavage-dioksigenaz-4b'yi kodlayan CCD4b 5 'cis-düzenleyici elementin, turunçgil kabuğunda kırmızı renkten sorumlu C30 apokarotenoidlerdeki doğal genetik varyasyonun belirleyicisi olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca, CCD4b promoterinin ve çeşitli turunçgil promoterinden gelen transkriptlerin, MITE programı kullanılarak transpozon analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda çeşitli promoter bölgelerinde transpozon varlığı ile apokarotenoid açısından allellik ekspresyon korelasyonunu kurmuşlardır. Bu çalışmayı Spektrometre, QTL analizleri ve qRT-PCR kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, bitkilerdeki apokarotenoid çeşitliliğinin genetik ve evrimsel temeline yeni bakış açısı sağladıklarını, turunçgillerin ve belki de diğer meyvelerin besin ve kalite değerlerini iyileştirmeyi amaçlayan ıslah çabalarını kolaylaştıracağını bildirmişlerdir.

Meng ve ark. (2020), kısa serpiştirilmiş nükleer elementlerin (SINE'ler), bitki genomlarında oldukça yoğun olan ancak iyi açıklanmayan ve otonom olmayan retrotranspozonlar olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, yedi turunçgil genomunda (*C. sinensis cv. Valencia, C. reticulata, C. grandis, C. ichangensis, C. medica, C. reticulata cv. clementina de Nules, C. reticulata cv. Miyagawa wase*) 41.573 kb SINE kopyası mevcut olduğunu ve turunçgil kromozomları boyunca dağıtıldığını ifade etmişlerdir. Turunçgil SINE'lerinin yaklaşık %18,4'ünün genlere yakın (1 kb yukarı akış; up stream) bölgelerde bulunduğu böylece promoter bölgelerde SINE'lerin önemli bir bilgi kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Turunçgil SINE'lerinin, ekzonların belirlenmesi, ekleme bölgeleri oluşturmak, kodonları başlatıp durdurmak, yeni genler oluşturarak ve dağınık tekrar yapıları oluşturup gen ve genom evrimine katkı sunduklarını ifade etmiştir. Bu çalışmayla SINE'lerin,

turunçgil genlerinin ve genomlarının evrimini anlamak için yeni bir bakış açısı sunduğunu belirtmişlerdir.

El Zayat ve ark. (2021), turunçgillerde genom taslağının incelenmesinin, kalıtsal olan üreme özelliklerinin, moleküler markör olup olamayacaklarını ve genetik yapılarını anlamada faydalı bilgiler sunacağını düşünmüşlerdir. Çalışmada *LTR*-REMAP'in 20 adet markörüne ek olarak 26 SSR ve 14 *LTR*-IRAP'ın performansı, yirmi turunçgil genotipi örneği arasında ayrım gücü ve genetik yapı analizinin durumunu göstermek için kullanılmışlardır. Kullanılan 3 markör, test edilen genotipler arasında dikkate değer bir varyasyon göstermiştir. *LTR* REMAP'le, mandarin ve bazı asidik türlerin kökenini sınıflandırmak için uygun olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak, genetik yapı analizi bulgularının; limon, misket limonu, ağaç kavunu, altıntop, mandarin, portakal ve pummelo gibi türlerin ve ilgili melezlerin açık bir şekilde tanımlanmasını ve düzenlenmesini sağlayabilmişlerdir. Bu sonuçlarla, Mısır turunçgil anacının ve asit çeşitlerinin türler arası katkısını ve yapı kökenlerini belirlemeye yönelik önemli bir aşama olarak ıslah programları ve koruma yaklaşımları için yararlı ve potansiyel bilgiler sunmuşlardır.

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyaller

Tez çalışmasında bitkisel materyal olarak Tuzcu 31-31 turuncu (*C. aurantium* L.), Kaba Limon anacı (*C. jambhiri* Lush.), Kleopatra Mandarin (*C. reshni* Hort. ex. Tan.) ve Makrofilla 4 farklı genotip kullanılmıştır. Bitkisel materyale ait özellikler aşağıda sunulmuştur.

Tuzcu 31-31 turuncu (*C. aurantium* L.): Tuzcu 31-31 turuncu, turunçgil yetiştiriciliğinde ve Çukurova bölgesinde yaygın olarak kullanılan bir anaçtır (Şimşek ve ark., 2018). Prof. Dr. Önder Tuzcu tarafından 1974 yılında Doğu Akdeniz Bölgesinden seleksiyonu yapılmıştır. Birçok biyotik (uçkurutan, kök boğazı, gövde zamklanması) ve abiyotik (kireç, tuzluluk, düşük sıcaklık) streslere toleranttır, ancak Tristeza virüsüne duyarlı olması bir dezavantajdır (Cengiz, 2018).



Şekil 3.1. Tuzcu 31-31 turuncu (Cengiz, 2018)

Kaba Limon anacı (C. *jambhiri* Lush.): Kaba Limon kuru topraklara uyumlu bir anaçtır. İyi bir saçak kök sistemine sahip olduğundan hızlı gelişir. Derin kumlu topraklara adaptasyonu iyidir. Kirece dayanımı orta, tuza dayanımı zayıftır. Üzerine aşılı ağaçlar geç meyveye yatmakta, meyve kalitesi düşük olmakta ve ağaçlar kısa ömürlü olmaktadır. Tristeza ve Psorosis hastalıklarına toleranslıdır (BATEM, 2021).



Şekil 3.2. Kaba Limon anacı (BATEM, 2021)

Kleopatra Mandarin (*C. reshni* Hort. ex. Tan.): Kleopatra mandarini çoğunlukla portakal, altıntop, mandarin ve limon olmak üzere farklı yetiştirilen turunçgil türlerinin anaç olarak tarımda yaygın olarak kullanılan bir turunçgil genotipidir. Orijini Hindistan'dır. Tuza dayanıklıdır. Kuru ve kireçli topraklara orta derecede dayanıklıdır. Üzerine aşılı ağaçlar geç meyveye yatar ve uzun ömürlü olurlar. En olumsuz yönü bazı turunçgil çeşitlerinde anaç olarak kullanıldığında meyve kalitesini düşürmesidir. Üzerine aşılı ağaçlarda Tristeza ve Exocortis'e dayanıklıdır. Boğaz, gövde zamk hastalıklarına dayanması çok iyidir. Ağır topraklarda iyi büyür. Yüksek oranda poliembriyoniye sahiptir (BATEM, 2021).



Şekil 3.3. Kleopatra Mandarin (BATEM, 2021)

Makrofilla (*C. macrophylla*): Meyvesi orta-büyük, dikdörtgen ve genellikle daireseldir. Orta kalınlıkta kabuğa (meyve büyüklüğü için); biraz pürüzlü ve engebeli yüzeye, yeşilimsi-sarı renge sahiptir. Meyve et rengi yeşilimsidir. Düşük meyve suyuna ve asidik ve acı bir tada sahiptir. Tohumları poliembriyoniktir.

Makrofilla, toprakların çözünür tuz ve bor içeriğinin elverişsiz derecede yüksek olduğu Kaliforniya'da yaygın olarak kullanılan bir anaçtır. Limon anacı olarak sisteme dahil edilmiştir. Makrofilla'nın Filipin Adaları'ndaki Cebu Adası'na özgü olduğu söylenmektedir (Citrus Variety Collection, 2021).



Şekil 3.4. Makrofilla (Citrus Variety Collection, 2021)

3.2. Metot

3.2.1. Tohumların Sterilizasyonu

Tez çalışmasında kullanılacak anaçlara ait tohumlar yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işleminden sonra tohumlar çimlendirme ortamına alınarak rejenere edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi Simsek (2018), Rico-Cabanas ve Martínez-Izquierdo'ya (2007) göre yapılmıştır.

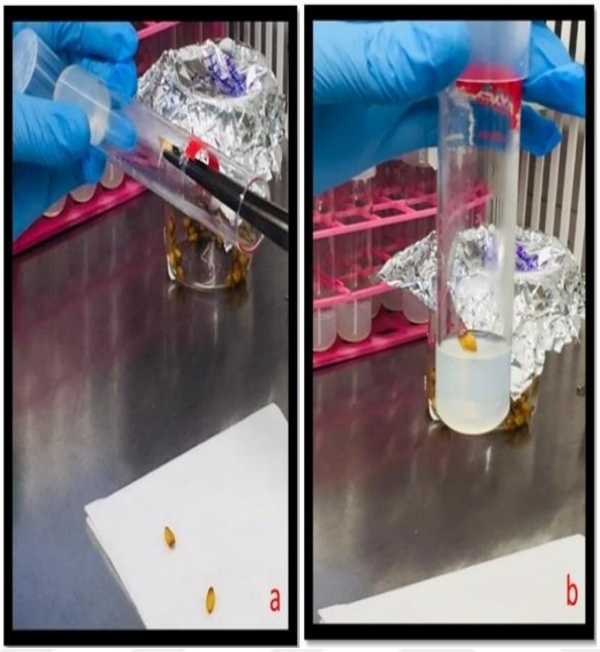
Çalışmada kullanılacak anaçlara ait meyve örnekleri alınmış ve steril pens ve bisturi yardımı ile tohumlar meyvelerden çıkartılmış, meyvelerden çıkartılan tohumlar yüzey sterilizasyonu için %70'lik konsantrasyona sahip etil alkolde 3 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tohumlardan etil alkol uzaklaştırılmıştır ve tohumlar üç kez otoklav edilmiş su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra tohumlar %20'lik konsantrasyona sahip hipoklorid çözeltisinde 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tohumlar üç kez otoklav edilmiş su ile yıkanmıştır ve çimlendirme ortamına aktarılmıştır.



Şekil 3.5. Tohumların yüzey sterilizasyonu aşaması

3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi amacı ile hormonsuz MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi yeri hazırlanmıştır. Kullanılacak besi yeri, 30 g/L sakaroz, 8 g/L agar ve 4,4 g/L MS içerecek şekilde hazırlanmıştır. Besin ortamının pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Steril edilen tohumlar hazırlanan besi yerine aktarılarak kültüre alınmıştır. Tohumlar 2-4 hafta boyunca kültür ortamında ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta, 25°C iklim koşullarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan tohumlar çimlendikten sonra bitkiler 5 cm uzunluğa erişinceye kadar büyümeleri bekletilmiştir. Bitkilerde yaprak ve kök oluşumu yeterli düzeye eriştiğinde stres denemesi kurulmuştur.



Şekil 3.6. Tohumların çimlendirilmesi amacı ile hormonsuz MS besi yerine alınması



Şekil 3.7. Kültüre alınan tohumların çimlenmesi

3.2.3. Stres Uygulamaları

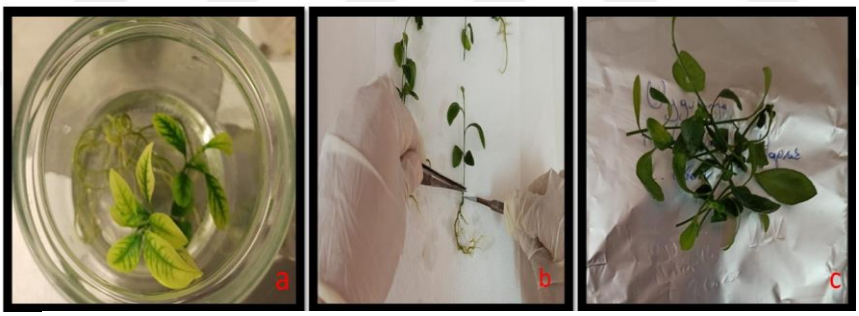
Çalışmada, daha önce *in vitro* koşullarda çoğaltılmış ve köklendirilmiş bitkiler kullanılmıştır. Kuraklık stresi denemeleri için PEG içeren MS besin ortamları hazırlanmıştır ve bitkiler bu ortamlara aktarılmıştır. Genotiplere ait bitkiler 30 g/L sükroz, 8 g/L agar, PEG 6000 ve 4,4 g/L içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kuraklık stresi denemeleri için %0, %20 PEG içeren MS besin ortamları hazırlanmıştır. Besin ortamının pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. Steril edilen besin ortamlarında bitkiler kuraklık stresine alınmıştır. Kuraklık stresi için bitkiler PEG 6000 içeren ortamlarda 24 saat bekletilmiştir ve süre sonunda kuraklık stresi denemesi sonlandırılmıştır (Açar, 2016). Kuraklık stresi sonunda bitkiler bulundukları kültür ortamından alınmış ve steril bisturi yardımı ile kök ve yapraklarına ayrılmıştır. Bitkilere ait kök ve yaprak dokuları etiketlenmiş folyolara alınarak sıvı azotta dondurulmuştur ve moleküler analizler için -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Çimlenen bitkilerin stres ortamına aktarılması aşamaları (a. Bitkilerin MS ortamında çimlenmesi b. Ortamdan çıkarılması c. PEG6000 ortamına aktarılması d. yoğun PEG6000 içeren ortamda bekletilmesi)

3.2.4. Moleküler Analizler

Moleküler analizler için *in vitro* koşullarda rejenere edilen bitkisel mataryel kullanılmıştır. Kültür kaplarında bulunan bitkiler kültür kaplarından alınarak agardan temizlenmiştir. Genotiplere ait yaprak ve kök dokuları steril bistüri yardımı ile alınmış ve etiketlenmiş alüminyum folyolara sarılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Sıvı azot içerisinde dondurulan dokular RNA izolasyon için kullanılmıştır. Moleküler analizler için, LTR retrotranspozon ailesine ait 7 farklı retrotranspozon kullanılmıştır. Bu çalışmadaki retrotranspozonlar De Felice ve ark.'nın (2009) yaptığı çalışmada *C. limon*'dan ve Borreda ve ark.'nın (2019) yaptığı çalışmada *C. clementina*'dan elde edilmiştir. Retrotranspozonlara ait ekspresyon düzeyi qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler analiz edilecek genotiplere ait transpoze edilebilir elementlerin ekspresyon profili ve aktivitesi analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Stres uygulamasından sonra bitkilerin kök ve gövde olarak ayrılması sonrası etiketlenmiş alüminyum folyolara aktarılması aşamaları

3.2.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için -80ºC'de depolanan dokular kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Dokular havanda sıvı azot yardımı ile öğütülmüş ve ependorf tüplere alınarak izolasyon için hazır hale getirilmiştir. Ayrıca izolasyon için iki farklı ekstraksiyon buffer hazırlanmıştır.



Şekil 3.10. Anaçlara ait kök dokularının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi

Ekstraksiyon Buffer I: Bu solüsyonun hazırlanmasında %2 CTAB (Cietiltrimetil amniyum bromid), 25 mM EDTA (Etilen daimin tetra asedik asit), 100 mM Tris-HCL (pH:8), 2.0 M NaCl, 0.5 g/L Spermidin ve %2 PVP (Polyvinilpirolidon MA: 2.5 g/mol) kullanmıştır. Solüsyon 121°C'de 20 dakika otoklav edilmiştir.

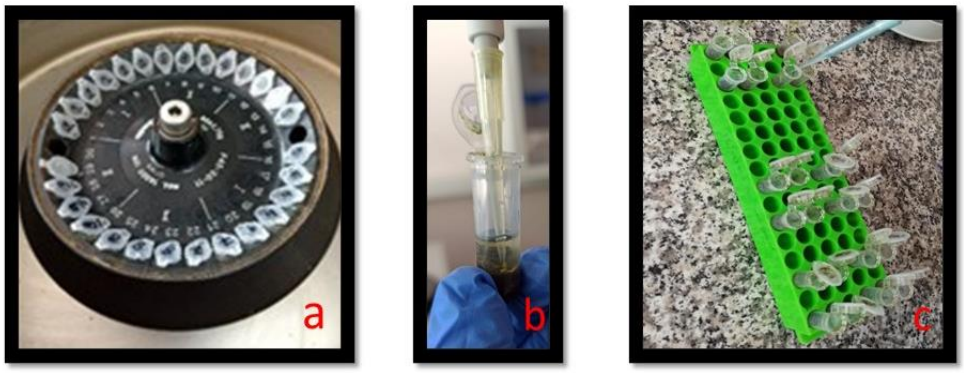
Ekstraksiyon Buffer II: Bu solüsyonun hazırlanmasında %2 CTAB, 1 mM, 10 mM Tris-HCL (pH:8), 1.0 M NaCl, 0.5 g/L Spermidin ve %0,5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır. Ekstraksiyon Buffer II 121°C'de 20 dakika otoklav edilmiş ve kullanılmadan önce 65°C'ye kadar ısıtılmıştır.

Diğer Solüsyonlar: RNA izolasyonunda ayrıca Kloroform isoamil alkol (24:1), 10 M Lityum Klorit, %70'lik Etanol (DEPC ile hazırlanmış saf etanol), İsopropanol (DEPC ile hazırlanmış) 3 M Sodyum Asetat (NaOAc, pH: 5.2) solüsyonları hazırlanarak 4°C'de muhafaza edilmiştir ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

RNA İzolasyon Aşamaları

- Genotiplere ait yaprak ve kök dokuları havanda sıvı azot yardımı ile öğütülmüş ve 150 mg/L PVP (Polyvinylprrolidone) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Her bir tüpün üzerine 65°C'de ısıtılan buffer 1'den 1 ml eklenmiştir. Tüpler hızlıca karıştırılarak 65°C'de, 40 dk süre ile inkübe edilmiştir. Tüpler her 5 dk da bir hızlıca karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.
- Süre sonunda tüplere 24:1 (v/v) kloroform/izoamilalkol eklenmiş ve tüpler iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 20.000 g'de 60 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Süpernatant 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Tüplerin üzerine 3:1 oranında lityum klorür (LiCl) eklenerek 4°C'de en az 16 saat olacak şekilde inkübasyona alınmıştır.
- İnkübasyondan alınan örnekler 20.000 q'de 60 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatlice dökülmüş, pelete 1 ml %96 etanol eklenmiştir.
- Örnekler 20.000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Örneklerden alkol uzaklaştırılarak, pelet bırakılmıştır. Pelete 750 µl, 65°C inkübe edilen ekstraksiyon buffer II eklenmiştir.
- Örnekler 30 dk 65 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Tüplerdeki miktar üzerine 750 µl 24:1 (v/v) oranında kloroform/izoamilalkol eklenmiştir.
- Örnekler 20.000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant alınıp, yeni tüplere aktarılmıştır.
- Süpernatanta 100 µl sodyum asetat (NaOAc) ve 600 µl izopropanol eklenmiş ve örnekler yavaşça karıştırılmıştır.
- Örnekler en az 2 saat -20°C'de inkübe edilmiş ve inkübasyondan alınan örnekler 20.000 g'de 60 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerden sıvı kısım uzaklaştırılarak pelet bırakılmıştır.

- Pelete 1 ml %70 etanol ve 30 µl NaOAc eklenmiştir.
- Örnekler 15.000 g'de 5 dk santrifüj edmiştir ve sıvı kısım dökülerek pelete tekrar 1 ml %70 etanol eklenmiştir.
- Örnekler 5 dk 15.000 g'de santrifüj edilmiştir. Örneklerden alkol uzaklaştırılarak, pelet kurumaya bırakılmıştır.
- Pelet'e 30 µl TE Buffer eklenerek çözdürüldü ve izole edilen örnekler -80°C'de stoklanmıştır.



Şekil 3.11. RNA izolasyonu aşamaları (a: Santrifüj işlemi, b: Süpernatantın alınması, c: Pelete TE buffer eklenmesi)

3.2.6. RNA Örneklerinin Kalite ve Kantite Tayini

İzole edilecek RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ile belirlenmiştir. RNA örneklerinin kalitesi ise 28S ve 18S ribozomal RNA alt birimlerinin varlığı ile değerlendirilmiştir. RNA'nın alt birimlerinin varlığı agaroz jel elektoroforezi ile teyit edilmiştir. Bu amaçla %1,5'luk konsantrasyona sahip agaroz jel hazırlanmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden 5 µl alınmış ve üzerine 1 µL 6X yükleme boyası ve 5 µL ddH_2O eklenerek 100 voltta 60 dk süreyle koşturulmuştur. Süre sonunda agaroz jel UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.7. Primer Optimizasyonu

Real Time PCR reaksiyonlarında kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacı ile klasik PCR reaksiyonları kurulmuştur. Primer optimizasyonunda, sentezlenen cDNA kütüphaneleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonları için kullanılan reaktifler ve hacimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. PCR döngü koşulları 94°C 2 dk (ön denatürasyon), 94°C 1 dk (DNA'nın çift iplikçiğinin ayrılması), 54°C dk (primer bağlanması), 72°C1 dk (yeni iplikçiğin yazılımı), 72°C 5 dk (son yazılım) ve 4°C ∞ olacak şekilde programlanmıştır. PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünleri %2'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. PCR reaksiyonları için kullanılacak reaktifler ve hacimleri

REAKTİF	1X (µl)
Master Mix	25
$MgCl_2$	0,5
Taq DNA polimeraz	0,5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	1
TOPLAM	29

cDNA sentezinin teyit edilmesinin ardından, gen ekspresyonu için kullanılacak primerlerin optimizasyonu yapılmıştır. Klasik PCR reaksiyonu ile bağlanma sıcaklıkları belirlenen primerlerin erime sıcaklıkları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Primerlere ait Tm sıcaklıkları

Primerler	Tm (Erime Sıcaklığı)
Cs18SrR	58°C
Cs_Pol-1	58°C
CsCLCoy_1	58°C
CsCc1-8	58°C
Retro_Cc1_32	58°C
Sire_Cc1	58°C
Sire_Cc1_74	58°C
Sire_Cc1_83	58°C

3.2.8. cDNA Kütüphanelerinin Hazırlanması

cDNA sentezinde Applied Bıosystems Hıgh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LOT: 00756490) kullanılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.3'te verilen reaktifler kullanılarak cDNA sentezi için karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR tüplerine aktarılmıştır ve tüpler Thermalcycler cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. cDNA sentezinde kullanılacak reaktifler ve hacimleri

REAKTİF	**1X (µl)**
10x RT Buffer	2
dNTP Mix	0,8
Random Primer	2
Reverse Transkriptaz	1
H_2O	4,2
Toplam	10

3.2.9. cDNA Sentezi Döngü Koşulları

cDNA sentezi döngü koşullarında, Applied Bıosystems Hıgh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Lot: 00756490) protokolü kullanılmıştır.

Uygulanan protokol 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 80°C 5 dk ve +4°C ∞ 'dur. Sentezlenen cDNA kütüphaneleri Real Time PCR reaksiyonlarına kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.10. Real Time PCR Reaksiyonları

Kantitatif Real Time PCR reaksiyonlarında LTR, *Copia* ve *Gypsy* grubu transpozonlara ait primerler kullanılmıştır. Genotiplere ait dokuların transpozon aktivitelerini karşılaştırmak ve dokulara ait ekspresyon profilinin oluşturmak için qRT-PCR reaksiyonları kurulmuştur. Endojen kontrol olarak 18S rRNA geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılacak genlere ait bilgiler

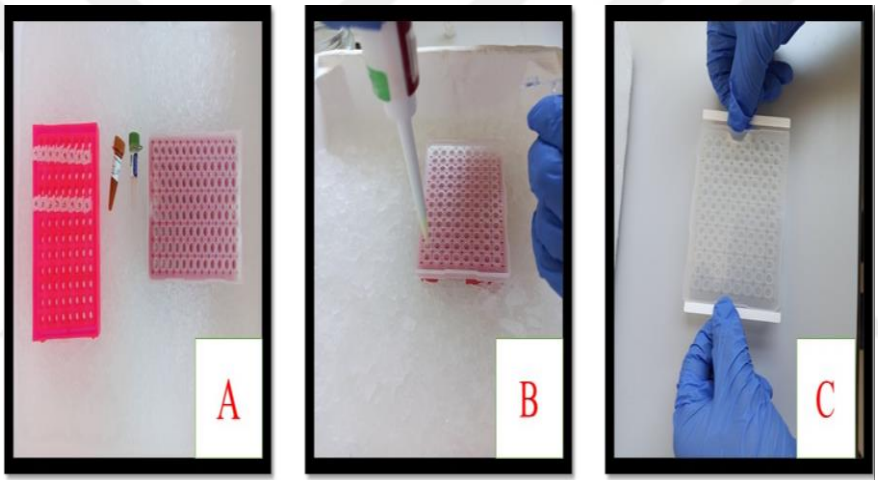
Primerler	**Forward**	**Reverse**
Cs18*SrRNA*	TCGGGTGTTTTCACGTCTCA	TGGATGCCGCTGGGAAGC
Cs Pol-1	TGACAGTCAGAGTGCCTTGCA	TCCTATGTGCTTTGTCCTGGAA
CsCLCoy1	CTATATGGTCCACTGGATAA	ACAAAGTTCT GTTTGGGATT
CsCc1-8	AGGCTCAGCTCGAATCTCTC	TCCTCCTCAATCACGATCGG
Retro_Cc1-32	TGACAAAGCCTGCTGGTTGA	GGCTTGCAGCATGAAGGATG
Sire_Cc1	GGTCGTATATGTCCGGGCTT	TGAAGAAGATTTGGCAGCGG
Sire_Cc1-74	ATGCGGATTTGGAGGGGTAA	ATAGTTACTCGAGTCGGCCG
Sire_Cc1-83	GACGCCGAGTTTCTTCTACG	GTGAGGATGGAGGTGAAGGA

3.2.11. Real-time PCR Amplifikasyonu

Kantitatif Real Time PCR reaksiyonlarında LTR retrotranspozon gen ailesinden 5 farklı transpozona ait primerler kullanılmıştır. Genotiplere ait dokuların transpozon aktivitelerini karşılaştırmak ve dokulara ait ekspresyon profilinin oluşturmak için qRT-PCR reaksiyonları kurulmuştur. Endojen kontrol olarak 18S rRNA geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Real-time PCR reaksiyonları için kullanılacak reaktifler ve miktarları

REAKTİF	**1X(µl)**
SYBR Green	10
Forward Primer	0.8
Reverse Primer	0.8
Template	6
H_2O	2.4
TOPLAM	20



Şekil 3.12. a) RT-PCR amplifikasyonu için reaktiflerin hazırlanması b) Mix hazırlanması c) RT-PCR için plate hazırlanması

3.2.12. Verilerin Analiz Edilmesi ve Gen Ekspresyon Profillerinin Oluşturulması

PCR reaksiyonunda kullanılacak cDNA kütüphanesine ait reaksiyonlar üç tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. qRT-PCR reaksiyonu için hazırlanacak karışımlar Real-Time PCR aparatlarına yüklenerek cihaza yerleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu elde edilecek CT değerleri aşağıdaki 2-ΔΔCt formülüne göre değerlendirilmiştir.

2-(ΔΔCt)

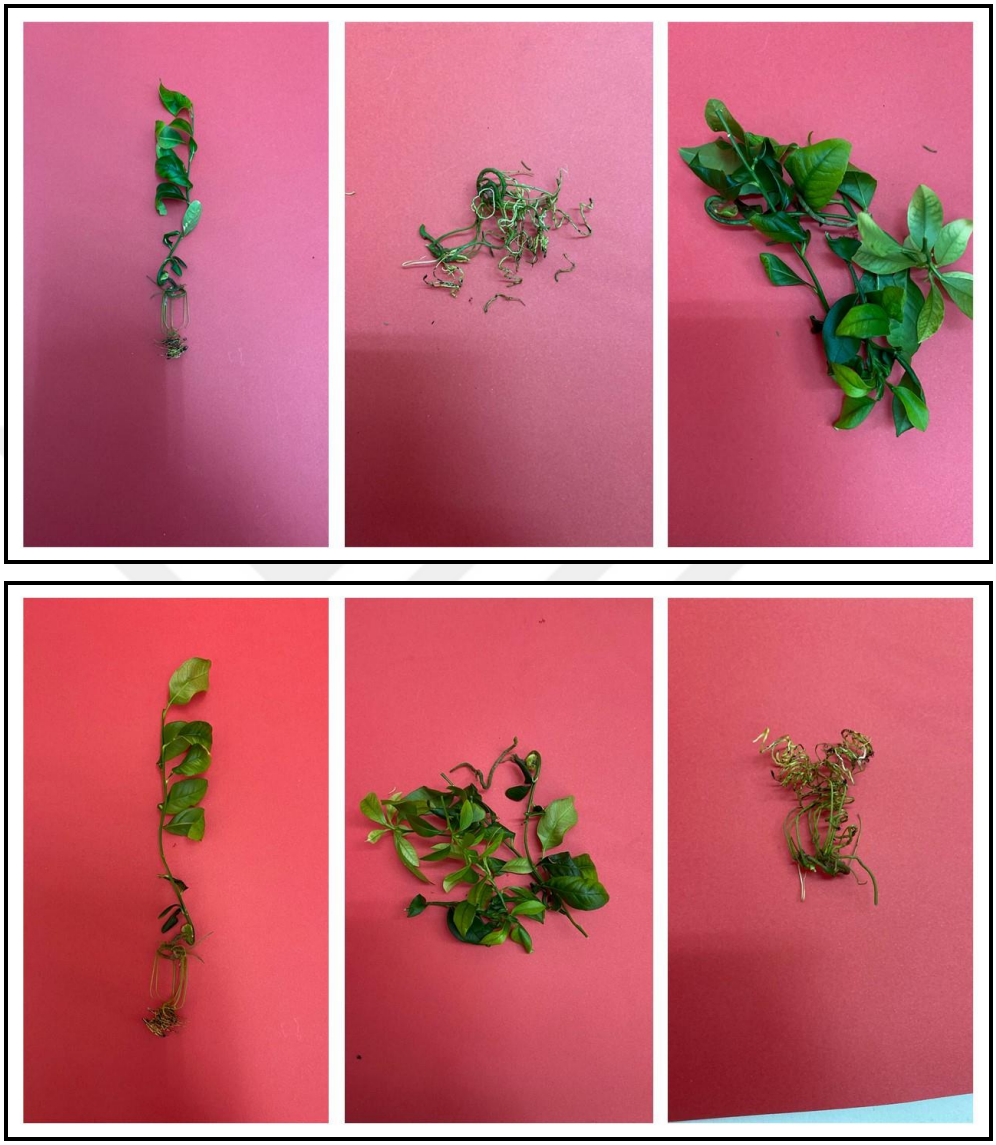
ΔΔCt: [(Ct Hedef gen)- (Ct Endojen gen)]

Değerlendirme sonucunda genotipler arasında oluşan transpozon elementlerin aktivitelerinin karşılaştırılması ve dokulara ait ekspresyon profillerinin sağlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyal, Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmada, Tuzcu 31-31, Kleopatra Mandarin, Kaba Limon ve Makrofilla anaçlarına ait yaprak ve kök dokuları kullanılmıştır. *İn vitro* koşullarda uygulanan kuraklık stresinin, anaçlara olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla bazı *LTR* Retrotranspozonların aktiviteleri araştırılmış ve çeşitlere ait *LTR* retrotranspozonların gen ekspresyon düzeyi ve evrimsel süreçte değişen retrotranspozon aktiviteleri qRT-PCR ile tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu, Kaba Limon, Kleopatra Mandarin ve Makrofilla turunçgil anaçlarının *in vitro* kuraklık stresi denemesi kontrol grubu ve uygulama grubu olacak şekilde kurulmuştur. Stres sonrası çeşitlere ait yaprak ve kök dokuları alınmıştır. Çeşitlere ait dokular steril bisturi ile alınarak alüminyum folyolara sarılarak -80'de RNA izolasyonu aşamasına kadar muhafaza edilmiştir. Kuraklık stresi sonucunda alınan yaprak ve kök dokularına ait görseller Şekil 4.1 verilmiştir.



Şekil 4.1. Kuraklık stresi uygulanmış genotiplerin yaprak ve kök dokularının alınması

Kontrol ve uygulama gruplarından alınan yaprak ve kök dokuları kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. TRIzol yöntemine göre izole edilen RNA örneklerinin kalite ve kantite tayinleri, NanoDrop fotospektrofotometre ve agaroz jel elektroforez sistemleri ile yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerine ait

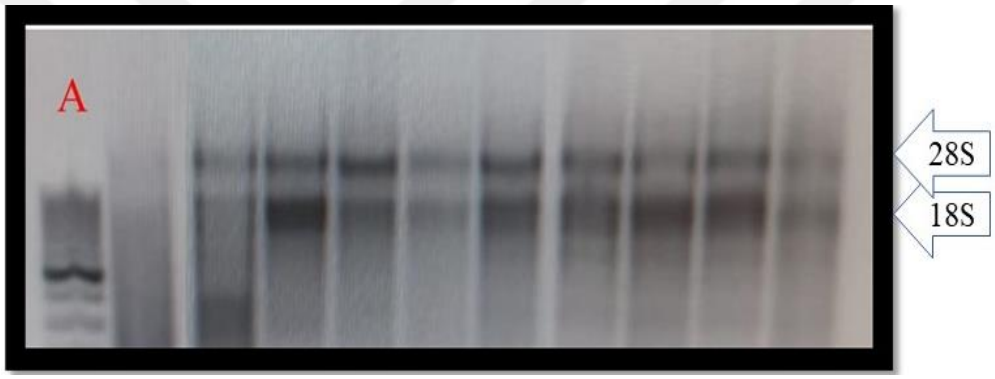
konsantrasyonlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin 18S rRNA ve 28S rRNA birimlerin varlığı agaroz jel ile teyit edilmiştir. Örneklere ait jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. RNA Örneklerine Ait Değerler (T: Tuzcu 31-31, K: Kleopatra Mandarin, M: Makrofilla, L: Kaba Limon)

Örnekler	No	Konsantrasyon (ng/ul)	260/280	260/230
T. Kontrol Yaprak	1	1477.59	2.10	1.62
T. Kontrol. Kök	2	756.66	2.00	1.85
T. Uygulama Yaprak	3	914.68	2.15	1.71
T. Uygulama Kök	4	1082.34	1.94	2.17
K. Kontrol Yaprak	5	1069.32	2.08	1.99
K. Kontrol Kök	6	888.13	2.03	1.63
K. Uygulama Yaprak	**7**	853.94	2.09	2.19
K. Uygulama Kök	**8**	1052.02	1.97	1.68
M. Kontrol Yaprak	**9**	938.07	1.95	1.93
M. Kontrol Kök	**10**	221.01	1.92	1.78
M. Uygulama Yaprak	**11**	472.80	1.91	1.87
M. Uygulama Kök	**12**	195.51	1.95	1.81
L. Kontrol Yaprak	**13**	606.21	2.21	1.77
L. Kontrol Kök	**14**	859.43	1.99	2.04
L. Uygulama Yaprak	**15**	824.87	1.90	1.98
L. Uygulama Kök	**16**	973.01	2.00	1.79

260/280 nm dalga boyundaki absorbans sonuçlarına bakıldığında değerlerin 1.90-2.15 ng/µL aralığında olduğu görülmektedir. Bu sonuç RNA'nın yüksek kalitede olduğu ve protein kontaminasyonu içermediğini göstermektedir. RNA örneklerine ait spektrofometrik sonuçlar değerlendirildiğinde elde edilen RNA miktarlarının 195.51 ile 1477.59 ng/µL arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan turunçgil anaç genotiplerine ait RNA'lar incelendiğinde,

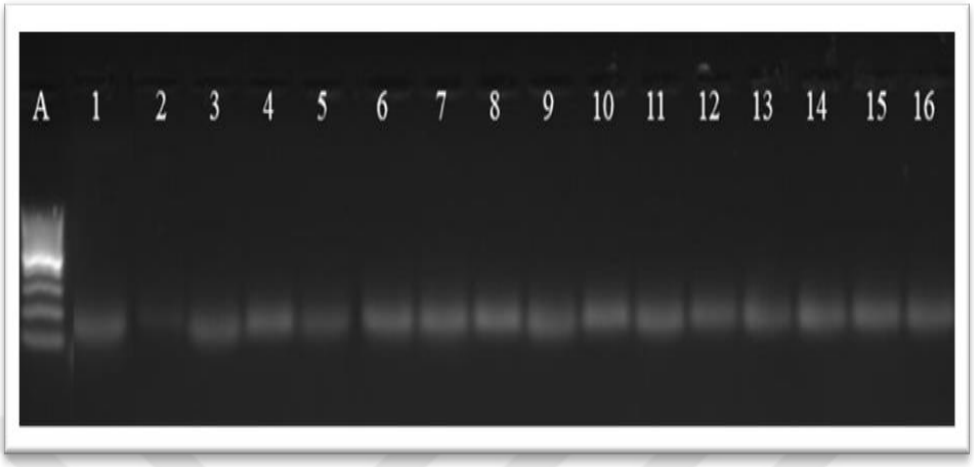
RNA miktarları yeterli bulunmuştur. 260/230 oranı, Trizol, fenol, Guanidin HCL ve Guanidin Tiyosiyanat gibi istenmeyen organik bileşiklerin varlığını belirtmek için kullanılır. Genel olarak kabul edilebilir 260/230 oranları 2.0 – 2.2 aralığında kontaminasyonun minimum düzeyde olduğu kabul edilir (Nybo, 2011). 260/230 nm dalga boyundaki absorbans değerleri incelendiğinde, RNA örneklerinin 1.62 ile 2.19 aralığında olduğu belirlenmiştir. İzole edilen RNA örneklerine ait kalite ve kantite parametreleri incelendiğinde elde edilen sonuçların cDNA kütüphanelerinin oluşturulması için uygun oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Bazı RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (*A; 100 kb DNA Ladder*)

4.1. cDNA Sentezi ve Primer Optimizasyonuna Ait Sonuçlar

Sentezlenen cDNA kütüphanelerinin kontrolü endojen kontrol olarak kullanılan 18S rRNA genine ait primerle yapılmıştır. cDNA kütüphaneleri ve 18Sr RNA primeri kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. PCR ürünleri %2'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde koşturulmuştur. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV ışı altında görüntülenmiştir. Agaroz jele ait görüntüler Şekil 4.2'de verilmiştir.

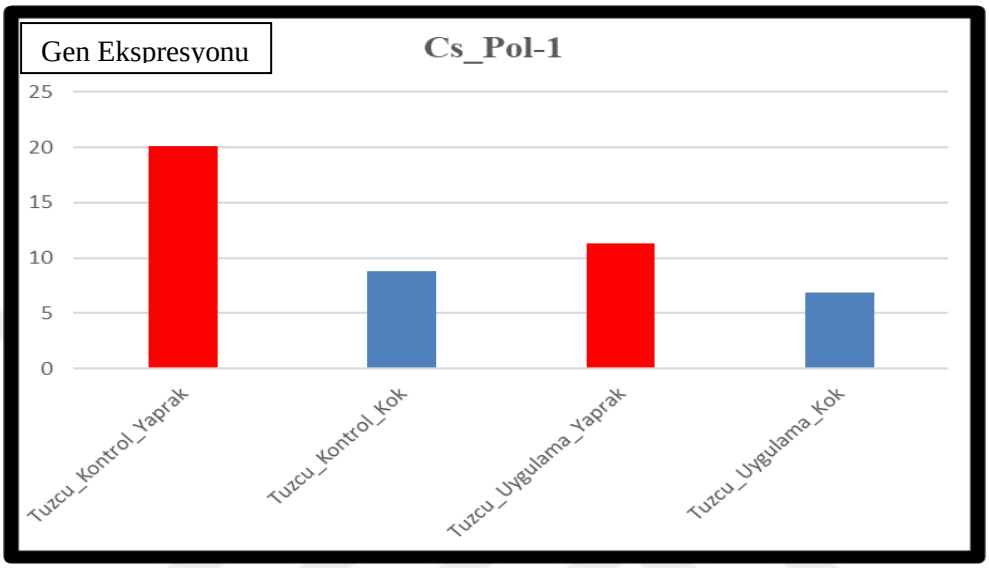


Şekil 4.3. Genotiplere ait cDNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü (*A; 100 kb DNA Ladder, Numaralar Çizelge 4.1'deki Örnek Numaralarına göre sıralanmıştır*.)

4.2. Genotiplere Ait Dokuların Gen İfade Düzeyleri

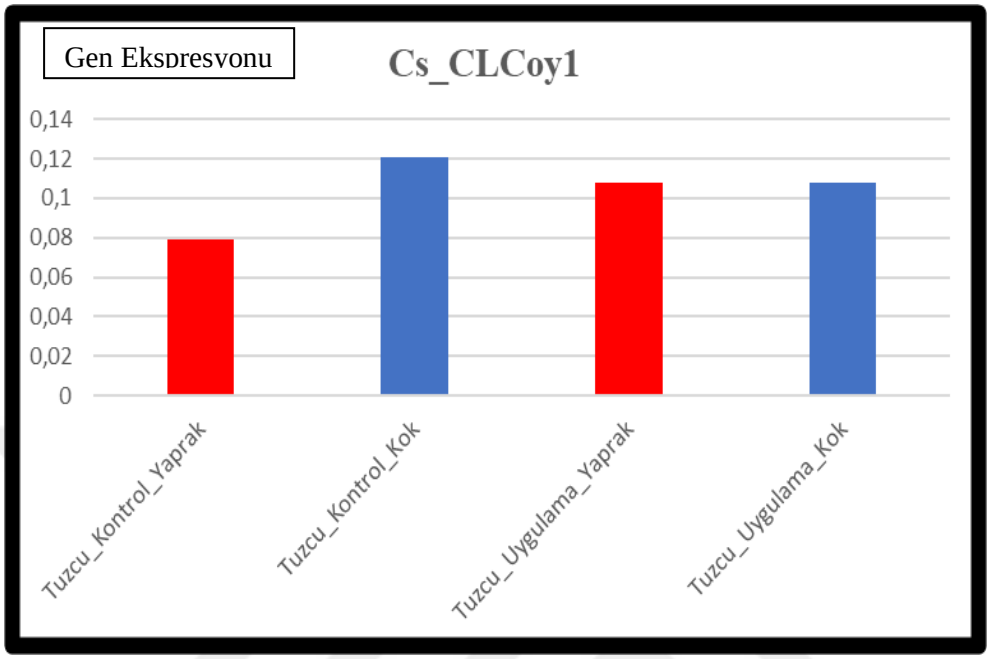
Real-Time PCR analizleri ile Tuzcu 31-31, Kleopatra Mandarin, Makrofilla ve Kaba limona ait kök ve yaprak dokularının Cs_Pol-1, CsCLCoy_1, CsCc1-8, Retro_Cc1_32, Sire_Cc1, Sire_Cc1_74 ve Sire_Cc1_83 genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Analizlerde 2-ΔΔCt formülü kullanılarak dokulara ait gen ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Çeşitlere ait dokuların sahip olduğu gen ekspresyon düzeyleri ilgili görsellerde verilmiştir (Şekil 4.3.).

4.3. Tuzcu 31-31 Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri



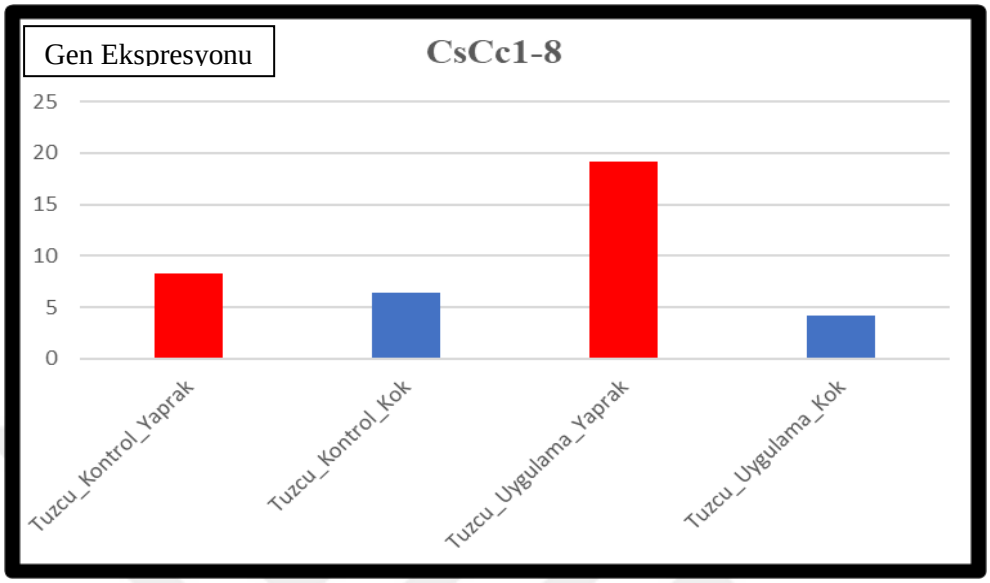
Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Cs_Pol-1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Tuzcu 31-31'de kuraklık stresine bağlı olarak, Cs_Pol-1 retrotranspozonun uygulama yaprak grubunun, kontrol yaprak grubuna kıyasla ekspresyon düzeyinde yaklaşık 2 kat oranında düşüşlerin olduğu, kök gruplarında ise ekspresyon düzeyinde önemli oranda bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



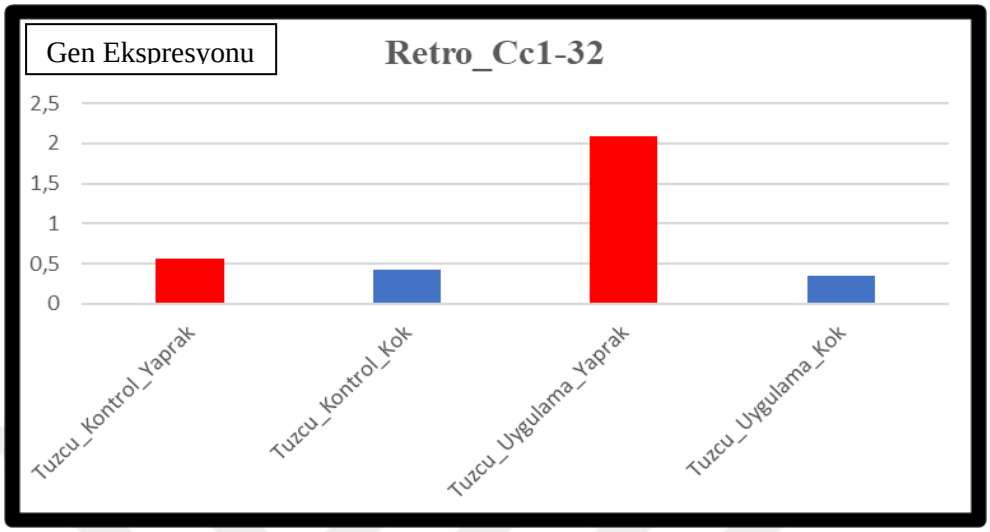
Şekil 4.5. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Tuzcu 31-31 genotipinde kuraklık stresine bağlı olarak, Cs_CLCoy1 retrotranspozonun uygulama yaprak grubunun gen ekspresyon seviyesi kontrol yaprak grubuna göre yaklaşık 1 kat oranında arttığı, kök gruplarının gen ekspresyon seviyelerinde önemli bir değişimin görülmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



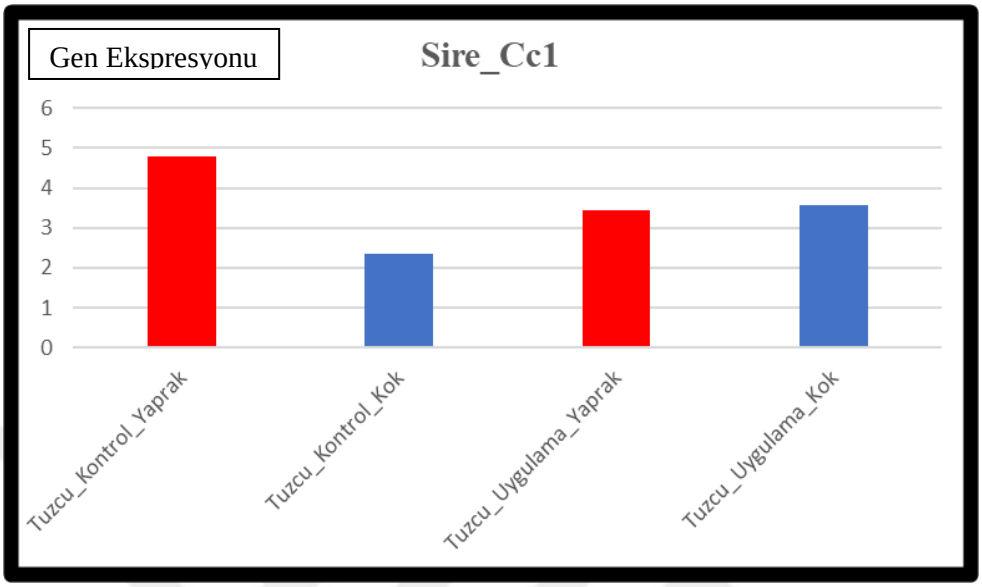
Şekil 4.6. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların CsCc1-8 genindeki ekspresyon seviyeleri

CsCc1-8 genine ait ekspresyon düzeyi incelendiğinde Tuzcu 31-31 genotipinin uygulama yaprak grubundaki gen ifade seviyesinin kontrol grubuna kıyasla önemli artış gösterdiği görülmüştür. Dokular arasında görülen artış oranının 2,5 kat olduğu belirlenmiştir. Uygulama kök grubunda ise kontrol grubuna kıyasla düşüşlerin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



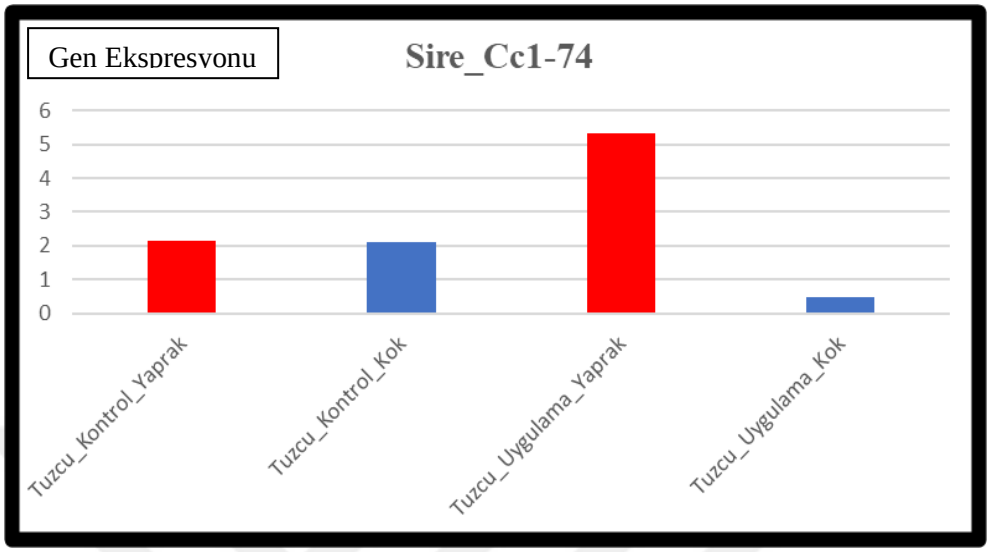
Şekil 4.7. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri

Retro_Cc1-32 geninin ekspresyon düzeyi kontrol yaprak grubuna kıyasla uygulama yaprak grubunda önemli derecede artış gösterdiği görülmüştür. Kontrole göre uygulama grubunda yaklaşık 4 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, Tuzcu 31-31'in kök gruplarında Retro_Cc1_32 retrotranspozonunun ekspresyon seviyesi önemsenmeyecek düzeyde değişimler tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



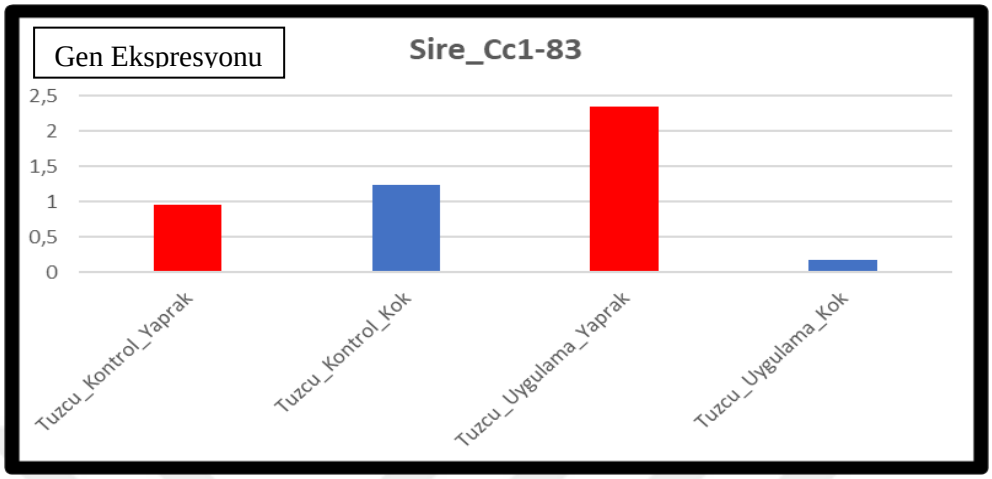
Şekil 4.8. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Sire_Cc1 geninde, Tuzcu 31-31 genotipinde kontrol yaprak grubundaki gen ekspresyonu seviyesi uygulama yaprak grubuna göre 1,5 kat artmışken, kontrol kök grubunun gen ekspresyon seviyesi uygulama kök grubuna göre yaklaşık 1,5 kat azalmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1-74 genindeki ekspresyon seviyeleri

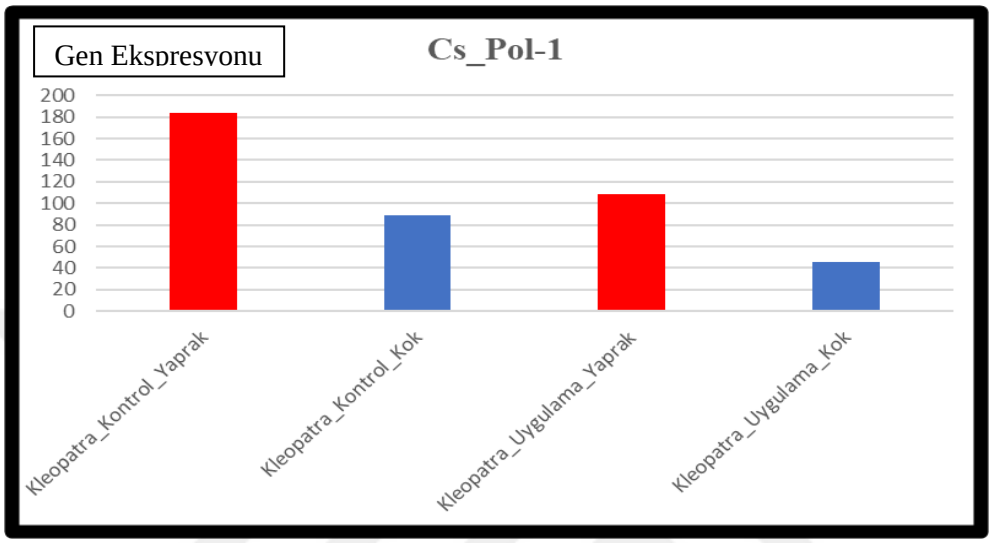
Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1-74 genindeki ekspresyon seviyelerinde ise, kontrol kök grubunun uygulama kök grubuna göre 5 kata kadar artış gösterdiği ve kontrol yaprak grubunun uygulama yaprak grubuna göre de yaklaşık 2,5 kat düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Tuzcu 31-31 genotipine ait dokuların Sire_Cc1-83 genindeki ekspresyon seviyeleri

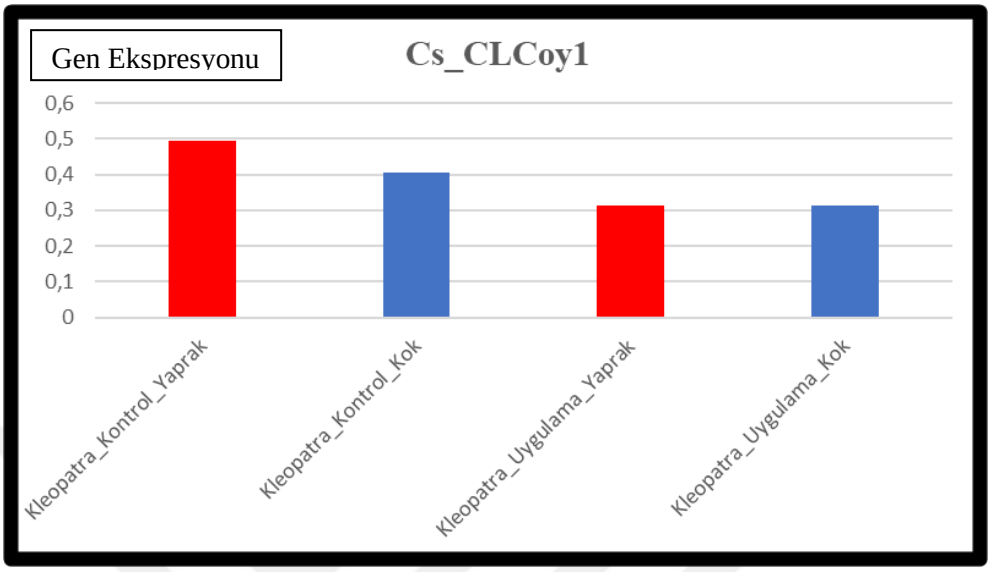
Tuzcu 31-31 genotipinde Şekil 4.3.7'de görüldüğü gibi, Sire_Cc1-83 genindeki ekspresyon seviyeleri uygulama yaprak grubunun kontrol yaprak grubuna kıyasla yükseldiği ve uygulama kök grubunun ekspresyon seviyesinin ise kontrol kök grubuna kıyasla önemli derecede düşüş gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.10).

4.4. Kleopatra Mandarin Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri



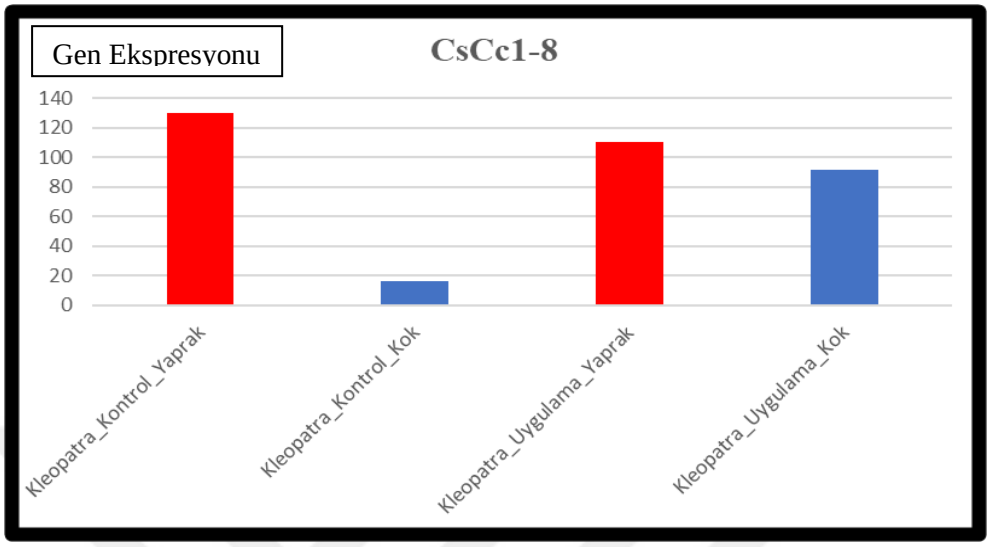
Şekil 4.11. Kleopatra mandarin genotipine ait dokuların Cs_Pol_1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Cs_Pol_1 geninde, Kleopatra mandarin genotipinde (Şekil 4.11) uygulama kök ve yaprak grubunun kontrol kök ve yaprak grubuna göre ekspresyon seviyelerinin önemli derecede düşüş gösterdiği görülmüştür.



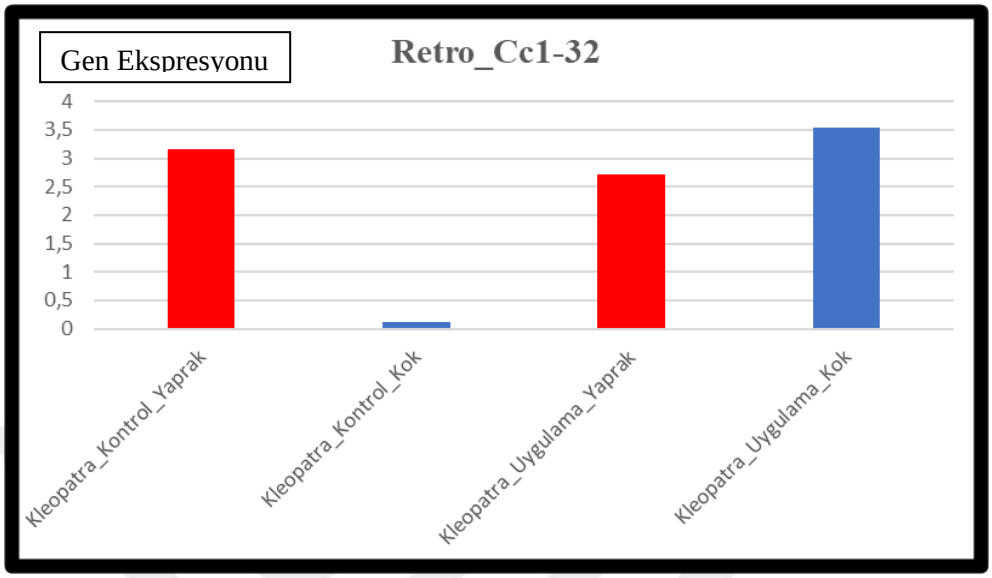
Şekil 4.12. Kleopatra mandarin genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri

CsCLCoy_1 retrotranspozonun kuraklık stresi uygulanmış yaprak ve kök dokularında düşüşlerin olduğu tespit edilmiştir. Kök dokularında meydana gelen düşüşlerin önemli bir seviyede olmadığı gözlenmiştir fakat yaprak dokularında görülen değişimin önemli olduğu ve bu değişimin kontrol grubuna kıyasla uygulama grubunda gözlendiği, ekspresyonun negatif yönlü olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).



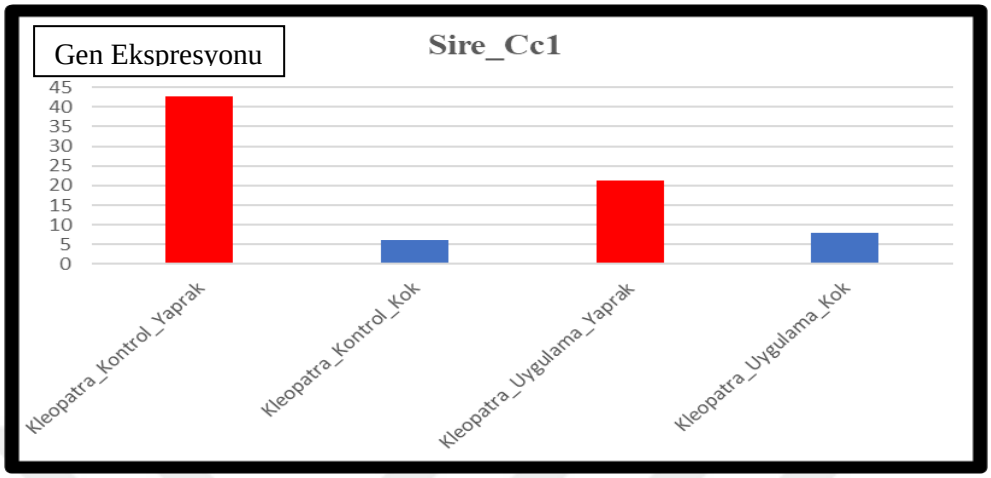
Şekil 4.13. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların CsCc1-8 genindeki ekspresyon seviyeleri

CsCc1-8 geninde, yaprak dokularında retrotranspozon aktivitesinin önemli değişiklik göstermediği fakat kök dokuların önemli değişimin olduğu görülmüştür. Kök dokularında kontrole kıyasla uygulama grubunda artışların olduğu meydana gelen artışların yaklaşık 4 katı bulduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.13).



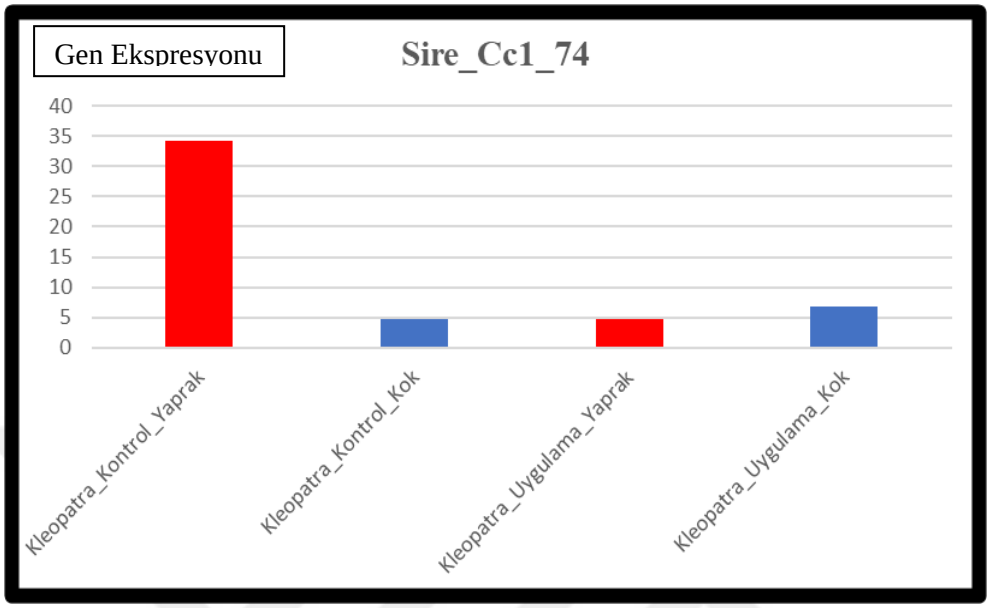
Şekil 4.14. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri

Retro_Cc1-32 genine ait ekspresyon seviyesi incelendiğinde yaprak gruplarında önemli bir değişim gözlemlenmezken, kök gruplarında önemli bir değişimin olduğu ve değilim yönünün kontrole kıyasla uygulama grubunda pozitif yönlü olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. (Şekil 4.14).



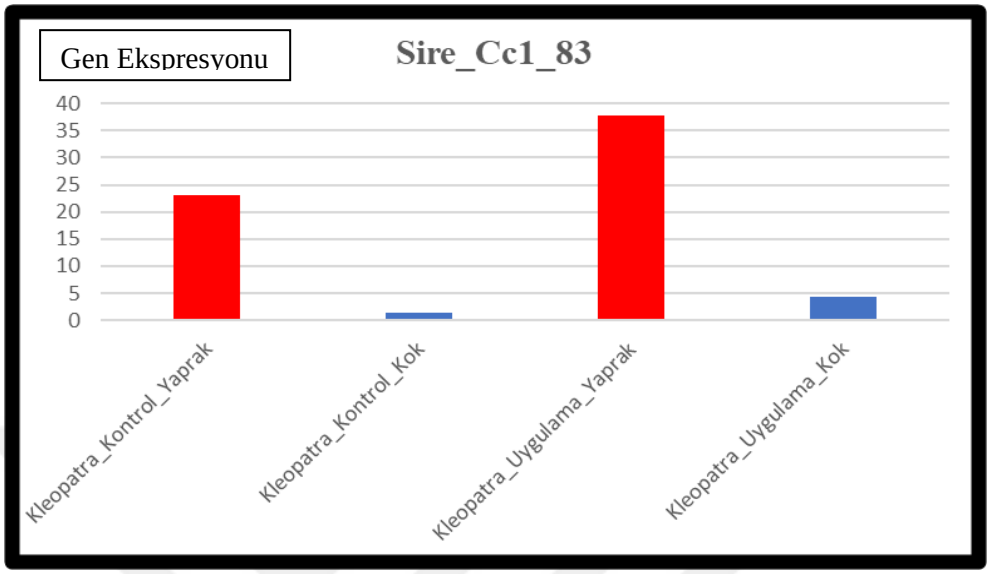
Şekil 4.15. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Sire_Cc1 geninin, ekspresyon seviyesi kök gruplarında önemli ölçüde değişmezken, yaprak gruplarında ise uygulamaya göre kontrol grubunun ekspresyonunda 2 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.16. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1_74 genindeki ekspresyon seviyeleri

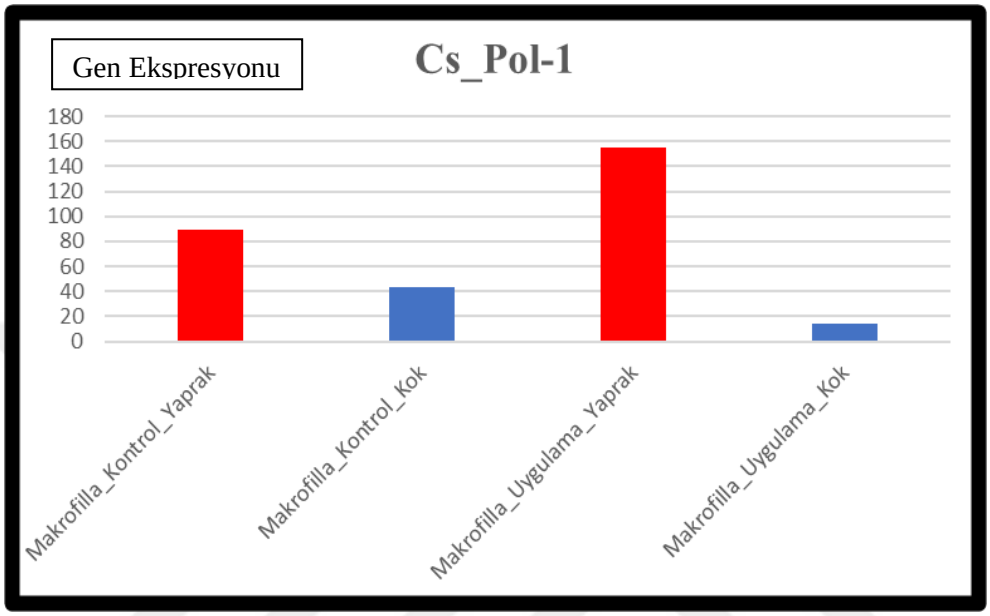
Sire_Cc1_74 geni, kök gruplarında önemli oranda değişim göstermemiştir fakat uygulama yaprak grubu ekspresyonunun kontrol yaprak grubu ekspresyonuna göre 7 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.17. Kleopatra Mandarin genotipine ait dokuların Sire_Cc1_83 genindeki ekspresyon seviyeleri

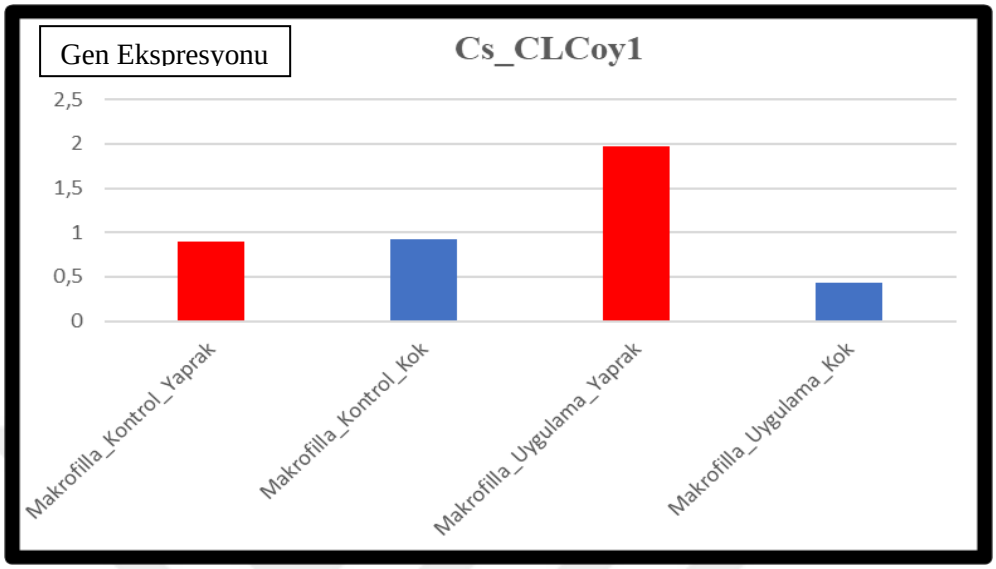
Sire_Cc1_83 geni, uygulama kök grubuna kıyasla kontrol kök grubunda ekspresyonunun önemli bir ölçüde değişmediği, uygulama yaprak grubunun ise kontrol yaprak grubuna kıyasla ekspresyonuna yaklaşık 2 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).

4.5. Makrofilla Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri



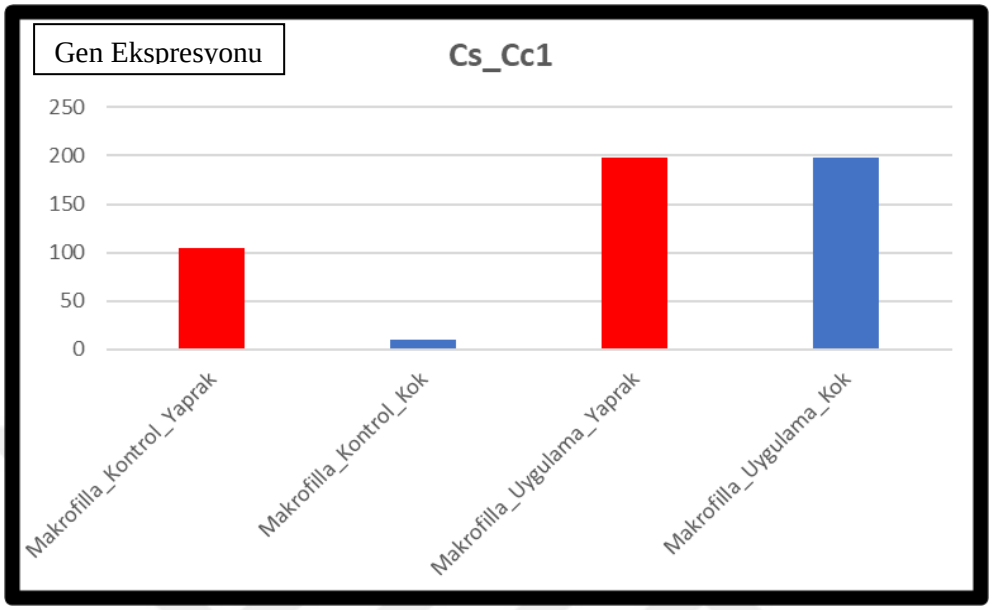
Şekil 4.18. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_Pol-1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Cs_Pol-1 geninde, uygulama kök grubunun kontrol kök grubuna göre yaklaşık 3 kat azaldığı ancak uygulama yaprak grubunun gen ekspresyonunun kontrol yaprağa göre 1,5 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



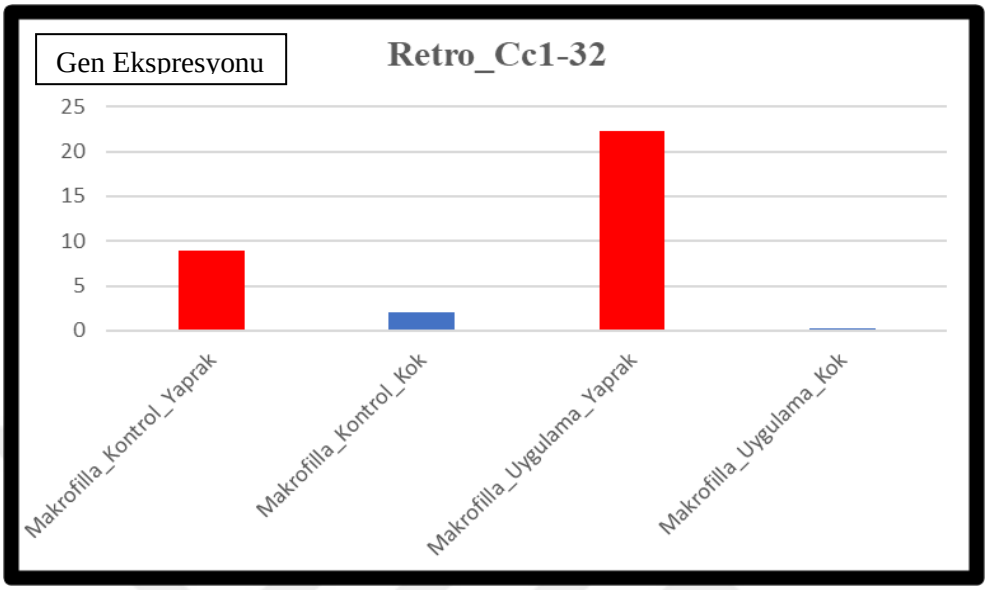
Şekil 4.19. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_CLCoy1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Cs_CLCoy1'de, uygulama yaprak grubu ekspresyonunun kontrol yaprak grubu ekspresyonuna göre yaklaşık 2 kat arttığı ancak kök gruplarında uygulama grubunun kontrol grubuna göre ekspresyonunun 2 kat azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



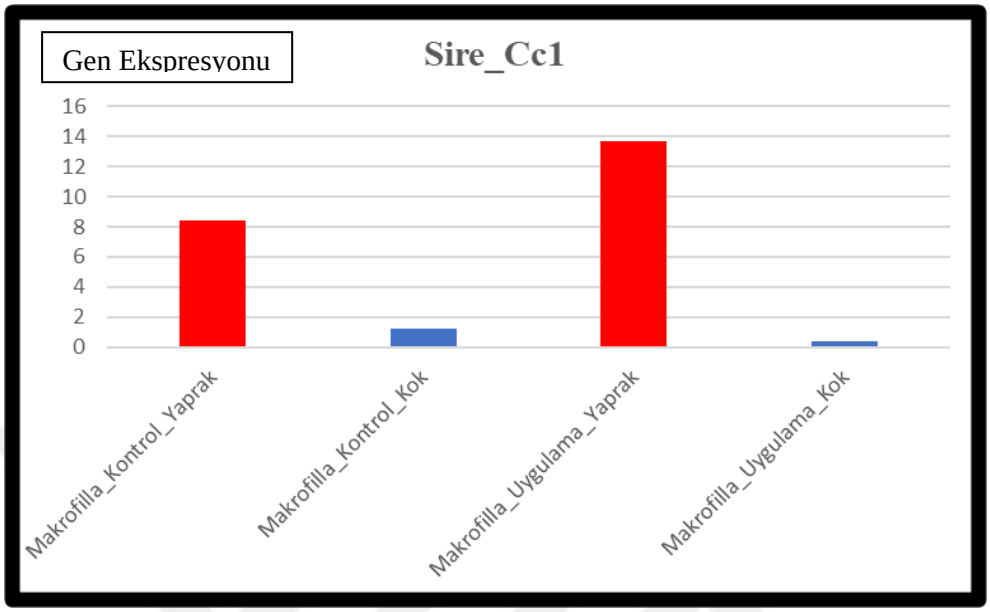
Şekil 4.20. Makrofilla genotipine ait dokuların Cs_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Cs_Cc1 geni için ise, uygulama yaprak grubunun kontrol yaprak grubuna göre gen ekspresyonu 2 kat artmış ve uygulama kök grubunda ekspresyon seviyesi ise kontrol kök grubu ekspresyon seviyesine oranla önemli bir ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.20).



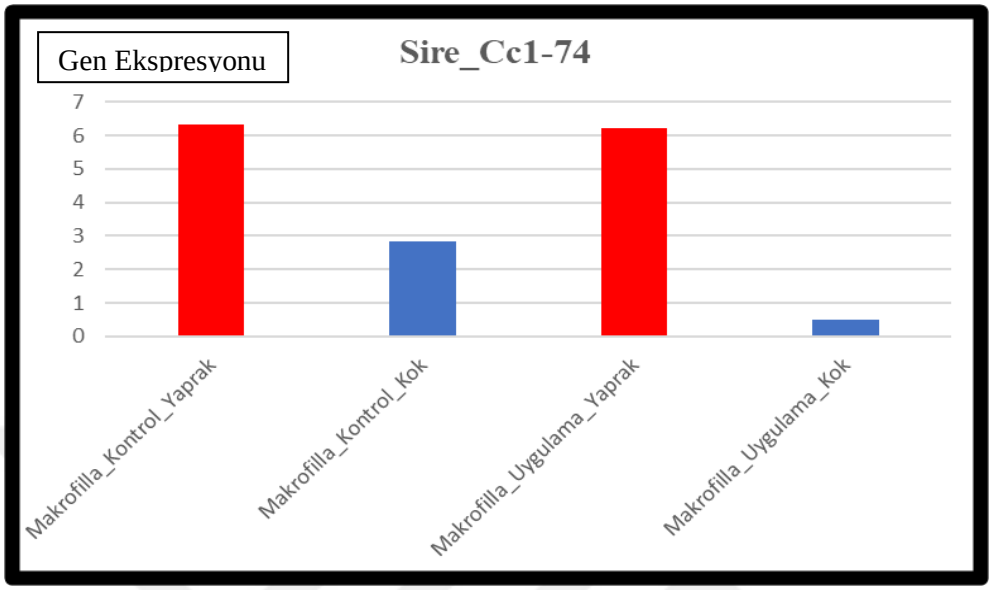
Şekil 4.21. Makrofilla genotipine ait dokuların Retro_Cc1-32 genindeki ekspresyon seviyeleri

Retro_Cc1-32'de uygulama yaprak grubunun gen ekspresyonu kontrol yaprak grubuna kıyasla artış 2 kat olmuştur, kök grupları içerisindeki gen ekspresyon düzeyindeki değişim ise dikkate alınmayacak seviyede kalmıştır (Şekil 4.21).



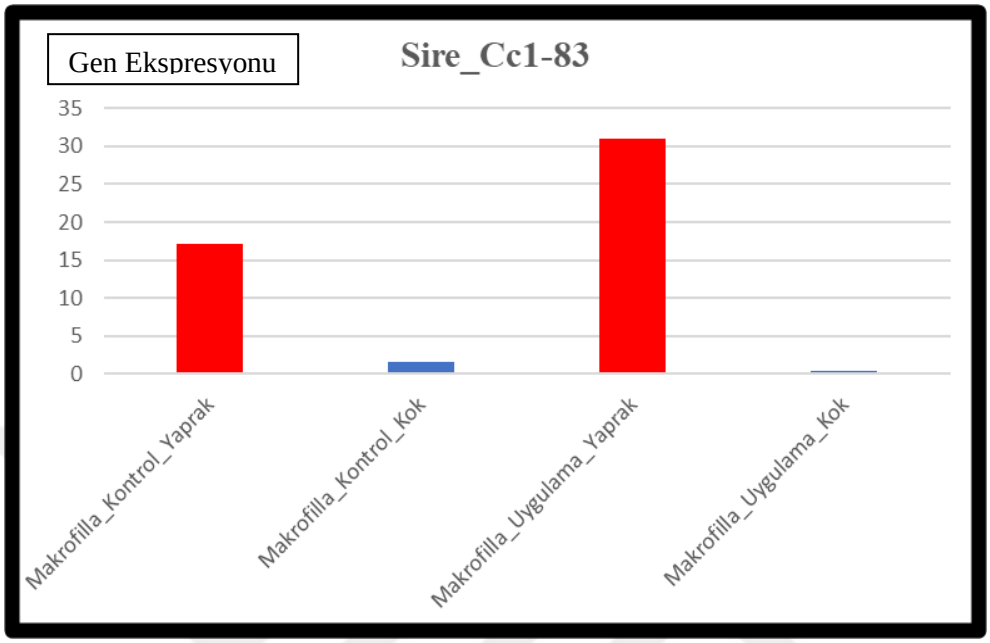
Şekil 4.22. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Sire_Cc1 geninde ise, Makrofilla genotipinde kök gruplarındaki ekspresyon değişimi önemli ölçüde değişmezken, kontrol yaprak grubunun uygulama yaprak grubuna göre gen ekspresyon düzeyinin 1,5 kattan daha fazla bir artış sağladığı görülmektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.23. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1-74 genindeki ekspresyon seviyeleri

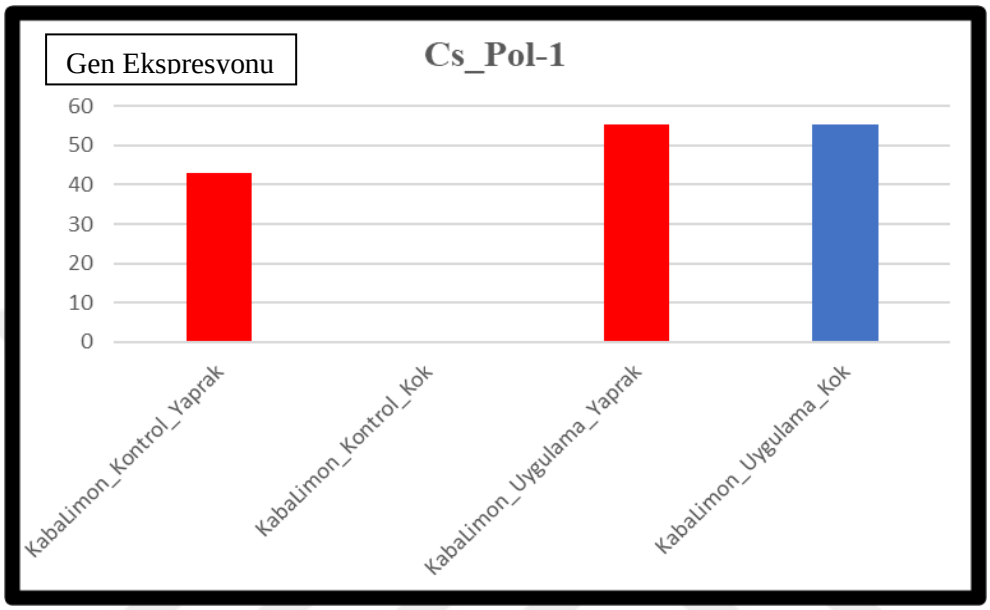
Sire_Cc1-74 geninde ise, Makrofilla genotipinki uygulama kök grubunun ekspresyonunun kontrol kök grubu ekspresyonuna göre 5 kat azaldığı ancak yaprak gruplarındaki ekspresyonda önemli bir değişim olmadığı görülmüştür (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Makrofilla genotipine ait dokuların Sire_Cc1-83 genindeki ekspresyon seviyeleri

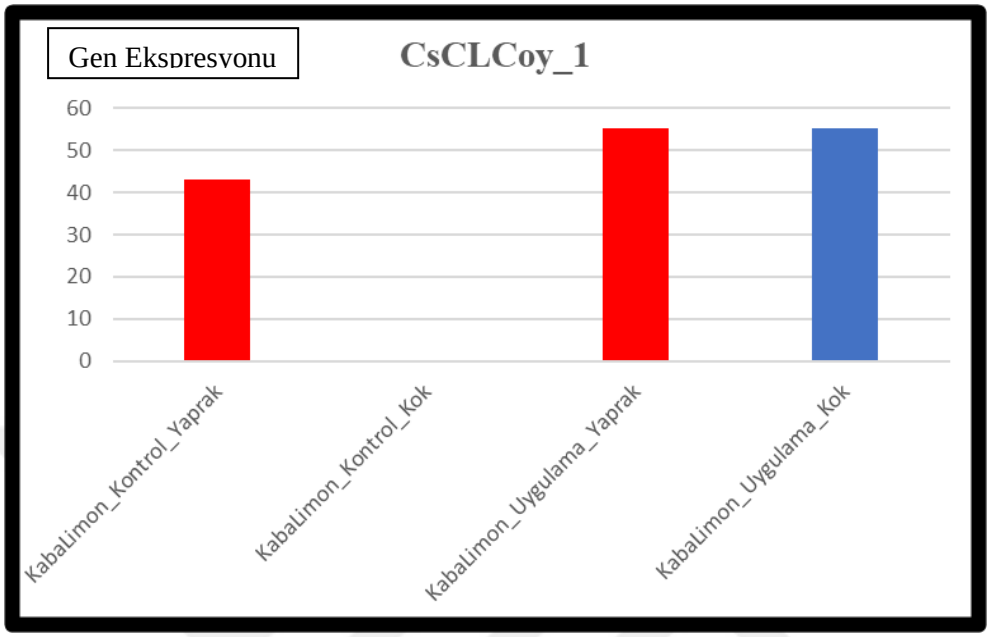
Sire_Cc1-83 geninde, Makrofilla genotipindeki gen ekspresyonunun uygulama kök grubunun kontrol kök grubuna göre değişmediği ancak uygulama yaprak grubunun gen ekspresyonunun kontrol yaprak grubu gen ekspresyonuna göre yaklaşık 2 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24).

4.6. Kaba Limon Turunçgil Anacında Genlerin İfade Düzeyleri



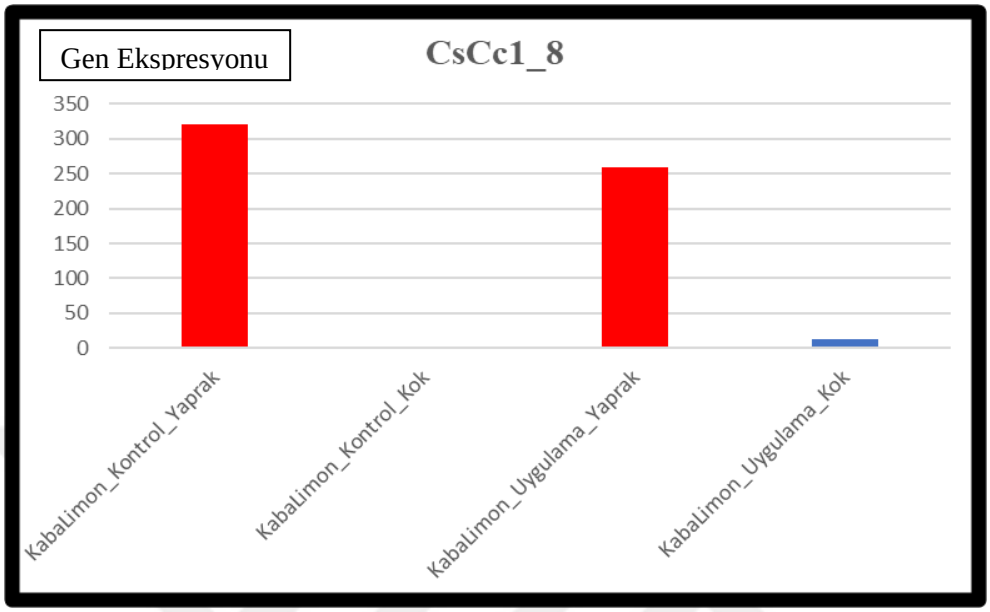
Şekil 4.25. Kaba limon genotipine ait dokuların Cs_Pol_1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Cs_Pol_1 geninde, Kaba limon genotipindeki uygulama yaprak grubunun ekspresyon seviyesinin kontrol yaprak grubunun ekspresyon seviyesine göre 1,2 oranda arttığı, buna karşı uygulama kök grubunun kontrol kök grubuna göre oldukça yüksek bir seviyede arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



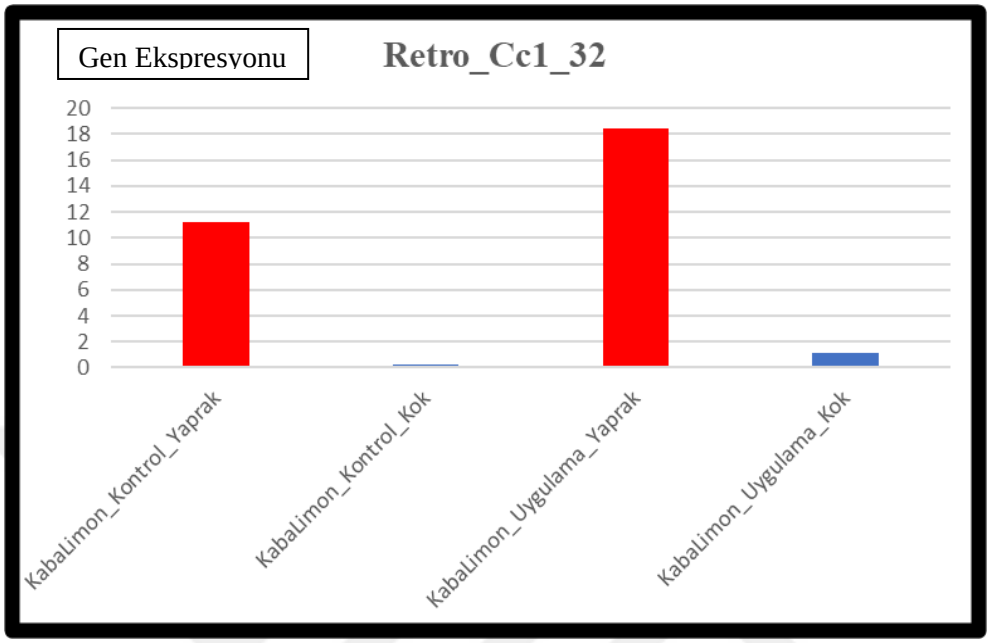
Şekil 4.26. Kaba limon genotipine ait dokuların CsCLCoy_1 genindeki ekspresyon seviyeleri

CsCLCoy_1 geninde ise Cs_Pol_1 geninde olduğu gibi, Kaba limon genotipindeki uygulama kök grubunun ekspresyonunun kontrol kök grubu ekspresyonuna göre oldukça fazla oranda artış gösterdiği gözlemlenmekteyken, uygulama yaprak grubundaki ekspresyon seviyesi kontrol yaprak grubundaki ekspresyon seviyesine göre 1,2 kat kadar bir artış göstermiştir (Şekil 4.26).



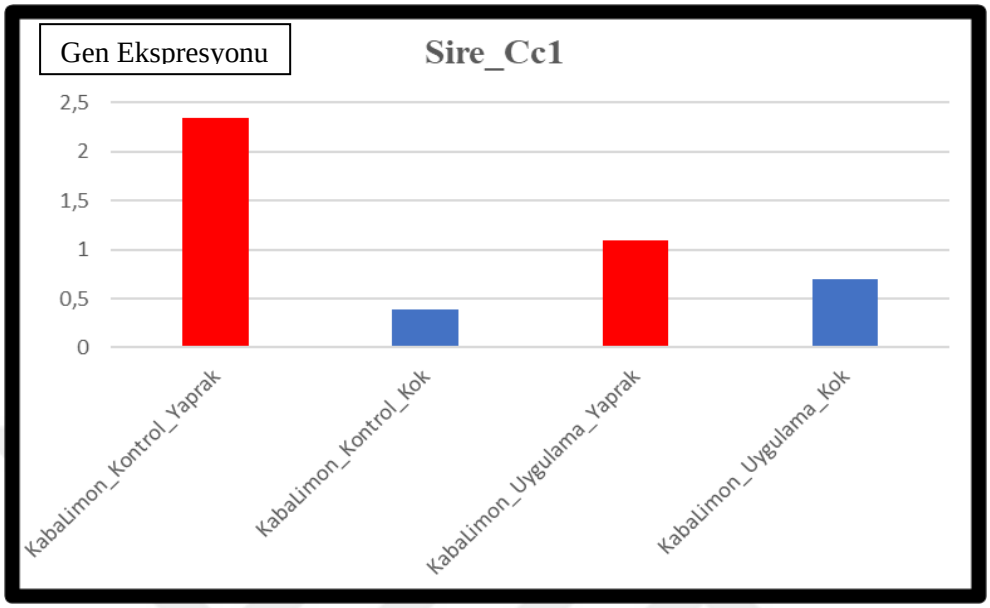
Şekil 4.27. Kaba limon genotipine ait dokuların CsCc1_8 genindeki ekspresyon seviyeleri

CsCc1_8 geninde, kök gruplarında ekspresyon seviyesi önemli ölçüde değişmezken, kontrol yaprak grubundaki ekspresyonun uygulama yaprak grubundaki ekspresyona göre 1,2 kat artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).



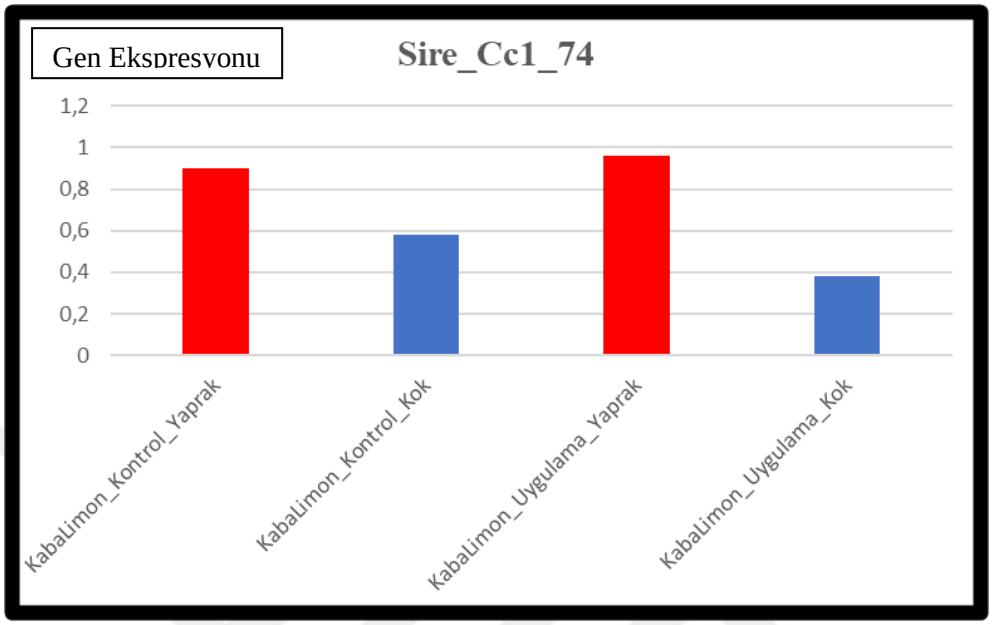
Şekil 4.28. Kaba limon genotipine ait dokuların Retro_Cc1_32 genindeki ekspresyon seviyeleri

Retro_Cc1_32 geninin ekspresyon düzeyi incelendiğinde, kök gruplarının ekspresyonu önemli ölçüde değişmemiştir ancak uygulama yaprak grubunun gen ekspresyon seviyesi kontrol yaprak grubunun gen ekspresyon seviyesine göre yaklaşık 1,5 kat kadar artmıştır (Şekil 4.28).



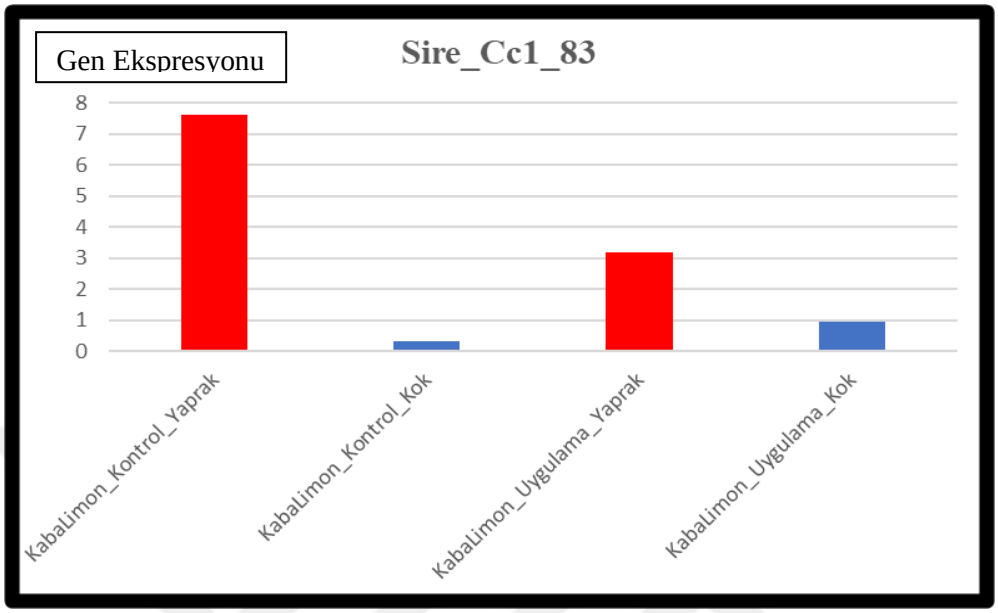
Şekil 4.29. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1 genindeki ekspresyon seviyeleri

Sire_Cc1 geninde, kontrol yaprak grubunun ekspresyon seviyesi uygulama yaprak grubuna oranla 2 kat fazlayken, kök gruplarındaki ekspresyon seviyelerinde ise uygulama grubunda 2 kat kadar arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.30. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1_74 genindeki ekspresyon seviyeleri

Sire_Cc1_74'te yaprak gruplarının ekspresyon düzeyinde önemli ölçüde değişim gözlemlenmezken, kontrol kök grubunun ekspresyonun seviyesi uygulama kök grubunun ekspresyonuna göre 1,5 kat arttığı görülmektedir (4.30).



Şekil 4.31. Kaba limon genotipine ait dokuların Sire_Cc1_83 genindeki ekspresyon seviyeleri

Son olarak Sire_Cc1_83 geninde, kök gruplarındaki ekspresyon seviyesinde değişim görülmezken, kontrol yaprak grubundaki ekspresyon düzeyi uygulama yaprak grubundaki ekspresyon düzeyine göre yaklaşık 2,5 kat kadar artmıştır (Şekil 4.31).

Analiz sonucunda elde edilen, grafiksel olarak gösterilen gen ekspresyon profillerindeki değişimler aşağıda tartışılmıştır.

Borreda ve ark. (2019), turunçgil retrotranspozonlarının, adaptasyonla ilgili genetik yanıtın bir parçası olarak türleşmeye yön veren stres koşullarına yanıt verebileceğini ön görmektedirler. Böylece her türün gelişen koşullarının, hareketli elementlerin çoğalmasını kontrol eden genomun iç düzenleyici mekanizmaları ile etkileşime girdiğini varsaymaktadırlar. Bu çalışma, 3 SIRE retrotranspozunun kuraklık stresine bağlı ekspresyon seviyelerinin farklılıklarıyla, stres uygulanan 4 genotipin evrimsel süreçleri arasında bir ilişkisi olabileceğini gösterebilmektedir. Çalışmamızda özellikle kuraklık stresi karşısında ekspresyon seviyesinde artış

gösteren veya yüksek yanıt veren genotiplerin anaç olarak kullanılabileceği düşünülebilmektedir.

De Felice ve ark. (2009), yaptığı çalışmada, CLCoy1 retrotranspozonun *C. aurantium, Fortunella margarita* ve *C. paradisi* gibi diğer *Citrus* türlerinde de tanımlanmış olduğunu, ancak *Poncirus trifoliata*'da görülmediğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca tuz ve bazı abiyotik stres uygulamalarıyla *C. limon*'da bu retroelementin transkripsiyonel ekspresyonunu belirlemişlerdir. Ty1-copia benzeri elementi olan CLCoy1'un, turunçgil türlerinin evrimi sırasında genom yapısını ve boyutunu şekillendirmede önemli bir rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir. Bu çalışmayla beraber Makrofilla ve Kaba limon genotiplerinde CsCLCoy_1'in kuraklık stresi ile ilişkilendirilebileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca ilgili genotiplerin kök gruplarının gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında, Kaba limon genotipinin Makrofilla genotipine göre kuraklık stresine daha yüksek yanıt vermesinin, onun daha iyi bir anaç olarak kullanılabileceğini ihtimalini öne sürebilmektedir. Yaptığımız tez çalışması kapsamında Cs_CLCoy1 geni turunç anacında yaprak örneklerinde artış görmesi, Makrofilla anacında yapraklarda 2 kat ve Kaba limonda yaklaşık 1,2 kat artış göstermesi araştırmacıların bulguları ile uyumludur.

Asins ve ark.'nın (1999), *copia* benzeri elementlerin birçok mutasyonun etken maddesi olduğunu gösterilmişlerdir. Bununla birlikte, bitkilerde *copia* benzeri retrotranspozonların, normal koşullar altında düşük seviyelerde kopyalandığını ve sadece birkaç mutasyondan sorumlu olduklarını bildirmişlerdir. Doku kültürü, protoplast oluşumu, patojen enfeksiyonları ve bitki savunma tepkisini indüklediği bilinen abiyotik faktörler gibi transkripsiyon ekspresyonu yoluyla çeşitli stres koşullarının onları aktive ettiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonucunda PEG6000 ile 4 genotipe uygulanan kuraklık stresi bazı retrotranspozonların ifadelerini yüksek seviyelerde etkilemiştir. Bu da kuraklık stresine maruz bırakılan Tuzcu 31-31, Kleopatra mandarin, Makrofilla ve Kaba limon anaçlarında, kuraklığın bitki savunmasını etkileyen ve belirli mutasyonlara neden olabilecek bir faktör olduğunu göstermektedir.

Borreda ve ark. (2019), SIRE elementlerinin aktivitesindeki artışın, turunçgillerdeki türleşmenin başlangıcından önce en yüksek seviyede olduğunu, yani SIRE elementlerinin bolluğunun, analiz ettikleri tüm turunçgillerde aşamalı olarak azaldığını öne sürmüşlerdir. Bunun sonucunda, SIRE elementlerin *Citrus*'taki susturma süreçlerinde yer alan genomik mekanizmalara karşı koyamadıklarını düşünmüşlerdir. Bu doğrultuda çalışmamız sonucunda, SIRE genlerinin ekspresyonlarına bakarak hangi genotipin evrimsel süreçte daha sonra mutasyona uğradığına ve susturma sürecindeki genomik mekanizmalara karşı koyma seviyelerine dair bir ilişkilendirme yapılabilmektedir. SIRE elementlerinin ekspresyon seviyesindeki artışa bakarak; Kleopatra mandarininin gen ifadesinin en üst seviyede olduğu, ardından Makrofilla ve daha sonra Tuzcu 31-31 ve Kaba limonun seviyelerinin varlıkları gözlemlenebilmektedir.

Felice ve ark. (2008), deneylerinde, doku kültürü, yaralanma ve tuz stresi gibi stres koşulları altında *C. limon*'da Ty1-*copia* benzeri bir retrotranspozon dizisinin transkripsiyonel ekspresyonu için ilk kanıtını sağlamışlardır. Transpozon elementlerin normal gelişim sırasında susturulduğunu, ancak abiyotik ve biyotik stres tarafından aktive edildiğini öne sürmüşlerdir. Doku kültürü, yaralanma, patojen saldırısı, allopoliploidizasyon ve çevresel koşulların, transpozon ekspresyonuna neden olan genomik stresin göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmayla, kuraklık stresi uygulanan genotiplerde kullanılan 7 *LTR copia* benzeri retrotranspozonların stres koşulları altında ekspresyonunun artmasıyla Felice ve ark. (2008)'nın yaptığı çalışma kuraklık stresine bağlı olarak yapılan çalışmamızla da desteklenmektedir.

Yapılan birçok çalışma retrotranspozon çalışmalarının ıslah yöntemlerini geliştirme açısından önemli etkilere sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bunlardan birisi Butelli ve ark.'nın (2012) iki bağımsız *C. x sinensis* genotipi üzerinde yaptıkları retrotranspozon çalışmasının sonucunda, konvansiyonel turunçgil yetiştirme yöntemleriyle soğuğa dayanıklı yeni genotiplerin üretilmesi veya tanımlanması yerine *C. x sinensis* genetik ve moleküler özelliğinin temeline ilişkin genetik

mühendisliği yoluyla daha soğuk iklimlerde verimin daha yüksek olduğu *C. x sinensis* genotipleri üretme konusunda basit çözümler sunabileceğini söylemişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında, elde ettiğimiz sonuçlarla çalışmamızda kullandığımız dört genotipin de bu tür stratejilerle, turunçgil ıslah programlarında ve turunçgil üretiminin artmasında önemli ölçüde katkıda bulunabileceği düşünülebilmektedir.

Rico-Cabanas ve Martínez-Izquierdo'nun (2007) RT-PCR kullanarak, tohumdan elde ettikleri *C. sinensis* bitkilerinin yapraklarında herhangi CIRE1 gen ifadesi olmaksızın, kök dokularında CIRE1 gen ifadesinin varlığını gözlemlemişlerdir. Bu kök dokusuna özgü gen ekspresyon seviyesi farklılıklarının, *copia* retrotranspozonları için genel bir özellik gibi göründüğünü, çünkü köke özgü ifadenin aynı durumunun tütünde Tnt1 geni için de rapor edildiğini (Pouteau ve ark., 1991) sunmuşlar. Çalışmamızdaki dört genotipin uygulama kök ve yaprak dokularının bazı retrotranspozonlardaki ekspresyon ifadelerinin kendine özgü farklılıklarının, özellikle ekspresyon seviyelerinin yaprakta artmasının nedeninin *copia* retrotranspozonları için genel bir özellikten dolayı kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bernet ve ark. 2003'te bitkilerde, doku kültürü, ışınlama veya patojen enfeksiyonu gibi çevresel streslere yanıt olarak yer değiştirebilen elementlerin genomların yeniden yapılandırılmasında rol oynadığı vurgulamışlardır. Gen üzerinde düzenleme ve kodlama bölgelerine transpoze element ekleme ve silme, gen ekspresyon seviyelerini değiştirebileceğini söylemişlerdir. Ek olarak, transposable elementlerin hareketi, genleri bozarak veya rekombinasyonu veya kromozomal yeniden düzenlemeleri etkileyerek daha fazla allel çeşitliliğine neden olabilir. Bu sebeple gen ekspresyonlarındaki farklılıkların yalnızca spesifik bir faktörle ile ilişkilendirilemeyeceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız sonucu gözlemlenen farklı gen ekspresyon seviyelerinin varlığının kuraklık stresi sonucunun yanı sıra farklı bir stres etkenine bağlı olarak da gözlemlenebileceği düşünülebilir. Felice ve ark.'nın 2009'da yaptığı çalışmada da abiyotik stresin,

genetik olarak programlanmış tepkilere de yol açabildiğini, *Medicago sativa*'da soğuk stresinin neden olduğu bir retrotranspozonunda gen ekspresyonu gözlemlendiğini; ancak bu gen ekspresyonun soğuk stresi ile ilişkili olmadığını mikroklimatik kaymalardan kaynaklandığını söylemişlerdir. Böylelikle, retrotranspozonların gen ekspresyon seviyelerine bakarak çeşitlerin tamamen kuraklığa dayanıklı olup olmadığını konusunda bir ilişkilendirme de yapılamayabilir. LTR retrotranspozonlarının başka stres koşullarından da etkilediği gözlemlenebilmektedir (Bernet ve ark. 2003). Kullanılan genotiplerimizin bazılarındaki gen ekspresyon düzeyin bakımından kök ve yaprak arasındaki ilişkide, kök gruplarının gen ekspresyon seviyelerinde değişme görülmemesine karşın yaprak gruplarındaki gen ekspresyon seviyelerindeki artış ve azalışların görülmemesinin fizyolojik başka reaksiyonların da sebep olabileceği belirtmişlerdir (Tan ve ark. 2015). Çalışmamızda özellikle yapraklardaki gen ekspresyonu seviyelerindeki artışın farklı fizyolojik reaksiyonlardan da kaynaklanabileceği tahmin edilebilmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Transposable elementler bitkilerde bulunur ve bazı türlerde toplam DNA'nın yaklaşık %50'sini temsil ederler. Transpozonlar, bitki biyolojisinin önemli bir hayatta kalma stratejisi veya stres kaynaklı genomik çeşitlilik oluşturucular olarak değerlendirilebilirler. Bitki genomları, poliploidizasyon, transpozisyon ve çoğaltma dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla genişler. Sonuç olarak, transpozisyon, bitki genomunun genişlemesinin önemli bir nedenidir. Retrotranspozonların içeriği, değişkenliği ve fiziksel dağılımı ile ilgili olarak farklı bitki taksonlarının ayrıntılı karakterizasyonu genom organizasyonu ve evriminin anlaşılmasına büyük katkı sağlamaktadır.

Dünyada yaygın üretime sahip meyve türlerini içeren Citrus cinsi oldukça polimorfiktir. Citrus cinsinde tekrarlayan ve dağılmış bazı DNA dizileri izole edilmiş ve bunların genomik organizayonu araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Araştırmalar doku kültürü, yaralanma ve tuz ve kuraklık stresi gibi stres ve ekstrem iklim koşulları altında transkripsiyonel aktivasyonun varlığını bildirmişler ve transpozonların kromozom yapılarında, sentromerlerde ve telomerlerde yer aldıklarını belirtimişlerdir (Felice ve ark., 2009).

Transpoze edilebilir elementler normal gelişim sürecinde susturulur ancak abiyotik ve biyotik stres tarafından aktive edilirler. Doku kültürü, yaralanma, patojen saldırısı, yetersiz sıcaklık ve/veya su ve besin mevcudiyeti gibi olumsuz çevresel koşullar, transpozon aktivasyonuna neden olan genomik stresin göstergeleridir. Stres altındaki tütün, arpa ve pirinç gibi çeşitli bitkilerde bitki retroelementlerinin transkriptleri farklı araştırmacılar tarafından ortaya koyulmuştur. Özellikle moleküler anlamda transpozonların, son zamanlarda abiyotik-biyotik stres altında nasıl bir fonksiyona sahip olduklarını konu alan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu dinamik sürecin birçok nedeni olmasının yanında en önemli nedeni bu genetik elementlerin dış kaynaklı ve hareketli olmasının yanında bazen de konukçu genomunda uygun yerde sabitlenmesidir. Dış kaynak olarak

bunlar çoğunlukla bakteriyel ve virütik kökene sahiptirler. Dolayısı ile ilgili konukçu genomunda hibrit ya da rekombinant bir yapı oluşturmaları münasebeti ile oldukça çok sayıda bilim insanının ilgisini çekmiştir (Çiçek, 2019).

Bu tez çalışmasında 24 saat PEG6000 kuraklık stresi uygulanmış Tuzcu 31-31, Kleopatra mandarin, Makrofilla ve Kaba limon turunçgil anaçlarında bazı transpozon genlerinin ifade seviyeleri eş-zamanlı PCR ile ölçülmüştür. Çalışma sonucunda kuraklık stresine maruz bırakılan Tuzcu 31-31, Kleopatra mandarin, Makrofilla ve Kaba limon turunçgil genotiplerinin fizyolojik olarak olumsuz etkilendiği gözlemlenmemiştir. Ancak çalışmamızda kuraklık stresine maruz bırakılan turunçgil örneklerinde; Cs_Pol-1, CsCLCoy_1, CsCc1-8, Retro_Cc1_32, Sire_Cc1, Sire_Cc1_74 ve Sire_Cc1_83 retrotranspozonların gen düzeyinde ifade seviyeleri ölçülmüş, her transpozonun gen ifade seviyesi turunçgil çeşidine ve çeşit içerisinde de uygulama ve kontrol gruplarına göre hem de kök ve yaprak gruplarında farklı sonuçlar ortaya çıktığı görülmüştür.

Birçok bitkide abiyotik stres ile ilişkili bazı retrotranspozonlara ait gen ekspresyon çalışmaları mevcut olmasına karşın turunçgillerde kuraklık stresi ile ilgili retrotranspozon düzeyinde gen ekspresyon çalışmaları sınırlı sayıda kalmıştır. Bununla birlikte her bitkinin farklı stresler altında vereceği genetik aktivasyonların farklı olacağı ön görülmektedir. Bu gen ekspresyon seviyelerinin daha iyi anlaşılması için araştırmaların daha da yaygınlaştırılması ve başka stresler üzerindeki rollerinin de araştırılmaları gerekmektedir. Dolayısıyla bu çalışma ile farklı turunçgil çeşitlerinin kuraklık stresine karşı gösterdiği moleküler tepkiler sunulmuştur. Bu durumda, ekonomik değere sahip ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan turunçgillerin, özellikle ülkemizde ve dünyada önemli bir abiyotik stres olan kuraklığa karşı, moleküler düzeyde nasıl bir reaksiyon verdiği hususunda literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır.

Retrotranspozonların, yapısal evrimin önemli ve çeşitli bir bileşeni olduğu düşünüldüğünde; özellikle bu retrotranspozonların kuraklık mekanizmasında görevlerinin daha da iyi anlamlandırılması için daha başka bitki türlerindeki gen

aktivitelerinin araştırılması, farklı retrotranspozonların ekspresyon seviyelerinin çalışılması, kuraklık stresine tepki veren retrotranspozonların diğer türlere aktarılması ve bulguların analiz edilmesi gibi yaklaşımlar ile daha da somut sonuçların ortaya çıkması sağlanabilecektir.

Tez çalışmasında kullanılan turunçgil genotiplerinin uygulama gruplarının sayısının arttırılması, gen ekspresyon seviyesiyle ilgili verilerin daha detaylı ayrımı konusunda bizlere daha sağlıklı sonuçlara ulaşmaya olanak sağlayabilir. Bununla beraber farklı primerler kullanarak ve farklı morfolojik, fizyolojik parametrelere bakılarak edilen bulgular birlikte değerlendirilebilir. Bu sayede turunçgillerde kuraklık stresi ile ilgili genetik çalışmalar daha da genişletilebilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ileriki çalışmalar için bir kaynak olacak, yeni projeler ve tezler için bir altyapı kazandıracak ve literatür bilgilerine önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Açar, E. (2016) Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'da kuraklık stresi dayanıklılığı ile ilişkili dna markörlerin belirlenmesi / Determination of dna based molecular markers associated with drought tolerans in wheat (*Triticum aestivum* L.) Çankırı Karatekin Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Ana Bilim Dalı 110 s. Tez no: 430099.

Amar, M. H., Abd, M., & Salam, E. (2013). Retro transposon-markers: an overview of the recent progress in Citrus germplasm. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 3(10), 31–41. http://www.innspub.net/wp-content/uploads/2013/10/JBES-Vol3No10-p31-41.pdf

Asíns, M. J., Monforte, A. J., Mestre, P. F., & Carbonell, E. A. (1999). Citrus and Prunus copia-like retrotransposons. Theoretical and Applied Genetics, 99(3–4), 503–510. https://doi.org/10.1007/s001220051263

BATEM https://arastirma.tarimorman.gov.tr/batem

Bernet, G. P., & Asíns, M. J. (2003). Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus. Theoretical and Applied Genetics, 108(1), 121–130. https://doi.org/10.1007/s00122-003-1382-1

Biswas, M. K., Baig, M. N. R., Cheng, Y. J., & Deng, X. X. (2010). Retrotransposon based genetic similarity within the genus citrus and its relatives. Genetic Resources and Crop Evolution, 57(7), 963–972. https://doi.org/10.1007/s10722-010-9533-0

Borreda, Estela Perez-Roman, Victoria Ibanez, Javier Terol, and Manuel Talon* (2019) Reprogramming of Retrotransposon Activity during Speciation of the Genus Citrus *Genome Biol. Evol.* 11(12):3478–3495. doi:10.1093/gbe/evz246

Butelli, E., Garcia-Lor, A., Licciardello, C., Casas, G. Las, Hill, L., Recupero, G. R., Keremane, M. L., Ramadugu, C., Krueger, R., Xu, Q., Deng, X., Fanciullino, A. L., Froelicher, Y., Navarro, L., & Martin, C. (2017). Changes in anthocyanin production during domestication of Citrus. Plant Physiology, 173(4), 2225–2242. https://doi.org/10.1104/pp.16.01701

Butelli, E., Licciardello, C., Ramadugu, C., Durand-Hulak, M., Celant, A., Reforgiato Recupero, G., Froelicher, Y., & Martin, C. (2019). Noemi Controls Production of Flavonoid Pigments and Fruit Acidity and Illustrates the Domestication Routes of Modern Citrus Varieties. Current Biology, 29(1), 158-164.e2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.040

Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., & Martin, C. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. Plant Cell, 24(3), 1242–1255. https://doi.org/10.1105/tpc.111.095232

Cengiz, M. (2018). Bazı Turunçgil Genotiplerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltımı ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi, 92 s. Çukurova Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Tez numarası 518292.

Çiçek, S. (2019). Kavun (*Cucumis melo* L.) bitkisinde kuraklık ile ilişkili bazı hareketli genetik elementlerin (transpozon) ve fizyobiyokimyasal parametrelerin incelenmesi Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

De Felice, B. (2008) A transcriptionally active copia-like retroelement in *Citrus limon* http://www.cmbl.org.pl DOI: 10.2478/s11658-008-0050-5.

De Felice, B. (2009). Transposable Sequences in Citrus Genome: Role of Mobile Elements in the Adaptation to Stressful Environments. Tree and Forestry Science and Biotechnology, 3(Special Issue 1), 79–86.

Dönmez, D. (2007). Bazı Turunçgil Anaçlarına *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla RolABCD Genlerinin Aktarılması. Çukurova Üniversitesi.

Du, D., Du, X., Mattia, M. R., Wang, Y., Yu, Q., Huang, M., Yu, Y., Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (2018). LTR retrotransposons from the *Citrus x clementina* genome: characterization and application. Tree Genetics and Genomes, 14(4). https://doi.org/10.1007/s11295-018-1257-x.

FAO. 2016, Food and Agricultural Organization of the United Nations, http://faostat.fao.org.

Havecker, E. R., Gao, X. and Voytas, D. F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. Genome biology, 5, 225.

Huang, D., Wang, X., Tang, Z., Yuan, Y., Xu, Y., He, J., Jiang, X., Peng, S. A., Li, L., Butelli, E., Deng, X., & Xu, Q. (2018). Subfunctionalization of the Ruby2–Ruby1 gene cluster during the domestication of citrus. Nature Plants, 4(11), 930–941. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0287-6.

Kalefetoğlu, T., ve Ekmekçi Y., 2005. Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri ve dayanıklılık mekanizmaları, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 18(4): 723-740.

Kalendar, R., Flavell, A. J., Ellis, T. H. N., Sjakste, T., Moisy, C., & Schulman, A. H. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity, 106(4), 520–530. https://doi.org/10.1038/hdy.2010.93.

Liou, P. C., Gmitter, F. G., & Moore, G. A. (1996). Characterization of the Citrus genome through analysis of restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 92(3–4), 425–435. https://doi.org/10.1007/BF00223689.

Liu, Q., Zhu, A., Chai, L., Zhou, W., Yu, K., Ding, J., Xu, J., & Deng, X. (2009). Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. Journal of Experimental Botany, 60(3), 801–813. https://doi.org/10.1093/jxb/ern329.

Makarevitch, I., Waters, A.J., West, P.T., Stitzer, M., Hirsch, C.N., Ibarra, J.R., Springer, N.M., 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. Plos Genetics, 11 (1), 1-12. Kuşvuran, Ş. an Abak, K.,

Meng, H., Feng, J., Bai, T., Jian, Z., Chen, Y., & Wu, G. (2020). Genome-wide analysis of short interspersed nuclear elements provides insight into gene and genome evolution in citrus. DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes, 27(1), 1–13. https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa004.

Mohamed Abd S. El zayat†, Ahmed H. Hassan, Elsayed Nishawy†, Mohammed Ali and Mohamed Hamdy Amar* (2021). Patterns of genetic structure and evidence of Egyptian Citrus rootstock based on informative SSR, LTR-IRAP and LTR-REMAP molecular markers. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19:29 https://doi.org/10.1186/s43141-021-00128-z.

Nybo, Kristie (2011). BioTechniques 50:291-292 (May 2011) doi 10.2144/000113665

Okutucu, B., & Pehl, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 12(2), 138–148. https://doi.org/10.17827/aktd.79961

Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M (1991) Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. EMBO J 10:1911–1918

Rico-Cabanas, L., & Martínez-Izquierdo, J. A. (2007). CIRE1, a novel transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon from Citrus sinensis. Molecular Genetics and Genomics, 277(4), 365–377. https://doi.org/10.1007/s00438-006-0200-2

Ruiz, C., & Asins, M. J. (2003). Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. Theoretical and Applied Genetics, 106(5), 826–836. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1095-x

Sabot, F. and Schulman, A. 2006. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. heredity, 97, 381.

Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Rice, D., Rafii, M. Y., Azizi, P., Osman, M., Taheri, S., Bakar, M. F. A., Isa, M. N. M., & Noor, Y. M. (2018). Contribution of transposable elements in the plant's genome. Gene, 665(December 2017), 155–166. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.050

Şimşek, Ö. Dönmez, D., Aka Kaçar, Y. (2018) Bazı Turunçgil Anaçlarının In vitro Kuraklık Stresi Koşullarında Performanslarının Araştırılması. YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI) 2018, 28(3): 305-310.

Şimşek, Ö. (2018) EFFECT OF DROUGHT STRESS IN IN VITRO AND DROUGHT-RELATED GENE EXPRESSION IN CARRIZO CITRANGE December 2018 Fresenius Environmental Bulletin 27(12A):9167-9171

Tan, ve ark. (2015). Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock suggests its potential value for stress resistance improvement. BMC Plant Biology, 15(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0450-4

Tao, ve ark. (2006). Copia-like retrotransposons in a precocious mutant of trifoliate orange. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(6), 1038–1042. https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512168

Tarım ve Orman Bakanlığı 2019, https://www.tarimorman.gov.tr/

University of California Riverside Givaudan Citrus Variety Collection (2021). https://citrusvariety.ucr.edu/

USDA 2017, U.S. Departmant of Agriculture, Agricultural Research Service https://fdc.nal.usda.gov/

Uzun, A., ve ark. (2011). Evaluation of Genetic Diversity in Lemons and Some of Their Relatives Based on SRAP and SSR Markers. Plant Molecular Biology Reporter, 29(3), 693–701. https://doi.org/10.1007/s11105-010-0277-y

TÜİK 2016 http://www.tuik.gov.tr/

Voronova, A., Belevich, V., Jansons, A., Rungis, A., 2014. Stress-induced transcriptional activation of retrotransposon-like sequences in the Scots pine *(Pinus sylvestris* L.) genome. Tree Genetics & Genomes, 10: 937–951.

Voytas, D. F. ve Boeke, J. D. 2002. Mobile DNA II. American Society of Microbiology, 631-662.

Yeşiloğlu, T. (2013). Turunçgil Sektörünün Gereksinim Duyduğu Yeni Çeşitlerin Geliştirilmesi Improving New Varieties for Citrus Sectoral Needs. 6(2), 127–132.

Zheng, X., Zhu, K., Sun, Q., Zhang, W., Wang, X., Cao, H., Tan, M., Xie, Z., Zeng, Y., Ye, J., Chai, L., Xu, Q., Pan, Z., Xiao, S., Fraser, P. D., & Deng, X. (2019). Natural Variation in CCD4 Promoter Underpins Species-Specific Evolution of Red Coloration in Citrus Peel. Molecular Plant, 12(9), 1294–1307. https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.014

ÖZGEÇMİŞ

Muhammet Mustafa SEZER, ilk ve orta öğrenimini Adana'da, lise öğrenimini ise Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Niğde Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi'nin Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yapmaktadır.