

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**TURUNÇGİLLERDE DNA, RNA VE PROTEİN PROFİLLERİNİN
ANALİZLERİ İLE ÇEKİRDEKSİZLİK İLE İLGİLİ MARKIR
GELİŞTİRİLMESİ**

Proje No: FDA-2013-4785

Proje Türü: DIP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Doç. Dr. Aydın UZUN
ERÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

Araştırmacılar

Prof. Dr. Osman GÜLŞEN (ERÜ Zir Fak. Bahçe Bit. Böl.)
Yrd. Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN (ERÜ Zir Fak. Tar. Biyotek. Böl.)
Doç. Dr. Servet ÖZCAN (ERÜ Fen Fak. Biyoloji Böl.)
Doç. Dr. Semih YILMAZ (ERÜ Zir Fak. Tar. Biyotek. Böl.)
Doç. Dr. Kadir Uğurtan YILMAZ (ERÜ Zir Fak. Bahçe Bit. Böl.)

Nisan 2016

KAYSERİ

RAPOR

Bu proje, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, Dış Destekli Projeler İçin İhtiyaç Projesi kapsamında (FDA-2013-4785) desteklenmiştir. Proje bütçesi 19497,22 TL olup bunun büyük bir kısmı proje çalışmaları için gerekli olan sarf malzemeleri için, geri kalanı ise seyahat harcamaları için kullanılmıştır.

Projede son dönemde ülkemizdeki çalışmalarla geliştirilmiş olan üç adet yeni çekirdeksiz limon çeşidi ile bu çeşitlerin orijini olan çekirdekli Kütüden limonu arasında DNA, RNA ve protein profillerinin karşılaştırılması ile çekirdeksizliği belirleyen markır/markırların geliştirilme imkanları araştırılmıştır. DNA çalışmalarında bu konuda önemli farklılık bulunmamıştır. Bu konuda literatürde benzer sonuçların alındığı çok sayıda çalışma mevcuttur. RNA çalışmaları ile limon çeşitlerindeki gen sayıları ve bunların karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bunun yanında RNA sekans sonuçlarından elde edilen sonuçlardan yararlanılarak turuncğiller için yeni SSR primerleri geliştirilmiş ve bazı turuncğil çeşitlerinde test edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Ayrıca protein analizleri için ekstraksiyon işlemi fenol ekstraksiyon metodu ile yapılmış olup, çeşitler arasında spot farklılıkların gözlenmesi 2D jel elektroforezi ile yapılmıştır. Farklı bulunan spotlar alınarak LC-MS/MS cihazında ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) programı kullanılarak yapılmıştır. Peptitler limon türüne ait veritabanı bulunmamaması nedeniyle portakal veritabanı ile kıyaslanmıştır. Buna rağmen, limon portakal ile yakın akraba olduğundan, elde edilen sonuçlarda bulunan “TTIIGVTYNGGVVLGADSR”, “SGSAADSQTVSDYVR”, “TVTINSEGVSR” peptitlerinin çekirdeksiz limon çeşitlerinin, çekirdekli Kütüden çeşidinden ayırt edilmesinde etkili bir şekilde kullanılabilecek bir markır olduğu görülmüştür. Ayrıca bu sonuçlar sonraki benzer çalışmalarda kullanılabilecek potansiyeline sahiptir.

TEŞEKKÜR

Bu projeyi destekleyerek çalışmanın yapılabilmesini ve bu konuda yeni verilerin ortaya konulmasını sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine çok teşekkür ederiz. Çalışmanın başarılı bir şekilde devam etmesi ve sonuçlanmasına katkı sağlayan proje personeline teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZET.....	6
ABSTRACT.....	7
GİRİŞ.....	8
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
KAYNAKLAR	70
EK-1	75
EK-2	84
EK-3	88

ÖZET

Özellikle son yıllarda çekirdekli turuncğil çeşitleri, tüketici tarafından talep görmemekte, çekirdeksiz çeşitler daha fazla istenmektedir. Bu pazar talebi doğrultusunda, yapılan çalışmalarla ülkemizde üç adet yeni çekirdeksiz limon çeşidi (Alata, Gülşen ve Uzun) geliştirilmiş ve tescil ettirilmiştir. Çekirdeksiz çeşit ıslahı, uzun yıllar ve emek gerektiren zorlu bir süreçtir. Islah süresinin kısaltılması amacıyla yeni ve etkili yöntemlere ihtiyaç vardır. Yeni geliştirilen bu çekirdeksiz çeşitlerin patent haklarının korunması da ülkemiz adına son derece kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle bu projede; DNA, RNA ve protein analizleri ile çekirdeksizlikle ilgili mekanizmanın anlaşılması, bu özelliğe ilişkin markır geliştirilmesi ve patent haklarının korunmasına yönelik araçların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, çalışılan çok sayıda farklı markır sistemlerine ait primerlerle DNA düzeyinde farklılık belirlenememiştir. RNA sekanslama çalışmaları için öncelikle RNA izolasyonları yapılmış ve ardından sekanslama işlemi yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda limon çeşitlerinin gen profilleri (sayıları ve genlerin görev alanları vb) ortaya konulmuştur. Ayrıca RNA çalışmaları ile turuncğillerde kullanılacak yeni SSR primerleri geliştirilmiştir. Ayrıca protein analizleri için ekstraksiyon işlemi fenol extarksiyon metodu ile yapılmış olup, çeşitler arasında spot farklılıkların gözlenmesi 2D jel elektroforezi ile yapılmıştır. Farklı bulunan spotlar alınarak LC-MS/MS cihazında ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) programı kullanılarak yapılmıştır. Peptitler limon türüne ait veritabanı bulunmamamsı nedeniyle portakal veritabanı ile kıyaslanmıştır. Buna rağmen, limon portakal ile yakın akraba olduğundan, elde edilen sonuçlarda bulunan “TTIIGVTYNGGVVLGADSR”, “SGSAADSQTVSDYVR”, “TVTINSEGVSR” peptitlerinin çekirdeksiz limon çeşitlerinin, çekirdekli Küt diken çeşidinden ayırt edilmesinde etkili bir şekilde kullanılabilecek bir marker olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar sonraki benzer çalışmalarda kullanılabileme potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: *Citrus limon*, çekirdeksizlik, proteomik analiz, turuncğiller

Development of Markers Related to Seedlessness in Citrus Through Analysis of DNA, RNA and Protein Profiles

ABSTRACT

Especially in recent years, consumers demand seedless *Citrus* varieties instead of seedy varieties. In accordance with demands of this market, three new varieties of seedless lemons (Alata, Gülşen and Uzun) has been developed and registered in our country. Breeding process of developing seedless variety is a difficult process requiring many years and labor. New and effective methods need to be developed for shortening the breeding periods. Protection of patent rights for newly developed seedless varieties also has an extremely critical importance for our country. Therefore in this project; it is intended to understand the mechanisms related with seedlessness by analyzing DNA, RNA and proteins, and to develop markers relevant to these features and also improve ways for protecting the patent rights. In the current study, although many primers for a number of marker systems were used, no difference was observed at DNA level. For RNA sequencing studies RNA's were isolated with great care and sequencing processes were subsequently performed. This study revealed the gene profiles (numbers, their fields of duty, etc) of lemon varieties. In this scope, new SSR primers to be used in citrus fruits were developed. Also for protein analysis, purification processes were performed through phenol extraction method and different spots among varieties were visualized by 2DGE method. Peptides of varying spots were analyzed by LC-MS/MS using the ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) software. The peptides were compared with that of *Citrus sinensis* due to lack of database for *Citrus lemon*. For all that, because lemon is close relative to orange, the results suggest that differing "TTIIGVTYNGGVVLGADSR", "SGSAADSQTVSDYVR", "TVTINSEGVSR" peptides can efficiently be used as markers for differentiating the seedless varieties from their seedy varieties. These findings also have the potential to be used in related future studies.

Keywords: *Citrus lemon*, seedlessness, proteomic analysis, *Citrus*

GİRİŞ

Turunçgiller dünyada en fazla üretilen meyve grubudur. 2000 yılında 105 milyon ton olan dünya üretimi 2013 yılı itibari ile 135 milyon tonu aşmış durumdadır. Türkiye turunçgil üretiminde de bu süreç içerisinde önemli artış olmuştur. 2000 yılındaki 2.2 milyon ton olan üretim 13 yıllık süreçte % 50’den fazla artış göstererek 2013 yılında 3.6 milyon tonu aşmıştır. Turunçgil meyveleri içerisinde limon üretim miktarı , portakal ve mandarin üretimi ardından sıralanmaktadır. Dünya limon üretimi yaklaşık 15 milyon ton, Türkiye üretimi ise yaklaşık 730 bin ton civarındadır. Türkiye’de üretilen limonun yarısından fazlası (yaklaşık 410 bin ton) ihraç edilmekte olup, turunçgiller Türkiye ihracatı için önemli bir lokomotif ürün grubu durumundadır (FAO, 2013)

Turunçgil ıslah çalışmalarında son yıllarda üzerinde önemle durulan konulardan biri çekirdeksiz çeşit ıslahıdır. Çekirdeksiz çeşit ıslahı turunçgillerin yanında birçok meyve türünde üzerinde durulan ve başarılı sonuçların elde edildiği bir konudur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, üzüm, litchi, yenidünya, mango türlerinde ekonomik öneme sahip çekirdeksiz çeşitler ıslah edilmiştir (Ye ve ark., 2009). Çekirdekli turunçgil meyveleri diğer özellikleri bakımından kaliteli dahi olsalar tüketiciler tarafından kolaylıkla tercih edilmemektedir. Çekirdeksizlik, pazarlama avantajı sağlayan çok önemli meyve kalite kriterlerinden biridir (Raza ve ark., 2003). Günümüzde dünyada sofralık olarak tüketilen turunçgil tür ve çeşitleri çoğunlukla çekirdeksizdir. Dünyada pazarda mevcut portakallardan sofralık olarak en fazla talep edilen grup olan göbekli portakallar, mandarinlerden Satsuma grubu, altıntopların neredeyse tamamı çekirdeksizdir. Bunun yanında tüm turunçgil türlerinde mevcut çeşitlerin yanında pazar talepleri doğrultusunda yeni çekirdeksiz çeşit eldesi çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir (Somsri ve ark., 2009; Sutarto ve ark., 2009).

Bu çalışmanın birinci amacı, ülkemizde mutasyon ıslahı çalışmaları ile elde edilen üç adet yeni çekirdeksiz limon çeşidi ve bu çeşitlerin elde edilmesinde kullanılan çekirdekli olan ‘Kütdiken’ limonu kullanılarak, çekirdeksizlikle ilgili DNA, RNA ve proteom düzeyinde farklılıklar tespit edilerek çekirdeksizliğin mekanizması belirlenmesidir. Sunduğumuz projenin ikinci amacı ise yeni geliştirilen bu çeşitlerin yakın zamanda dünyada ticareti önemli olabileceğinden patent ve ıslahçı haklarının korunmasına yönelik araçların geliştirilmesidir.

Aynı zamanda elde edilen çıktılar çekirdeksizlikle ilgili genin belirlenmesi, klonlanması ve transformasyon işlemleri için çok önemli bir başlangıç noktası olacaktır. Ayrıca bu özellikle yakın ilişkili moleküler markırların oluşturulması da mümkün olabilecektir. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, çalışılan çok sayıda farklı markır sistemlerine ait primerlerle DNA düzeyinde farklılık belirlenememiştir. RNA sekanslama çalışmaları için öncelikle RNA izolasyonları yapılmış ve ardından sekanslama işlemi yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda limon çeşitlerinin gen profilleri (sayıları ve genlerin görev alanları vb) ortaya konulmuştur. Protein çalışmalarında ise protein izolasyonu ardından elektroforez ve jel işlemleri yapılarak limon çeşitlerinin protein spotları belirlenmiştir. Çeşitleri arasındaki spot farklılıkları saptanmıştır. Ardından peptit analizleri yapılmış ve limon türüne ait tam sekans bilgisi dünyada bulunmadığından portakal sekansı ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Elde edilen konu ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecek ve yeni katkılar sunabilecek niteliktedir.

GENEL BİLGİLER

Turunçgil ıslahında meyve özellikleri ile ilgili çalışmalar 15- 25 yıl gibi çok uzun zaman almakta ve yoğun bir emek ve para gerektirmektedir. Bu uzun zamana rağmen her zaman başarılı sonuçların alınması da mümkün olmamaktadır. Son dönemde biyoteknolojik yöntemlerin turunçgil ıslahında kullanılmaya başlamasıyla ıslahta etkinlik artmış ve ıslah süresi kısaltmaya başlamıştır. Bu yöntemler aynı zamanda klasik yöntemlerle elde edilemeyen sonuçların elde edilmesini de beraberinde getirmiştir. Genetik transformasyon çalışmaları (Li ve ark., 2002; Anathakrishna ve ark., 2007), somatik melezlemeler (Guo ve ark., 2000; Hu-Wu ve ark., 2005; Jo Ann ve ark., 2008), genetik haritalamalar (Roose, 2000; Oliviera ve ark., 2004; Chen ve ark., 2008; Gülşen ve ark., 2010) yoğun olarak turunçgil ıslahında kullanılmaktadır. Ancak çekirdeksizliği açıklayan veya haritalayan çalışmalar mevcut değildir. Bu çalışmalarda istenen özelliklerle kontrol eden genleri ifade eden markırların ortaya konulması, genlerin yerlerinin tespiti, klonlanması ve diğer çeşitlere bunların aktarılması işlemleri yapılmıştır. Meyve özellikleri ile ilgili genlerin belirlenmesi ve bunlara ilişkin moleküler markırların oluşturulması çeşit ıslahında çok önemli kolaylıklar sağlamaktadır. Bir meyve özelliği ile yakın ilişkili bir moleküler markırın geliştirilmesi, o özellikle ilgili ıslah çalışmalarında, daha küçük fide döneminde dahi amaca uygun bitkilerin seçilmesini sağlamaktadır. Moleküler markır yardımıyla seleksiyon (marker assisted selection-MAS) olarak adlandırılan ve çevresel etmenlere bağlı olmayan bu yöntem ıslah programlarını çok daha etkili kılmakta ve zaman, para ve emek tasarrufu sağlamaktadır (Han ve ark., 1997; Jinping ve ark., 2009). Öte yandan proteom çalışmalarında transkriptomik analizler gen ekspresyonu ile ilgili çok net bilgiler vermesi bakımından çok etkili bir yöntemdir. Proteomiks bitki ıslahında güçlü bir metot haline gelmiştir ve protein sekansı bitkilerde çok korunmuş bir yapı göstermektedir (Muccilli ve ark., 2009). Proteom analizleri diğer çalışmalarla belirlenemeyen farklılıkların genlerin bir ürünü olan protein düzeyinde belirleyebilmesi bakımından güçlü bir yöntemdir.

GEREÇ VE YÖNTEM

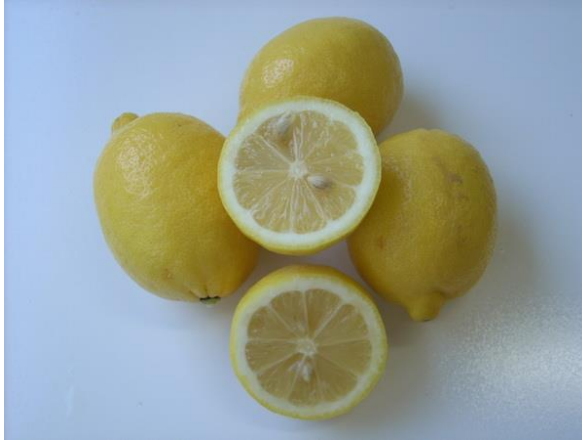
Çalışmada materyal olarak Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsünde mutasyon ıslahı ile ‘Kùtdiken’ limonundan elde edilen (Uzun ve ark., 2008) ve aşıağıda kısaca bazı özellikleri verilen ‘Alata’, ‘Gùlşen’ ve ‘Uzun’ isimli üç adet çekirdeksiz limon çeşidinin yanında, bu çeşitlerin ıslah edildiğı çekirdekli bir çeşit olan ‘Kùtdiken’ limonu kontrol çeşidi olarak kullanılacaktır. Çalışmada kullanılacak olan tüm limon ağaçları 9 yaşında ve sağlıklı durumdadır. Morfolojik özellikler bakımından aynı bitkiden mutasyonla geliştirildiğı için büyük oranda Kùtdiken çeşidiyle benzerlik taşımaktadır. Bu üç çeşidin özellikleri Uzun ve ark. (2008) tarafından tanımlanmış olup aşıağıda da özetlenmiştir.

Alata: Ağaç ve meyve özellikleri bakımından ‘Kùtdiken’ limonuna benzemekle birlikte, meyveleri ‘Kùtdiken’ limonundan biraz daha küçük, tamamen çekirdeksiz bir çeşittir.

Gùlşen: Ağaç ve meyve özellikleri ‘Kùtdiken’ limonu ile aynı olup tamamen çekirdeksizdir.

Uzun: Ağaç ve meyve özellikleri ‘Kùtdiken’ limonuna benzer olup kabuk kalınlığının biraz daha fazla olması ile ‘Kùtdiken’ limonundan ayrılmaktadır. Tamamen çekirdeksiz bir çeşittir.

Kùtdiken: Verim ve meyve kalitesi bakımında dünyanın en önemli limonlarından biridir. Meyve ağırlığı 125 g civarında, kabuk kalınlığı 5.76 mm ve ortalama çekirdek sayısı 10.65 adettir. Dokuz ay kadar depolanabilmesi ve ihracata uygun bir çeşit olması ile ùlkemiz limon yetiştirticiliğı için en önemli çeşittir. En önemli problemi uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) hastalına duyarlı olmasıdır (Tuzcu, 1990). Materyal olarak kullanılan limon çeşitlerine ait resimler Şekil 1’de verilmiştir.

**A****B****C****D**

Şekil 1. Çalışmada materyal olarak kullanılan limon çeşitleri (A= Kütdiken, B= Alata, C= Gülşen, D= Uzun)

Yöntem

DNA Çalışmaları

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için materyal bitkilerin sürgün uçları kullanılmıştır. Her bir materyalden iki kez DNA izole edilmiş ve bu iki DNA örneği çalışmalarda kullanılmıştır. Kontrolle beraber dört adet materyal olduğundan toplam sekiz örnek çalışmalarda yer almıştır. DNA izolasyonu çalışmalarında Doyle ve Doyle (1990) yönteminden modifiye edilen ve aşağıda açıklanan CTAB protokolü kullanılmıştır (Gülşen ve ark., 2009).

Kullanılan kimyasallar: Trizma 1M 30 g/250 ml su (pH 8.0 ayarlanmış, otoklavlanmış), EDTA 0.5 M, 37.2 g/100 ml su (pH 8.0 ayarlanmış, otoklavlanmış), 1000 ml ekstraksiyon çözeltisi için: 20 g CTAB : %2 (W/v) CTAB, 100 ml 1M Tris: 100 mM Tris-HCl Ph 8.0, 81.6

g NaCl: 1.4 M NaCl, 40 ml 0.5 M EDTA: 20 mM Na EDTA (pH 8.0) 1000 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır. Mechapto ethanol ekstraksiyon çözeltisi kullanmadan hemen önce %0.2 oranında ilave edilerek karıştırılmıştır. Ayrıca 10 M Amonyum acetate (pH 7.7) şu şekilde hazırlanmıştır: 10 M çözelti için 100 ml iki kere distile edilmiş ve otoklavlanmış suya 77 g ammonium acetate eklenecek ve çözelti 0.22 um filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

DNA İzolasyon Protokolü:

1. 62°C de su banyosunu önceden hazırlanır.
2. 30 mg genç bitki dokusunu roller presin arasında öğütülür ve 1.2 ml ekstraksiyon bufferi roller presin üst tarafına verilirken sol elle tüpün içine presten damlayan çözelti toplanır.
3. 62°C'de 30-60 dakika boyunca inkubasyon yapılır, ara sıra ters düz edilir.
4. Üzerine 800 ul cloroform: octanol (24:1 oranında) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters düz yaparak karıştırılır.
5. 14000 rpm'de 5 dak santrifüj edilir.
6. Sulu kısmı pipetle çekerek temiz 1.5 ml lik bir tübe aktarılır
7. Üzerine toplam hacmin 2/3 ü kadar (550 ul) soğuk isopropanol ilave edilir (beyaz çökelek halinde DNA+diğer organik bileşikler gözle görülebilir). 30 dk veya daha fazla -20°Cde bekletilir.
8. 14000'de 2 dak santrifüj edilir ve sıvı kısmı uzaklaştırılır.
9. Kalan beyaz çökeltinin üzerine 500 ul yıkama çözeltisi (%76 EtOH, 10 mM amonyum asetat) ilave edilir ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
10. 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılır ve sıvı kısmı uzaklaştırılır.
11. Beyaz çökelti üzerine 300 ul TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilir.
12. Çökelti tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında gece boyunca veya 65°C'de 60 dk bekletilir.
13. 10 ug/ml son konsantrasyon olacak şekilde RNase ilave edilir ve 37°C'de 30 dk inkube edilir.
14. 200 ul TE ve 15 ul amonyum asetat (10 M, pH 7.7) ilave edilir. Son olarak çözelti üzerine 2 hacim kadar soğuk etanol ilave ettikten sonra 20 dak veya gece boyunca -20°C'de bekletilir.
15. 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılır ve sulu kısım dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra beyaz DNA çökeleği iyice kurutulur.
16. Uygun miktarda TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilir (100-200ul).
17. DNA konsantrasyonu spektrofotometre ve agaroz jel ile ölçülerek PCR çalışmalarında kullanılmak üzere 10 ng/ul olacak şekilde ayarlanır.

DNA Markırları Çalışmaları

Çalışmada DNA markırları olarak, dominant olan SRAP, RAPD ve ISSR ile kodominant olan SSR markırları kullanılacaktır. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) markırları Li ve Quiros (2001), tarafından geliştirilmiş yeni bir moleküler markır sistemidir. PCR temelli bir sistem olan SRAP, iki primerden oluşan bir kombinasyonla çalışmaktadır. SRAP markır sistemi kolay uygulanabilen, tekrarlanabilen, ucuz ve etkili bir sistem olarak değerlendirilmiş (Li ve Quiros, 2001; Wang ve ark., 2008). Ayrıca bu markır sistemi ülkemizde bu proje ekibi tarafından turunçgil ve akrabalarında başarı ile uygulanmıştır (Uzun ve ark., 2009a). RAPD markırları kolay uygulanabilir, çoklu bant veren, ucuz bir yöntem olması ile turunçgillerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Corazza-Nunes ve ark., 2002; Schafer ve ark., 2004). Ülkemizde yapılan çalışmada ise RAPD markırları seleksiyonla elde edilen ‘Kütdiken’ limonlarının moleküler ayrımında kullanılmış ve polimorfizm elde edilmiştir (Uzun ve ark. 2009b). Öte yandan çok fazla sayıda RAPD primeri olduğundan, çalışmada daha fazla sayıda primerle çalışma olanağı bulunacaktır. ISSR markırları turunçgillerde yakın akrabaların ayırt edilmesinde kullanılabilecek bir sistem olarak bildirilmiş (Fang ve Roose, 1997), limonlar içerisinde çeşitlerin ayırt edilmesinde başarılı sonuçlar vermiş (Capparelli ve ark., 2004) ve ülkemizde yapılan çalışmalarda ‘Kütdiken’ limonu klonlarında bu markırlarla polimorfizm elde edilmiştir (Uzun ve ark., 2009b). SSR markırları yakın akraba grupların ayırt edilmesinde, genetik çeşitlilik çalışmalarında etkili bir markır sistemi olarak bildirilmiştir (Barkley ve ark., 2006).

SRAP Analizleri

SRAP analizleri için Uzun ve ark. (2009a)’nın turunçgillerde kullanmış olduğu ve aşağıda listesi verilen 13 adet ileri ve 16 adet geri olmak üzere toplam 29 primerden oluşan 208 primer kombinasyonu kullanılmıştır. PCR bileşenleri ve PCR döngüsü Uzun ve ark. (2009a) kullandıkları aşağıdaki protokole göre uygulanmıştır.

PCR bileşenleri, 1.5 µl 10X PCR buffer, 1.33 mM ileri ve geri primer, 200 µM her bir dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 2 mM MgCl₂, 0.8 µg/µl BSA (Bovine serum albumin), 1 ünite taq DNA polimeraz enzimi, 20 ng DNA, 5.8 µl ddH₂O. Karışım 15 µl’ye tamamlandıktan sonra son olarak buharlaşmayı engellemek amacıyla PCR tüplerinin üzerine bir damla mineral yağ ilave edilmiştir. PCR döngüsü;

94 °C 2 dk	
94 °C 1 dk	} 5 döngü
35 °C 1 dk	
72 °C 1 dk	

94 °C 1 dk }
 50 °C 1 dk } 35 döngü
 72 °C 1 dk }
 4 °C ∞

Çalışmada kullanılan SRAP primerleri

İleri Primerler

<u>Primer</u>	<u>Baz dizini (5'-3')</u>
Me1	TGA GTC CAA ACC GGA TA
Me2	TGA GTC CAA ACC GGA GC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT
Me4	TGA GTC CAA ACC GGA CC
Me5	TGA GTC CAA ACC GGA AG
Me6	TGA GTC CAA ACC GGA CA
Me7	TGA GTC CAA ACC GGA CG
Me8	TGA GTC CAA ACC GGA CT
Me9	TGA GTC CAA ACC GGA GG
Me10	TGA GTC CAA ACC GGA AA
Me11	TGA GTC CAA ACC GGA AC
Me12	TGA GTC CAA ACC GGA GA
Me13	TGA GTC CAA ACC GGA AG

Geri Primerler

<u>Primer</u>	<u>Baz dizini (5'-3')</u>
Em1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
Em2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Em3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Em4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Em5	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Em6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Em7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Em8	GAC TGC GTA CGA ATT CAC
Em9	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Em10	GAC TGC GTA CGA ATT CAT
Em11	GAC TGC GTA CGA ATT CTA
Em12	GAC TGC GTA CGA ATT CTC
Em13	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
Em14	GAC TGC GTA CGA ATT CTT
Em15	GAC TGC GTA CGA ATT GAT
Em16	GAC TGC GTA CGA ATT GTC

RAPD Analizleri

Çalışmada, RAPD primer kitleri (Operon Tech., Alameda, CA, USA) kullanılmış ve aşağıdaki kitlere ait toplam 542 adet RAPD primeri ile çalışılmıştır. RAPD analizlerinde PCR bileşenleri ve PCR döngüsü Uzun ve ark. (2009b), limonda kullandıkları aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

Kullanılan RAPD primer kitleri

OPAH	OPAV	OPBF	OPAL
OPAU	OPAZ	OPBA	OPAG
OPAF	OPAP	OPBH	OPAJ
OPAM	OPAS	OPATY	OPAK
OPAO	OPAR	OPAD	OPBD
OPAX	OPBC	OPAE	OPBE
OPAT	OPBB	OPAI	OPBG

RAPD Protokolü: 1.5 µl 10X PCR buffer, 1.33 mM primer, 200 µM her bir dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µg/µl BSA (Bovine serum albumin), 1 ünite taq DNA polimeraz enzimi, 20 ng DNA, 5.8 µl ddH₂O. Karışım 15 µl'ye tamamlandıktan sonra son olarak buharlaşmayı engellemek amacıyla PCR tüplerinin üzerine bir damla mineral yağ ilave edilmiştir.

PCR döngüsü;

94 °C 2 dk

94 °C 30 sn

38 °C 1 dk

72 °C 1.15 dk

72 °C 7 dk

4 °C ∞

} 38 döngü

ISSR Analizleri

Limon ve diğer turunçgillerde daha önceki çalışmalarda (Gülşen ve Roose, 2001; Capparelli ve ark., 2004; Shamsavar ve ark. 2007; Uzun ve ark., 2009b; Gülşen ve ark., 2009) kullanılmış olan ve aşağıda verilen toplam 13 adet ISSR primeri kullanılmıştır.

(AG)₈YT, HVH (GA)₇T, HVH(TCC)₇, VHV(GT)₈, (GA)₈YG, DBDA(CA)₇, (TAA)₈, (GACA)₄, (GAA)₆, (GT)₈YA, (CAC)₆, BDB(CA)₇C, (TCC)₅RY.

PCR bileşenleri RAPD markırlarında olduğu gibi uygulanacak, PCR döngüsü ise Uzun ve ark. (2009b)'na göre aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

94 °C 2 dk	
94 °C 1 dk	} 38 döngü
50 °C 1 dk	
72 °C 1.15 dk	
72 °C 7 dk	
4 °C ∞	

SSR Analizleri

SSR primerleri Golein ve ark. (2005) tarafından limonlarda kullanılan 3 adet, Aka-Kaçar ve ark. (2009), tarafından bildirilen 7 adet ve Mikael L. Roose tarafından turuncgillerde test edilmiş olan (<http://www.plantbiology.ucr.edu/faculty/SSR-Marker-Tables-Germplasm-v5.pdf>) 26 adet olmak üzere toplam 36 adet SSR primeri kullanılmıştır. PCR bileşenleri ve döngüsü Gülşen ve Roose (2001)'den modifiye edilen aşağıdaki protokole göre uygulanmıştır. PCR bileşenleri, 1.5 µl 10X PCR buffer, 1.33 mM ileri ve geri primer, 200 µM her bir dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µg/µl BSA (Bovine serum albumin), 1 ünite taq DNA polimeraz enzimi, 20 ng DNA, 4.3 µl ddH₂O. Karışım 15 µl'ye tamamlandıktan sonra son olarak buharlaşmayı engellemek amacıyla PCR tüplerinin üzerine bir damla mineral yağ ilave edilmiştir. PCR döngüsü ise;

94 °C 2 dk	
94 °C 1 dk	} 38 döngü
45–55 °C 1 dk	
72 °C 1 dk	
72 °C 7 dk	
4 °C ∞	

olacak şekilde düzenlenmiştir.

PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 1 X TBE (89 mM Tris, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA) içerisinde 110 voltta 3-4 saat süreyle elektroforez yapılmıştır (Şekil 2). Tüm elektroforez işlemlerinde 100bp DNA ladder standart olarak kullanılmıştır. Daha sonra jel görüntüleme ünitesinde jellerin resimleri çekilerek bilgisayar ortamına alınmıştır.



Şekil 2. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezine yüklenmesi işlemi

Ayrıca çalışmada öngörülmemesine rağmen, çeşitler arasındaki küçük dizin farklılıklarını bulabilmek amacıyla RT PCR (Real Time)'da High Resolution Melting (HRM) çalışmaları yapılmış ve SSR primerleri çalışılmıştır.

Bu amaçla LightCycler 480 High Resolution Melting Master kiti kullanılmıştır. HRM analizi için PCR karışımı; her primerden 0.3 μ M, 10 μ l kit kapsamında gelen master karışımı, 5 ng genomik DNA, 25-50 mM $MgCl_2$ içermektedir. Karışım gradient su ile 20 μ l'ye tamamlanmış, reaksiyonlar PCR strip tüplerinde LightCycler® 480 Sistemi'nde (Roche) kullanılarak analiz edilmiştir. PCR ve HRM analiz protokolü şöyledir;

95°C 5 dakika

95°C 10 saniye

57°C 15 saniye } 45 döngü

72°C 15 saniye

72°C 1 dakika

40°C 1 dakika

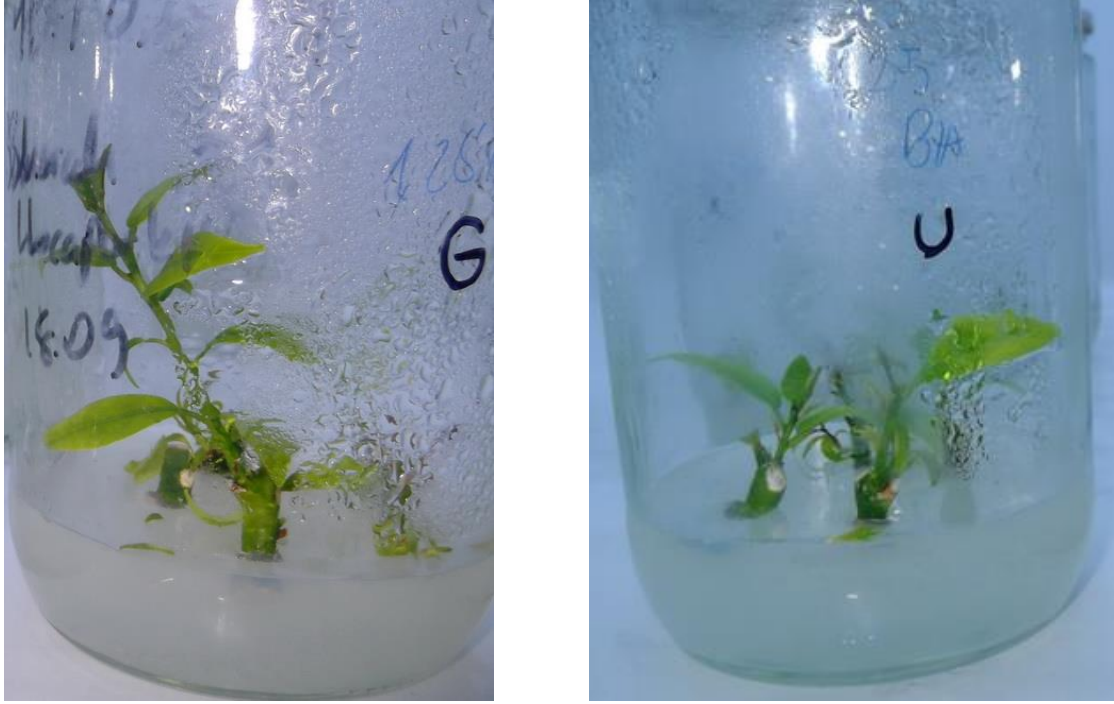
HRM Curve Analizi için örnekler 60-90°C arasında tutularak her bir derece için 25 değerlendirme yapılmıştır.

HRM tekniğinin prensibi çift sarmallı DNA sarmallarının yüksek sıcaklıkta ayrılırken oluşturdukları erime eğrisinin florasen boyalarla tespitine dayanmaktadır. Yöntem PCR karışımında yer alan boyaların çift sarmallı DNA'ya interaksyonu ile başlar. PCR işlemi sırasında örnekler ısıtıldığında DNA denature olur ve florasen renk bir erime eğrisi

oluşturacak şekilde saçılır. Farklı genetik baz dizileri farklı hızlarda erime eğrisi oluşturacakları için baz dizileri oluşturdukları erime eğrileri kıyaslanarak ayırt edilebilir. Bir tek baz farklılığı dahi erime eğrisinin şeklini değiştirebilmekte bu sayede SNP belirlenebilmektedir.

RNA Çalışmaları:

Projede temiz ve yeterli miktarda RNA elde etmek amacı ile farklı izolasyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmalarda çekirdekli ve çekirdeksiz limonlara ait yapraklarından ve küçük meyvelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Qiagen, Roch ve Geneaid şirketlerinin RNA izolasyon kitleri ayrıca manuel protokoller denenmiştir. Manuel metodlardan CTAB/Acid Phenol/Silica Membrane Metodu (Johnson ve ark. 2012) sonucunda elde edilen RNA örnekleri, NanoDrop spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüş ve çok iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu metod sonunda 500 ng değerine varan miktarda ve oldukça temiz RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lar TÜBİTAK MAM'a sekanslama amacıyla gönderildiğinde maalesef örneklerin kalite kaybına uğradığı anlaşılmıştır. MAM'da bioanalyzer cihazı ile yapılan ölçümlerde RNA'ların İllimuna sisteminde sekanslamaya uygun olmadığı rapor edilmiştir. RNA örnekleri ile yeni nesil sekanslama sistemleri ile yapılan çalışmalar dünyada 2005 yılında başlamıştır. Ülkemizde ise bu sistemler kullanan ve hizmet sunan laboratuvar sayısı oldukça azdır. En yaygın olarak İllimuna ve Roch teknolojileri kullanılmaktadır. Roch sistemi İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde aktif olarak çalışmaktadır. İllimuna sistemi ise TUBİTAK MAM'da mevcuttur. Elde edilen RNA örneklerinin İllimuna sistemine uygun hale getirebilmek için TAGEM/ 12 / AR-GE / 10 nolu proje kapsamında, o proje yürütücüsü olan ve aynı zamanda bizim projemizde RNA çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz Yrd. Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN tarafından kayısı örnekleri doku kültüründe kültüre alınarak TUBİTAK MAM'a götürülmüş ve taze yapraklardan orada RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinin yeni nesil sekanslama sistemine uygun olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, temiz RNA elde etmek amacıyla limon çeşitlerinden doku kültürü ortamına alınan gözlerden sürgünler elde edilmiş ve bunlar 4-5 yapraklı olunca (Şekil 3) yapraktan RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu aşağıda açıklanan şekilde yapılmıştır.



Şekil 3. RNA izolasyonu için doku kültüründe yetiştirilen bitkiler

RNA izolasyonu aşağıda açıklanan şekilde yapılmıştır (Şekil 4).

- 1- 14ml'lik RNase free santrifüj tüpleri ve spatulalar içerisinde sıvı azot bulunan strafor kutu içerisinde soğutulmuştur.
- 2- Yine -80°C 'de tüpler içerisinde bulunan bitki dokuları sıvı azot içerisine yerleştirilmiştir.
- 3- İçerisine bir miktar sıvı azot konulmuş havanlara 100 mg bitki dokuları soğutulmuş spatula ile alınmıştır.
- 4- Daha sonra üzerine 450 ul lysis buffer eklenmiş ve üzerine 10 ul mercaptoetanol eklenerek çeker ocak içerisinde havanda bitki dokuları öğütülmüştür.
- 5- Karışım hızlıca bir santrifüj tüpüne alınarak 1-2 dakika süre ile vortexlenmiştir.
- 6- Ardından 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmış ve üstteki yaklaşık 450 ul supernatant kısım dikkatlice başka bir RNase free 1,5 ml'lik bir tüpe aktarılmıştır.
- 7- Bunun içerisine yaklaşık 225 ul oda sıcaklığındaki % 96-100'lük etanol eklenmiştir.
- 8- Yaklaşık 670 ul karışım 2 ml'lik tüplerdeki RNAeasy mor stünlarının içerisine konulmuş ve kapağı dikkatlice kapatılmıştır.
- 9- Karışım 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- 10- Tüpler içerisine 700 ul RW1 tamponu ilave edilmiş ve 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiştir.

- 11- Süzöntü boşaltılmış üzerine 500 ul RPE buffer eklenmiş ve 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiştir ve pellet kısmı uzaklaştırılmıştır.
- 12- Süzöntü boşaltılmış üzerine tekrar Üzerine 500 ul RPE buffer eklenmiştir.
- 13- RNeasy silica-gel membranın yıkanması için 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 14- Süzöntü boşaltılmış ve etanol kalıntısı bırakmamak için karışım 2 dakika son kez spin edilmiştir.
- 15- Silika-gel membran spin tüpü yeni 1.5 ml tüplere aktarılmış. 30 ul RNase-free su silica-gel membranın üzerine ilave edilmiş ve 1 dakika beklenmiştir.
- 16- 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 17- RNA'nın bozulmasını engellemek için tüpler buz üzerine alınmıştır.
- 18- RNA miktarı ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometrede belirlenerek RNA - 80°C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen ve kalite değerleri belirlenen RNA örneklerinde sekanslama çalışmaları hizmet alımı kapsamında yapılmıştır.

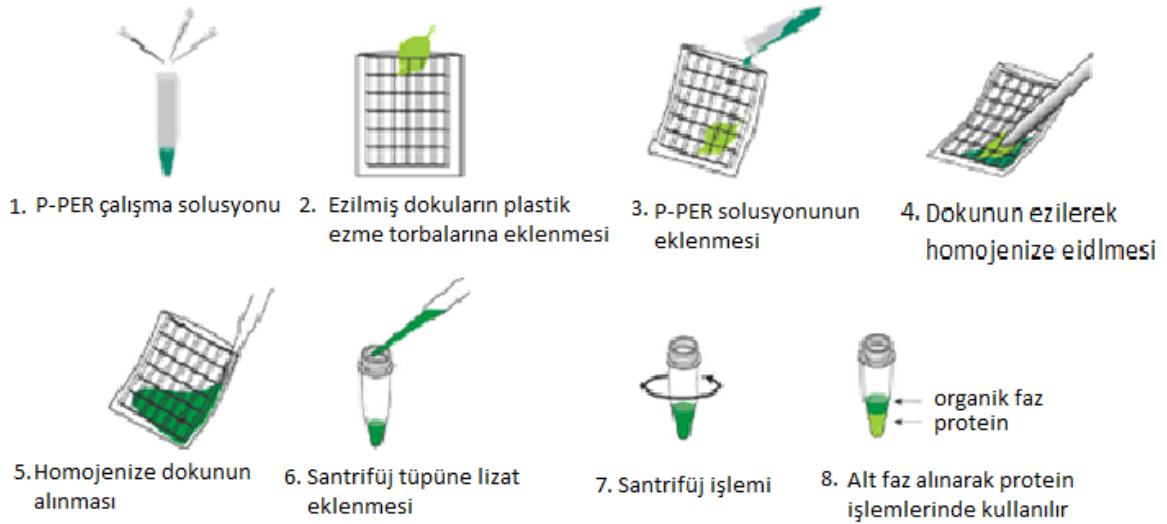




Şekil 4. RNA izolasyonunun farklı aşamaları

Protein Çalışmaları

Protein ekstraksiyonu içi limon bitkisinin yaprak, meyve ve çiçek dokuları 4 °C'deki havanlar içerisinde sıvı azot ile parçalanarak protein izolasyonu işlemlerinde kullanılmıştır. Ardından protein ekstraksiyon kiti, fenol ekstraksiyon yöntemi ve aseton ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak protein miktarı ve farklı protein sayısının en fazla olduğu izolasyon yöntemi optimize edilmiştir. Thermo P-PER Plant Protein Extraction Kit (89803) kullanılarak yapılan çalışmada üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapılmış olup protein sayısı fazla olmamasına rağmen özellikle çekirdekli ve çekirdeksiz meyvelerden elde edilen proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrlamid Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) (%10) işlemi ile analiz edildiğinde bir bantta farklılık gözlemlenmiştir.



İşlemler;

1. Çalışma solüsyonu hazırlanarak koloidal süspansiyon oluşana kadar karıştırılmıştır. Ardından protein degradasyonunun olmaması için bir miktar proteaz inhibitör kokteyl eklenmiştir.
2. Dokular (80 mg) açık kısmı yukarı gelecek şekilde tutulan plastik fileli kaplara eklenmiştir.
3. Çalışma solüsyonu (1 ml) eklenerek sert ve yuvarlak uçlu bir çubukla iyice homojenize olana kadar ezilmiştir.
4. Mikropipet kullanılarak homojenat alınıp eppendorf tüplerine eklenmiştir.
5. 2000-5000xg de 5 dakika santrifüj edilerek altta kalan ve protein içeren sıvı yeni bir tüpe alınarak protein elektroforezi işlemlerinde kullanılmıştır.

Protein ekstraksiyon işlemi kitlerin yanında aşağıdaki protokoller kullanılarak ta gerçekleştirilmiş olup en yüksek oranda protein miktarı ve net protein bandı fenol ekstraksiyon protokolü ile elde edilmiştir. Bu nedenle 2DGE ve IEF elektroforez işlemlerinde kullanılan örnekler bu yöntem kullanılarak yapılmıştır.

Protein Ekstraksiyon Yöntemi

Protein ekstraksiyonu Isaacson ve ark. (2006)'nın metoduna göre aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- I. Taze dokuyu sıvı azotta parçalanmıştır. Tartarak eşit hacimde kaplara eklenmiştir (1-5g)
- II. Parçalamaya başlamadan önce sıvı azot ile havan soğutulmuştur.

III. Doku soğuk havana koyularak asitte yıkanmış kum taneleri ile karıştırılmıştır (0.5-1 g/1g taze doku) (ayrıca 1-15% PVPP wt/wt eklenmesi fenolik bileşikler elimine ederek daha saf protein elde edilmesini sağlamaktadır). Dokunun erimemesine dikkat edilmiştir. Fiberce zengin dokular için her 1 g doku için 10-15 ml ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Maximum homojenizasyon optimum sonuç vermektedir.

IV. Fenol Ekstraksiyonu (Şekil 5)

1. Elde edilen toz soğuk fenol ekstraksiyon tamponunda (0.7M süktroz; 0.1M KCl; 0.5M Tris-HCl, pH 7.5 ve 50 mM EDTA. Kullanmadan hemen önce 2% merkaptotanol (v/v) ve 1mM PMSF eklenir) suspend edilmiştir (PVPP 100mg/1g doku; ekstraksiyon tamponu 15ml/1g doku). Proteinler tamponda solubilize edilmiştir. Proteaz aktivitesini minimize etmek için örnekler 4 derecede tutulmuş ve işlem olabildiğince hızlı yapılmıştır.
2. Eşit hacimde Tris HCl ile sature fenol eklenmiştir (pH7.5; 8-8.5).
3. Karışım 4 derecede 30 dakika çalkalanmıştır.
4. Ardından 5000xg de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Üst fenolik faz alınmış alt aqua faz pelletle birlikte atılmıştır.
6. Elde edilen fenolik faza eşit hacimde ekstraksiyon tamponu eklenmiştir.
7. Aşama 3-6 tekrarlanarak suda çözünen kontaminantlar uzaklaştırılmıştır.
8. Aşama 3-5 tekrarlanmıştır. Bu aşamada fenolün yarısı kalmaktadır.
9. Proteinleri çöktürmek için 5 hacim soğuk amonyum asetat (0.1M, metanolde çözülmüş) eklenmiştir. Bir gece -20°C'de bekletilmiştir. Proteinler beyaz görünümlüdür.
10. Örnekler 5000xg de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant pipetle dikkatlice atılmıştır.
11. Pelleti yıkamak için iki hacim (en son elde edilen fenolik faza göre) soğuk metanol eklenerek hafifçe karıştırılmıştır.
12. Örnekler 5000xg de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatlice atılmıştır.
13. 11 ve 12. Aşamalar tekrarlanmıştır. Bu aşamada amonyum asetat, fenol, lipitler ve pigmentler uzaklaştırılır.
14. 11 ve 12. Aşamalar iki defa tekrarlanmıştır. Bu aşamada metanol yerine aseton kullanılmıştır (asetonda kuruma işlemi daha hızlı gerçekleşir).
- V. Pellet çeker ocakta kurutulmuştur. İdeal protein rengi beyaz veya oldukça açık renklidir. Pellet 1.5 ml lik tüplere alınmıştır (proteinlerin aşırı kurutulması çözünmeyi

engelleyebilir, ayrıca aseton kalıntısı da çözünmeyi engelleyebilir). Örnekler -80 derecede küçük hacimlerde kaplara ayrılarak saklanmıştır.

VI. Uygun denemeler için pellet protein resüspansiyonu elde etmek amacıyla tamponda resüspand edilmiştir.



Şekil 5. Fenol ekstraksiyonu çalışmalarından bir görüntü

Bu aşamadan sonra;

- Bir boyutlu jel elektroforezi için: pellet SDS jel yükleme tamponunda çözündürülmüştür.
- 2D için: örneklerdeki tuz, SDS gibi yüklü moleküllerin miktarının minimum düzeyde olması sağlanmıştır. Bunlar izoelektrik fokuslamada (IEF) problem oluşturmaktadır. Bu nedenle protein solubilizasyonunda üre ve zwitteriyonik deterjanlar (CHAPS) veya non-iyonik deterjanlar (Triton x100 gibi) kullanılmıştır.

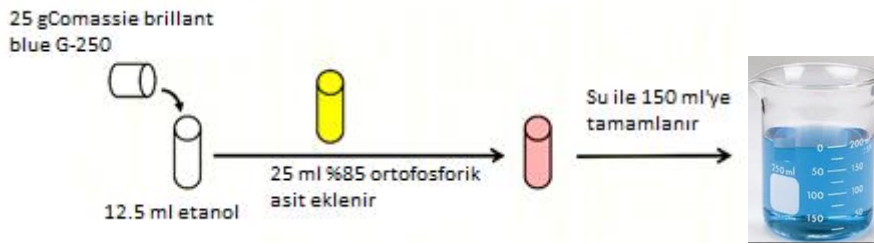
NOT: 4 derecede inkübasyon sonucunda üre kristalleri oluşabilmektedir. Ayrıca 30 °C'nin üstünde üre protein karbamilasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle işlemler birkaç saat içinde yapılmamıştır.

IV. Analitik işlemlerden önce yüksek gx de santrifüj yapılarak süpernatant alınıp jele yükleme işlemlerinde kullanılmıştır. Böylece örneklerde çözünmeyen maddelerin olmamasından emin olunmuştur.

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

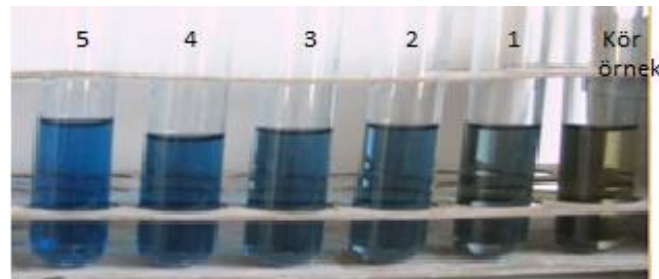
Farklı dokulardan elde edilen proteinlerin konsantrasyonu aşağıda belirtilen protokole göre Modifiye Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976;

http://openwetware.org/images/a/a6/Modified_Bradford_Dye_Assay_Protocol.doc).



Bradford solüsyonunun hazırlanması: 25 gr Comassie brilliant blue 12.5 ml etanol ve 25 ml %85'lik ortofosforik asit içerisinde iyice çözdürülerek su ile 150 ml'ye tamamlanmıştır (Bradford, 1976). Elde edilen solüsyon Whatman No.1 kağıdı ile süzülükten sonra protein miktarı ölçüm işlemlerinde Spektrofotometre ile ölçülmek üzere kullanılmıştır.

Ölçümlerde standart olarak Bovin serum albümin (BSA) (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$) kullanılmıştır. Örneklerin spektrofotometrede 595 nm'deki ölçümleri proteinlerin Bradford solüsyonuna göre verdikleri reaksiyona göre belirlenmiştir. Aşağıdaki şekilde en düşük ve en yüksek protein konsantrasyonundaki renk değişikliği görülmektedir. Ölçüm değerleri ile elde edilen absorbanlara göre elde edilen grafik aşağıda belirtilmiştir. R^2 değerinin 0.99 olarak bulunması ölçüm değerlerinin en iyi düzeyde olduğunu göstermektedir.





Şekil 6. Spektrofotometre cihazında protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

	Kütdiken	Alata	Gülşen	Uzun
Absorbans değerleri	0,378	0,319	0,356	0,398
	0,278	0,257	0,319	0,371
	0,268	0,276	0,323	0,36
Ortalama	0,308	0,284	0,332	0,376
Konsantrasyon (µg/µl)	2,16	1,98	2,34	2,66

Aşağıdaki tabloya göre çeşitlerin protein miktarları 300-350 µl içerisinde 500 µg protein olacak şekilde ayarlanmış ve jele yüklenerek 2D işlemleri yapılmıştır. Bu işlem her bir deneme için yeniden hesaplanmıştır.

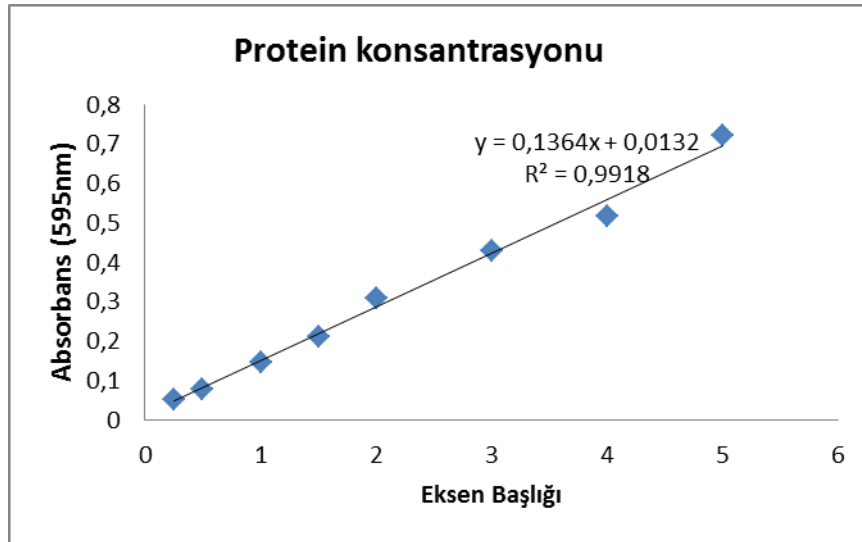
Kütdiken	Alata	Gülşen	Uzun	
274	302	247	214	Protein (µl)
51	23	78	111	IEF solüsyonu (µl)
500	500	500	500	Toplam konsantrasyon (µg)

Aşağıdaki standart grafiğinden elde edilen “ $y = 0,1364x + 0,0132$ ” denkleminde çekirdekli ve çekirdeksiz limon meyvelerinden elde edilen proteinlerin absorbans değerleri yazılarak konsantrasyonları belirtilmiştir. SDS-PAGE protein jel elektroforezinde jel kuyucuklarına

yükleme yapılmadan önce örneklerin protein konsantrasyonları tampon ile aynı orana getirilecek şekilde ayarlanmıştır.

2D IEF sisteminde yapılan denemede standart protein konsantrasyonu aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra ölçümler yapılarak grafik çizilmiştir.

Tüp no	Protein miktarı (µg)	Standart solüsyon (µl)	Üre karışımı (µl)	0.1 N HCl (µl)	dH ₂ O (µl)	1:3 dilüe B.R (ml)
Kör	-	-	10	10	80	3.5
1-1	2 µg/ µl üre	0.4	9.6	10	80	3.5
1-2	5 µg/ µl üre	1	9	10	80	3.5
1-3	10 µg/ µl üre	2	8	10	80	3.5
1-4	20 µg/ µl üre	4	6	10	80	3.5
1-5	30 µg/ µl üre	6	4	10	80	3.5
1-6	40 µg/ µl üre	8	2	10	80	3.5
1-7	50 µg/ µl üre	10	-	10	80	3.5



R^2 değerlerinin hesaplandığı standart protein grafiği (Örneklerin protein konsantrasyonlarının hesaplamasında kullanılmış olup her bir deneme için yenilenmiştir)

Çekirdekli ve çekirdeksiz limon meyvelerindeki protein örneklerinin miktar ölçümü için 5 mg protein örneği ependorf tüplere alınarak 200µl üre karışımı eklenip oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından 12.000xg de 3 dakika santrifüj edildikten sonra aşağıdaki tabloya göre karışımlar hazırlanmıştır.

Tüp	Açıklama	Üre karışımında çözülen örnek (µl)	Üre karışımı (µl)	0.1 N HCl (µl)	dH ₂ O (µl)	1:3 dilüe B.R (ml)
Kör	-	-	10	10	80	3.5
1-1	Çekirdekli	10	10	10	80	3.5
1-2	Çekirdeksiz	10	10	10	80	3.5

OD değerlerine göre protein miktar hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

Örnekteki protein miktarı (µg)=(örneğin OD'si/standart eğrinin eğimi)x Dilüsyon faktörü

Formülde değerler yerine koyulduğunda ½ oranında seyreltilmiş Kütdiken, Alata, Gulsen ve Uzun çeşitlerinde protein miktarı 2,16; 1,98; 2,34; 2,66 µg/µl olarak bulunmuştur.

IEF Solüsyonu Hazırlama

Eklenme sırası	Kimyasal
1	8 M üre
2	2M thioüre
3	%0.2 amfolin
4	4 % CHAPS
5	50 mM DTT
6	%0.02 bromophenol blue

Üre ve thioüre bir behere tartılarak eklenmiş ve kullanılacak hacmin bir kısmı ile çözünmesi sağlanmıştır (Örneğin 100 mL yapılacaksa 40-45 mL dH₂O'da çözülür). Çözünmeyi kolaylaştırmak için, 30 °C'yi geçmeyecek sıcaklıktaki bir su içinde bekletilebilir. Üre ve thioüre çözüldükten sonra yukarıdaki geri kalan kimyasallar (bromophenol blue hariç) sıra ile eklenir. Ampholine kullanılırken kontaminasyon riskine karşı bek alevi yanında çalışılmasına dikkat edilir. Tüm kimyasallar çözününce hacim istenilen miktara tamamlanır. En son bir spatül ucuyla hafifçe bromphenol blue içine dokundurup çıkarıldıktan sonra solüsyona eklenir. Renk yeterli görülmezse biraz daha ilave edilebilir. Son olarak elde edilen IEF süzülerek kalıntılardan temizlenir (Wu ve ark., 2013).

IEF İşlemleri

1. Protein miktarı belirlenmiştir (modifiye Bradford ile).
2. Örnekler 300 µl'de 500 µg protein olacak şekilde ayarlanmıştır (IEF tamponunda).

3. 300 µl örnek strip kaplarında kuyucuklara eklenerek üzerine srib'in ters tarafı jel alta gelecek şekilde bırakılmıştır.
4. Boş kuyucuklardan bir kaçına su eklenerek kurumayı engellemek için streç film ile kapatılmıştır.
5. Bir gece 22 °C'de bekletilerek striplerin proteinleri alması sağlanmıştır.
6. Stripler İEF kuyucuklarına yerleştirilerek (rakamlı kısım pozitifte koyulur-jelin üste gelmesi tercih edilir) ve uç kısımlarına wick (absorbant kağıt) koyulmuştur. (wicklerin üzerine 100-200 mikrolitre nanopure su eklenerek iki kağıt arasına sıkıştırılıp fazla su alınmıştır.
7. Jelin üzeri mineral yağ ile doldurulmuştur (yaklaşık 3.5 ml).
8. Ardından İEF cihazında protokol çalıştırılmıştır.

İEF Sisteminde Örneklerin Bekletilmesi

Konsantrasyonları eşitlenen protein örneklerinden 200 µl alınarak İEF striplerinin (17 cm, 3-10 pH) üzerine eklenmiş ve bir gece proteinleri absorblaması sağlanmıştır. Ardından İEF sistemine bırakılarak aşağıdaki programa göre yürütülmüştür: 500 V'ta 1 saat lineer, 500 V'ta 2 saat rapit, 10.000 V'ta 5 saat lineer, 10.000 V'ta 10 saat rapit ve ardından 500 V'ta tutulmuştur. İşlemler 50 µA de gerçekleştirilmiştir. Stripler çıkarıldıktan sonra aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE jele koyulmuş ve 50 mA de 6 saat yürütüldükten sonra Coomassie boyası ile boyanıp aşağıda belirtildiği şekilde görüntülenmiştir.

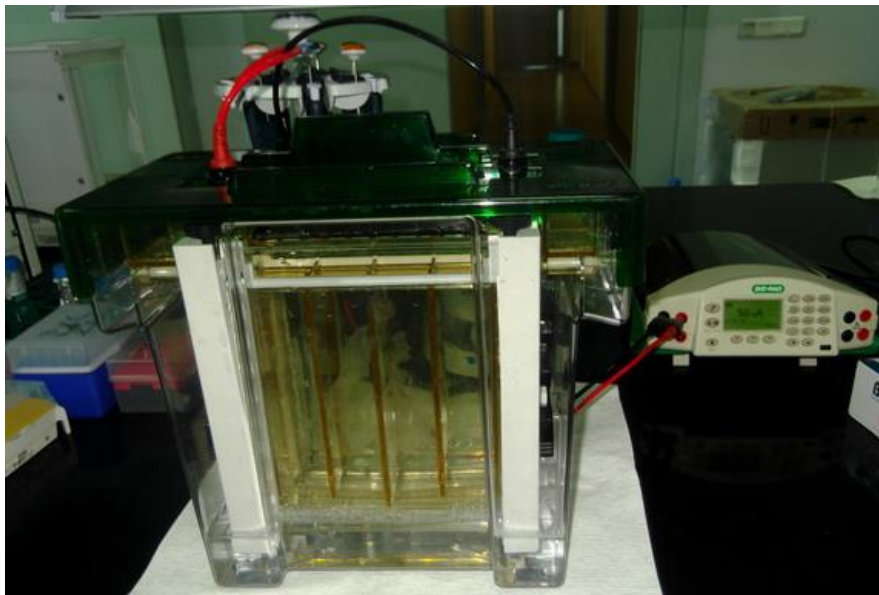
SDS-PAGE Hazırlama

1. Stripler İEF sistemden alınmadan önce DTT ve iodoasetamid içeren denge solüsyonları hazırlanır (herbir strip için 5-10 ml).
2. Strip kuyucuklarına stripler bırakılarak (öncesinde bir peçete üzerinde yağı emdirilir ve koşturma tamponunda yağı alınır) DTT'li (100mg/10ml) denge solüsyonu eklenir (5ml) ve 15 dakika çalkalanır
3. Ardından DTT'li solüsyon dökülerek (lavaboda eğerek yapılabilir) iodoacetamid'li (250mg/10ml) solüsyon eklenir ve 15 dakika bekletilir.
4. Bu süre içerisinde 1X koşturma tamponu hazırlanır (yaklaşık 1.5l) .
5. Akrilamid jel sisteme yerleştirilir (Tampon sızıntısını engellemek için önceden lastiklerinin takılmasına dikkat edilir).
6. Tampon üst kısma eklenerek alt kısımdan akıp akmadığı kontrol edilir.
7. Geriye kalan tampon alt tanka eğdirilerek köpük oluşturmada eklenir.
8. Dengeleme solüsyonundan alınan strip tekrar koşturma tamponunda temizlenir ve jelin üzerine dikkatlice bırakılır.

9. 50 mA de kořturulur (her bir jel için 25 mA olacak şekilde ayarlanır).
 10. İşlem sonunda su girişleri çıkarılarak uçlarına tıpa takılır ve lavaboda suyu boşaltılır.
 11. Camlar arasından jel çıkarılırken spacerler çıkarılır ve spatul ile açılır.
 12. İki taraflı açma işlemleri yapıldıktan sonra ters çevrilerek fiksatifte bekletilir.
- şekil 7’de SDS PAGE jelde elektroforez işlem görüntüsü verilmiştir.

SDS-PAGE jel hazırlanması tabloda belirtildiği şekilde yapılmıştır

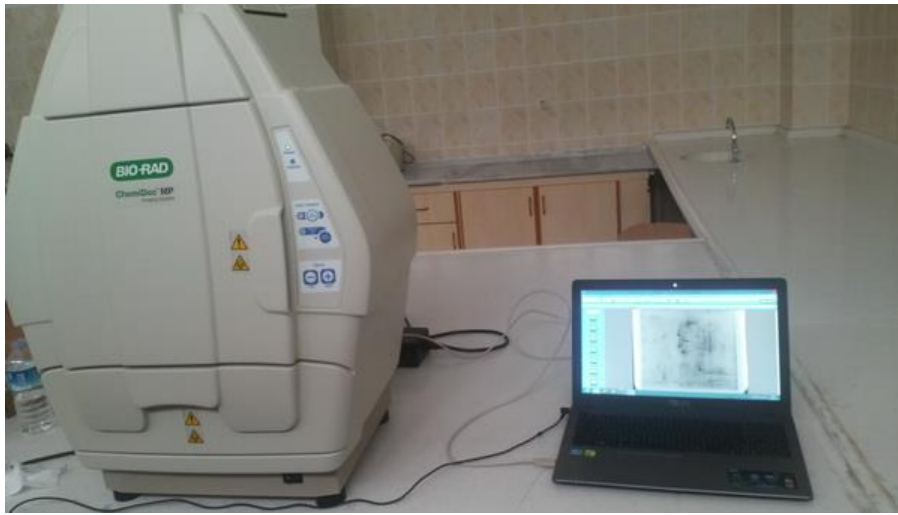
Kullanılan kimyasallar	Yükleme jeli (5 ml)	Kullanılan kimyasallar	Koşturma jeli (%12, 10ml)
Tris HCl (0.5M, pH 6.8)	1.25	1.5M Tris HCl (pH 8)	2.6
SDS (%10)	0.05	SDS (%10)	0.1
Akrilamid	0.67	Akrilamid	4
Su	2.97	Su	3.2
APS (%10)	0.05	APS (%10)	0.1
TEMED	0.005	TEMED	0.01



şekil 7. SDS PAGE jelde elektroforez işlemi

Jel Boyama işlemi

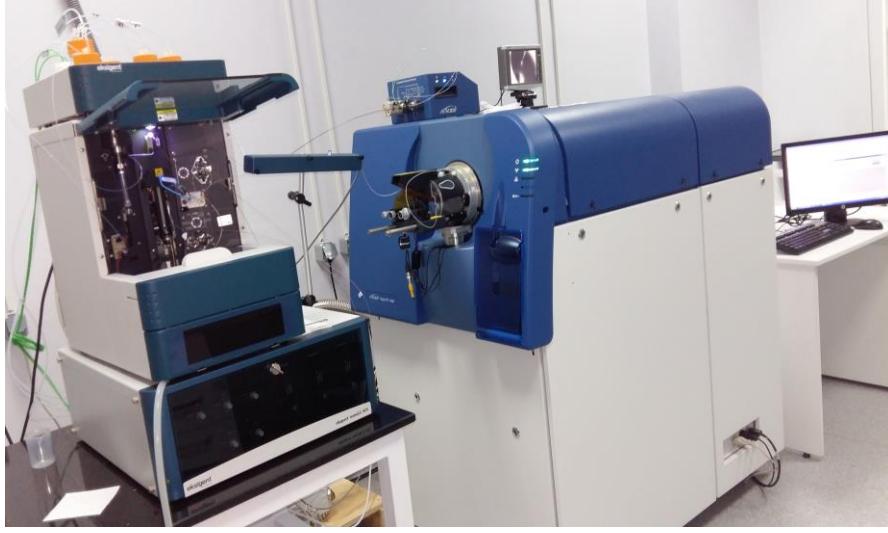
Jel boyama işlemi Syrovı ve Hondny (1991)'nin metoduna göre Coomassie brillaiant blue G-250 ile yapılmıştır. Jel elektroforez işleminden sonra 450 ml metanol, 90 ml asetik asit, 450 ml distile su, 2.5 g Coomasie brilliant blue G250 ile hazırlanan boya içerisinde 20-25°C' de 30 dakika bekletilmiştir. Plastik bir kap içerisinde yıkama çözeltisi değiştirilerek jelin yıkama işlemine gece boyu devam edilmiştir. Jel boyandıktan sonra çeşme suyu ile birkaç defa yıkanmıştır. Ardından 450 ml metanol, 90 ml asetik asit, 450 ml H₂O, karışımının 200 ml'si içinde 30 dakika bekletilmiştir. Jel, % 10 gliserol çözeltisine aktarılarak hem normal boyutuna ulaşması hemde kırılğanlığının azalması sağlanmıştır. Ardından Bio-Rad ChemiDoc MP Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Jel görüntülerinin görüntüleme cihazında alınması

LC-MS/MS analizi

Jeller Coomassie brillant blue ile boyanmış ve jel-içi ayrımı için kesilmiştir. Ayrımın ardından %3 CAN içinde %0.4 formik asit, %50 ve %100 CAN içinde %0.4 formik asit sıralı yıkama ile jel matrisinden peptitler yıkanmıştır. Peptitler daha sonra ZipTip C 18 (Merc Millipore) ile tuzdan arındırılmıştır. Eksigent expert nano-LC 400 systeme (AB SCIEX) sahip AB SCIEX TripleTOF 5600+ instrument (AB SCIEX) kullanılarak ikili spektrometrik kütle analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 9). Analyst® TF v.1.6 (AB SCIEX) kullanarak MS ve MS/MS verileri elde edilmiş ve MS verileri peptit teşhisi için ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) kullanılarak analiz edilmiştir.

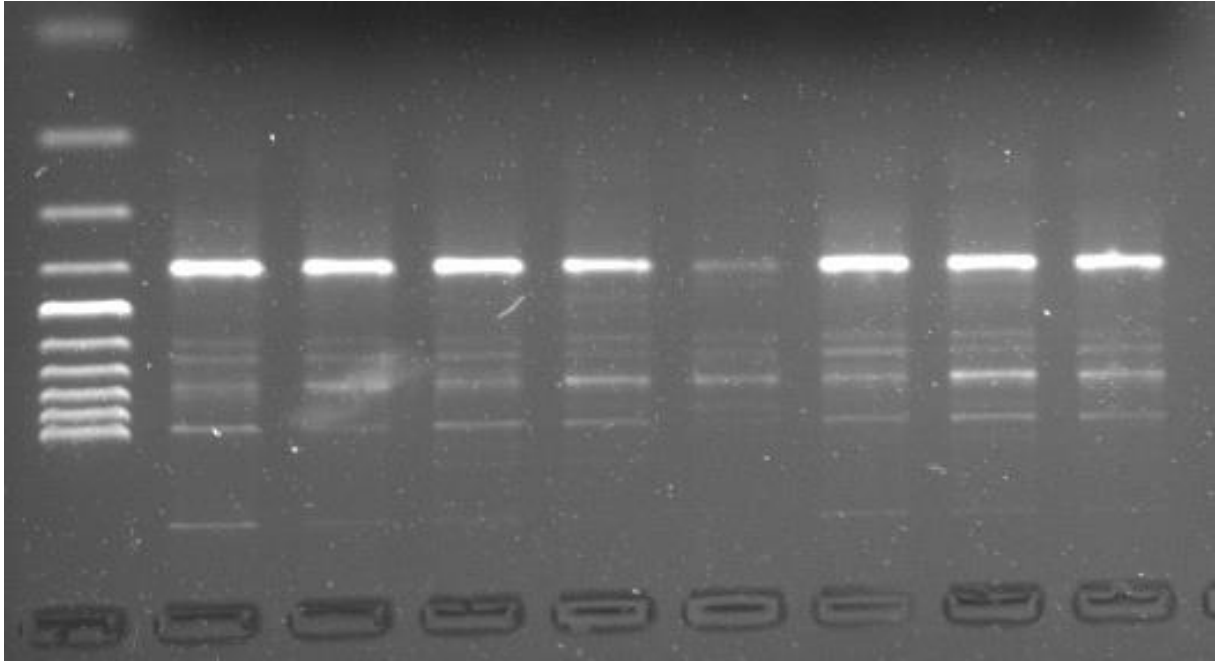
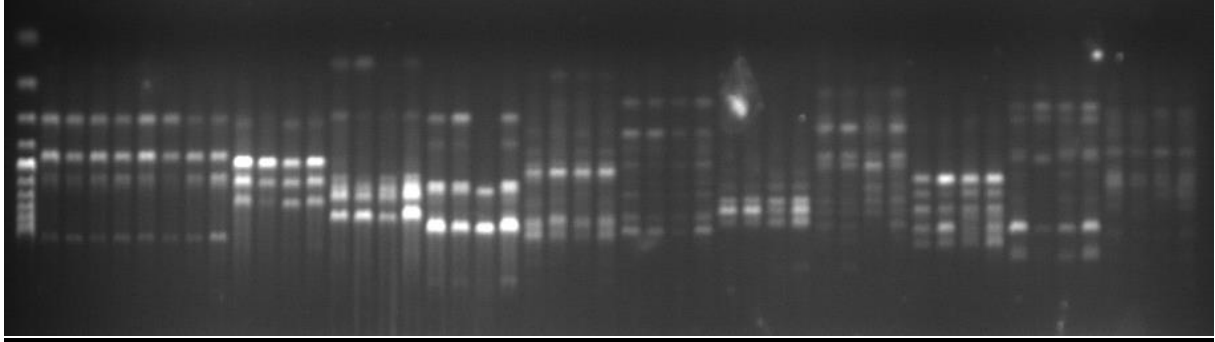


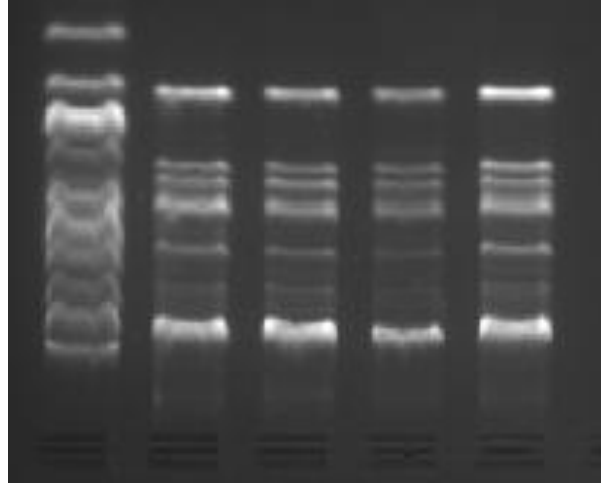
Şekil 9. Eksigent ekspert™ nano LC 400 system

BULGULAR

DNA Çalışmaları

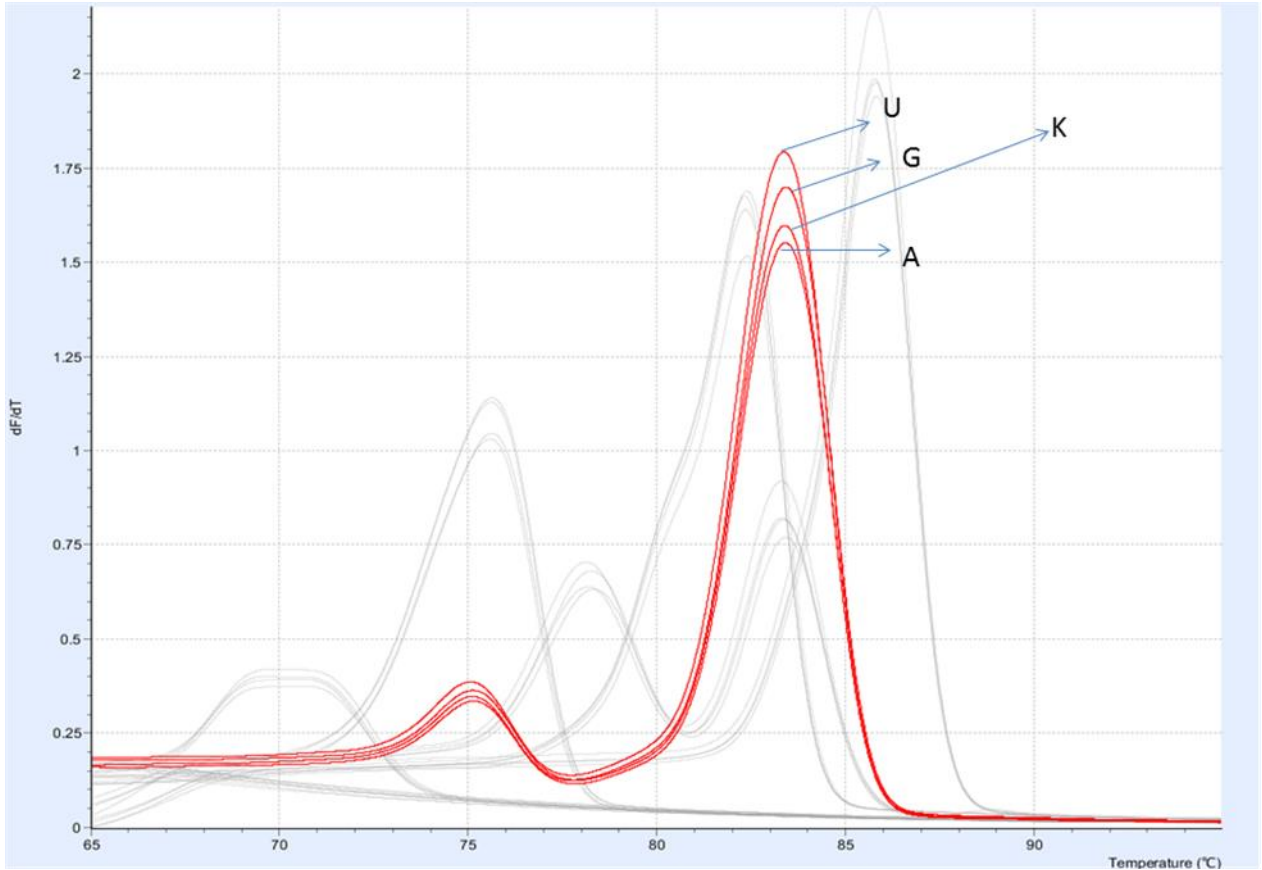
DNA çalışmaları için 542 RAPD, 208 SRAP, 36 SSR ve 13 adet ISSR olmak üzere toplam 799 primer kullanılmıştır. Çalışmalar iki yinelemeli olarak sürdürülmüştür. DNA çalışmalarında çeşitleri net bir şekilde ayırt edebilen bir primer tespit edilememiştir. Çalışmada elde edilen bazı jel görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.





Şekil 10. Çalışmada kullanılan bazı RAPD primerleri ile limon çeşitlerinde elde edilen jel görüntüsü (soldan sağa doğru, Gülşen, Uzun, Alata, Kütdiken)

Proje başvuru metninde olmamasına rağmen SSR primerleri ile RT-PCR cihazında HRM çalışması da yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarında çeşitler arasında net bir farklılık görülmemiştir. Şekil 11’de AG 14 primerinde elde edilen RT-PCR görüntüsü verilmiştir.



Şekil 11. Limon çeşitlerinde RT-PCR cihazında AG 14 primeri ile elde edilen görüntü

RNA Çalışmaları

Limon yapraklarından RNA izolasyonları sonucunda çeşitlere göre elde edilen kalite ve kantite değerleri aşağıda verilmiş olup, bu değerler sekanslama için uygun bulunmuştur.

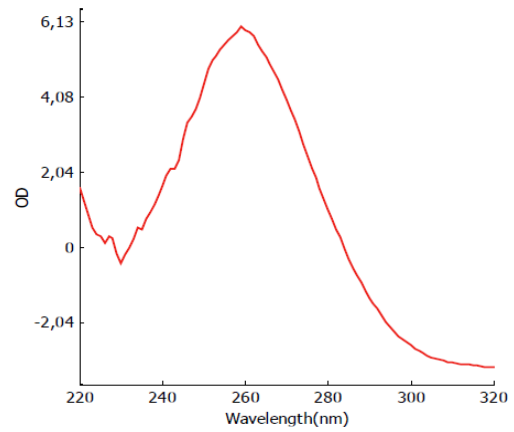
Gülşen Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Yaprak)

Nucleic Acid Conc : 366,66 ng/μL

OD260/280 : 2,14

OD260/230 : 3,25

Item	Result
OD260	5,893
OD280	1,011
OD230	-0,453
OD320	-3,274
Pathlength (mm)	0,686
Dilution	1,000



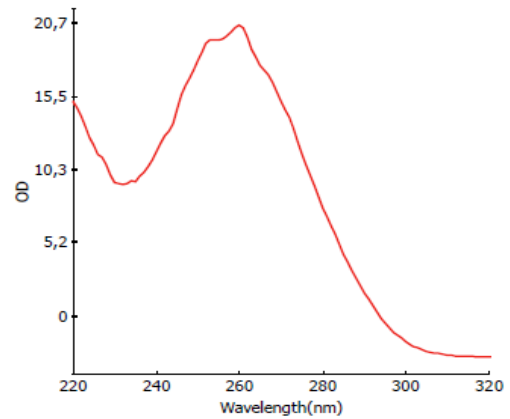
Alata Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Yaprak)

Nucleic Acid Conc : 939,17 ng/μL

OD260/280 : 2,22

OD260/230 : 1,91

Item	Result
OD260	20,547
OD280	7,647
OD230	9,381
OD320	-2,932
Pathlength (mm)	0,686
Dilution	1,000



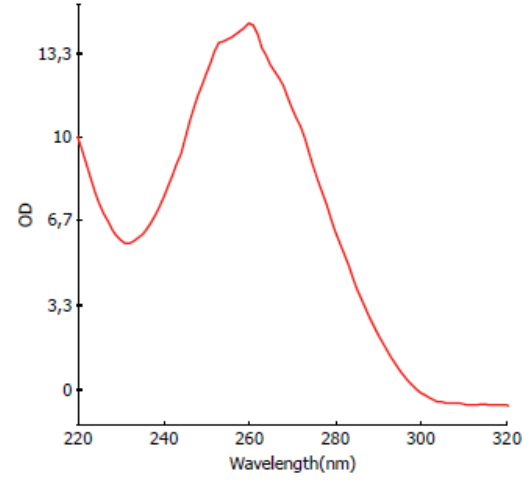
Uzun Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Yaprak)

Nucleic Acid Conc : 605,81 ng/μL

OD260/280 : 2,19

OD260/230 : 2,32

Item	Result
OD260	14,489
OD280	6,251
OD230	5,870
OD320	-0,656
Pathlength (mm)	0,686
Dilution	1,000



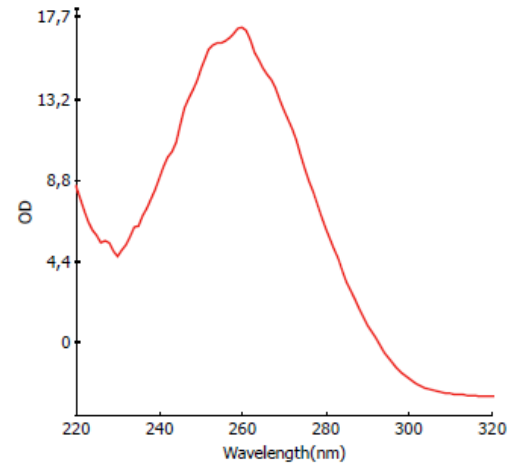
Kütdiken Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Yaprak)

Nucleic Acid Conc : 802,47 ng/μL

OD260/280 : 2,19

OD260/230 : 2,63

Item	Result
OD260	17,110
OD280	6,189
OD230	4,671
OD320	-2,952
Pathlength (mm)	0,686
Dilution	1,000



RNA sekanslama işlemleri yerli bir firma aracılığı ile Hong Kong'ta yaptırılmıştır.

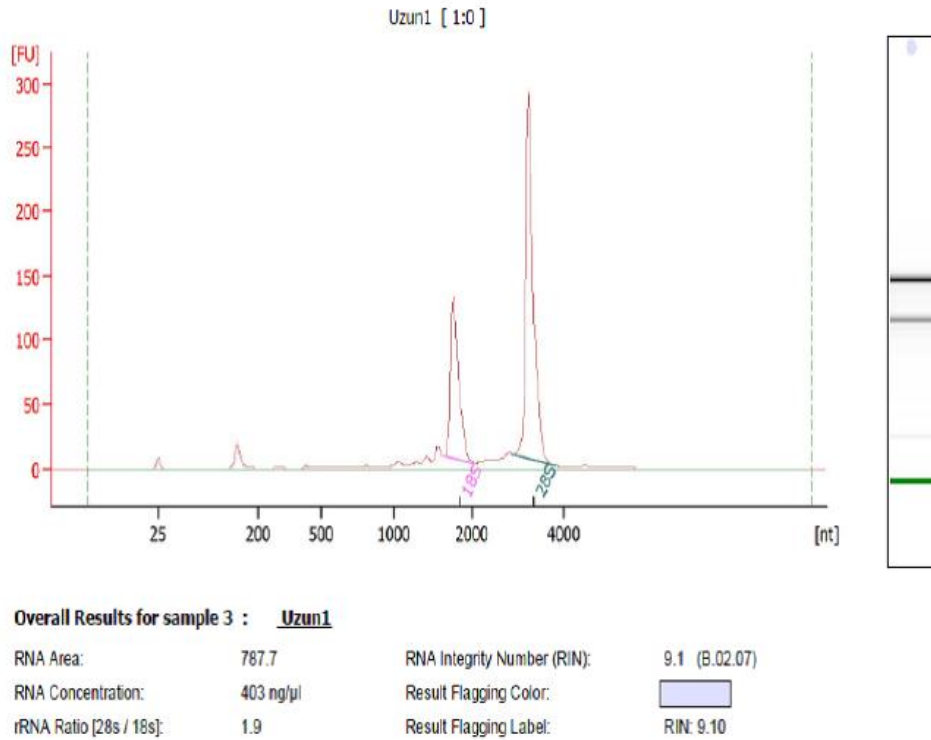
Çalışmada ayrıca küçük meyvelerden de RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonları sonucunda çeşitlere göre elde edilen kalite ve kantite değerleri aşağıda verilmiş olup, bu değerler sekanslama için uygundur. Örneklerin tamamının sonraki işlemler için 'A' sınıfında belirlenmiştir (Tablo 1). Bu durum iyi bir sekanslama için çok önemlidir.

Tablo 1: Limon çeşitlerinin küçük meyvelerine ait RNA örneklerinin genel kalite ve kantite değerleri.

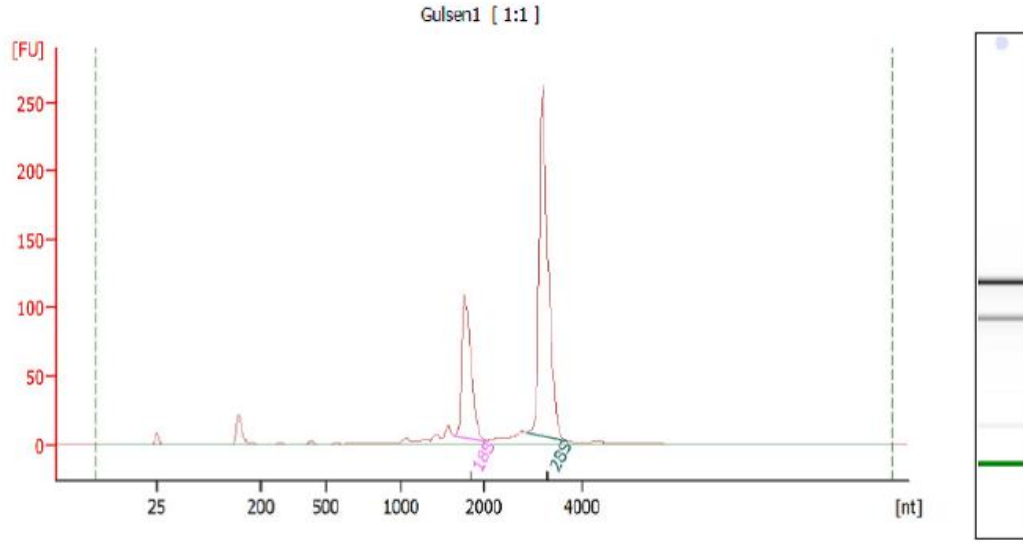
No.	Sample Name	Sample Number	Tube No.	Concentration(ng/ μ L)	Volume(μ L)	Total Mass(μ g)	RIN	28S/18S	Library Type	Test Result
1	Uzun1	85214102932	1	403	23	9.27	9.1	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A
2	Uzun2	85214102933	1	760	21	15.96	9.1	2.0	TruSeq(Transcriptome)	Level A
3	Gulsen1	85214102934	1	774	21	16.25	9.1	2.0	TruSeq(Transcriptome)	Level A
4	Gulsen2	85214102935	1	464	20	9.28	9.3	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A
5	Kutdiken1	85214102936	1	527	21	11.07	9.1	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A
6	Kutdiken2	85214102937	1	588	20	11.76	8.9	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A
7	Alata1	85214102938	1	550	21	11.55	9	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A
8	Alata2	85214102939	1	574	20	11.48	9.3	1.9	TruSeq(Transcriptome)	Level A

Aşağıda çeşitler bazında elde edilen küçük meyvelere ait RNA kalite ve kantite değerleri ayrıntıları verilmiştir.

Uzun Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Meyve)



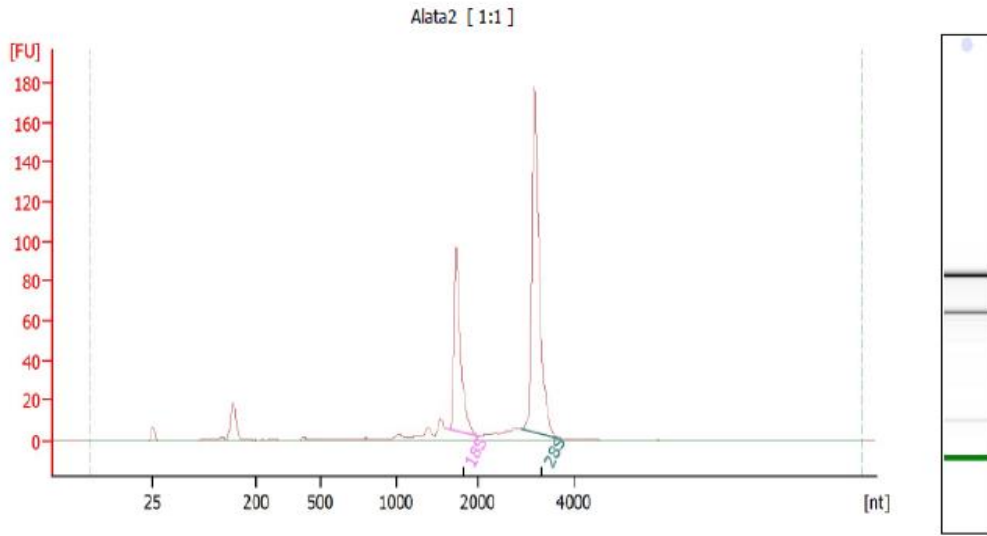
Gülşen Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Meyve)



Overall Results for sample 9 : Gülşen1

RNA Area:	708.7	RNA Integrity Number (RIN):	9.1 (B.02.07)
RNA Concentration:	387 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.0	Result Flagging Label:	RIN: 9.10

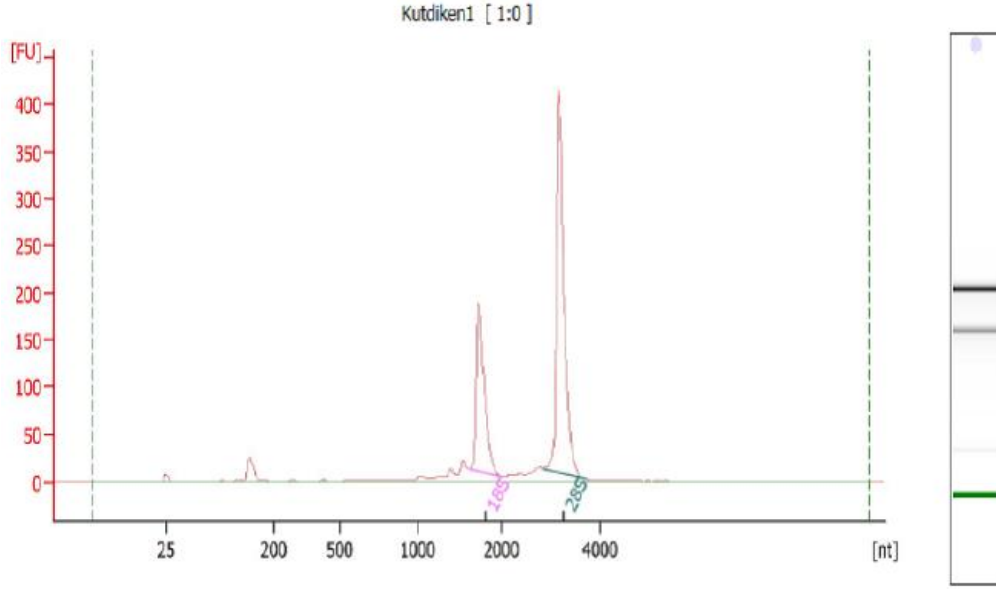
Alata Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Meyve)



Overall Results for sample 3 : Alata2

RNA Area:	477.2	RNA Integrity Number (RIN):	9.3 (B.02.07)
RNA Concentration:	287 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.9	Result Flagging Label:	RIN: 9.30

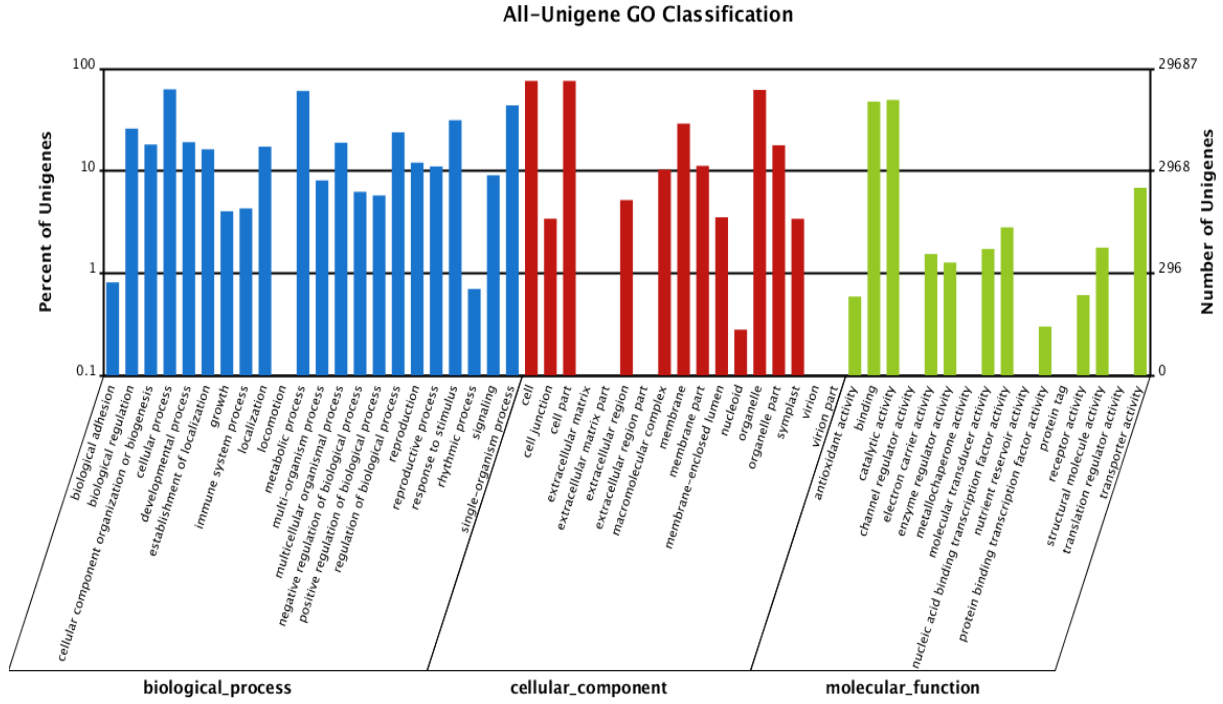
Kütdiken Limon Çeşidi RNA Kalite ve Kantite Değerleri (Meyve)



Overall Results for sample 7 : Kutdiken1

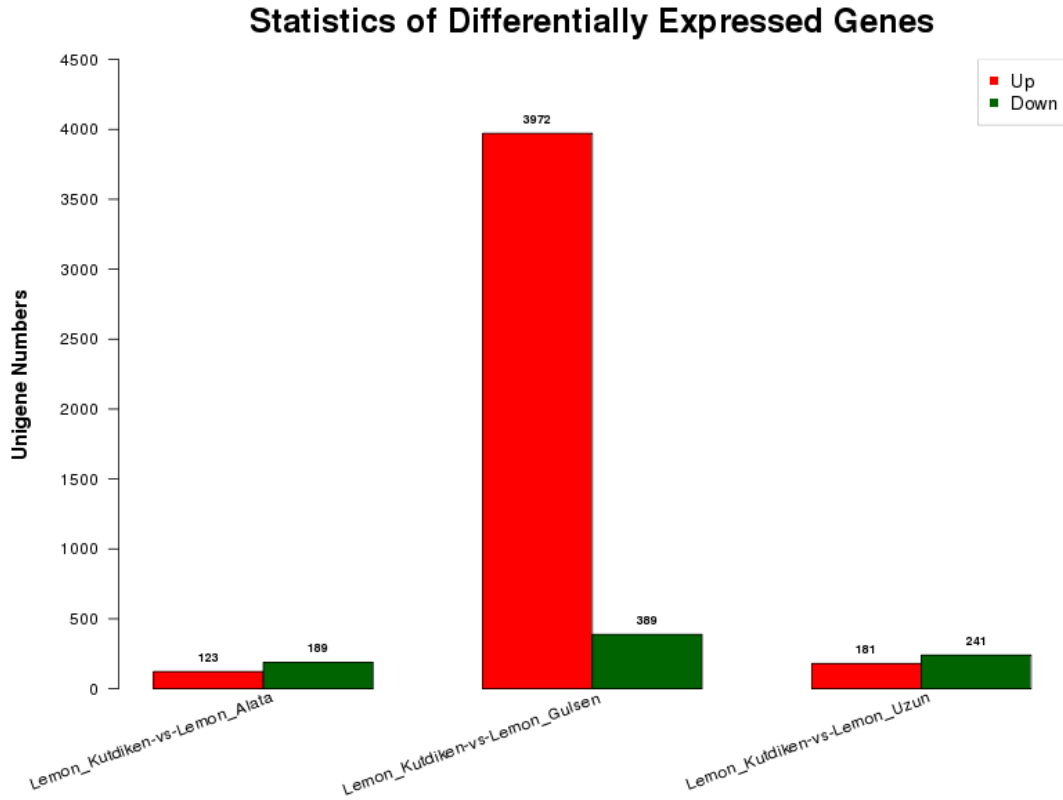
RNA Area:	1,031.1	RNA Integrity Number (RIN):	9.1 (B.02.07)
RNA Concentration:	527 ng/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.9	Result Flagging Label:	RIN: 9.10

RNA örnekleri hizmet alımı kapsamında sekanslama işlemine tabi tutulmuştur. Kutdiken, Alata ve Gülşen örneklerinde yer alan mRNA sekanslarına ilişkin anotasyon çalışmaları gerçekleştirilerek her bir okumanın hangi genlerle ilişkilendirildiği bulunmuştur. Örnekler ikiyeşerli olarak incelendiğinde hem her bir örneğe özgü, hem de her bir örnek çiftinde birden olan sekanslar tespit edilmiştir. Çalışmaya konu olan türe ilişkin tüm genom çalışması henüz literatürde yer almadığından bir referans DNA kullanılamamış, bunun yerine BLAST yaklaşımı ile okumalara benzerlik gösteren genler ile anotasyon gerçekleştirilmiştir. Örnekler incelendiğinde, Alata çeşidinde 42568, Gülşen çeşidinde 57032, Uzun çeşidinde 49823 ve Kütdiken çeşidinde ise 45090 adet unigen tespit edilmiştir. Elde edilen unigenlerin genomdaki görevlerine göre yapılan gruplandırmada, bunların en fazla biyolojik işlemlerde görevli oldukları görülmektedir. Daha sonra genlerin görev aldıkları alanlar sırasıyla, hücre bileşenleri ile ilgili konular ve moleküler fonksiyonlar olarak sıralanmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. Limonda bulunan unigenlerin genomdaki görevlerine göre dağılımları

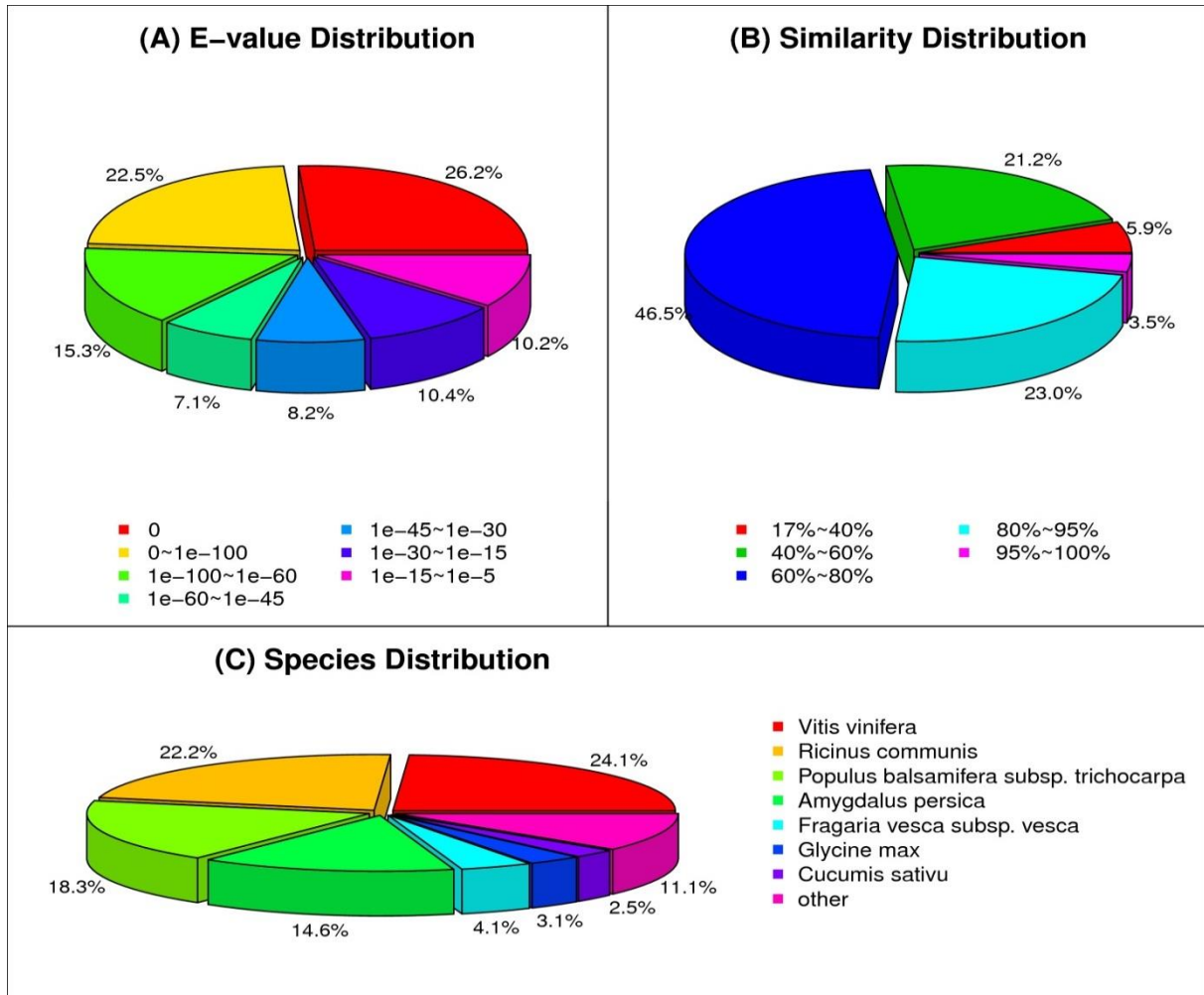
Örnekler arasında farklı düzeylerde regüle olan gen sayıları incelendiğinde Kütdiken ile Gülşen çeşitleri arasında bu konuda çok büyük varyasyon olduğu, Kütdiken ile Alata ve Kütdiken ile Uzun çeşitleri arasında daha az varyasyon olduğu görülmektedir (Şekil 13).



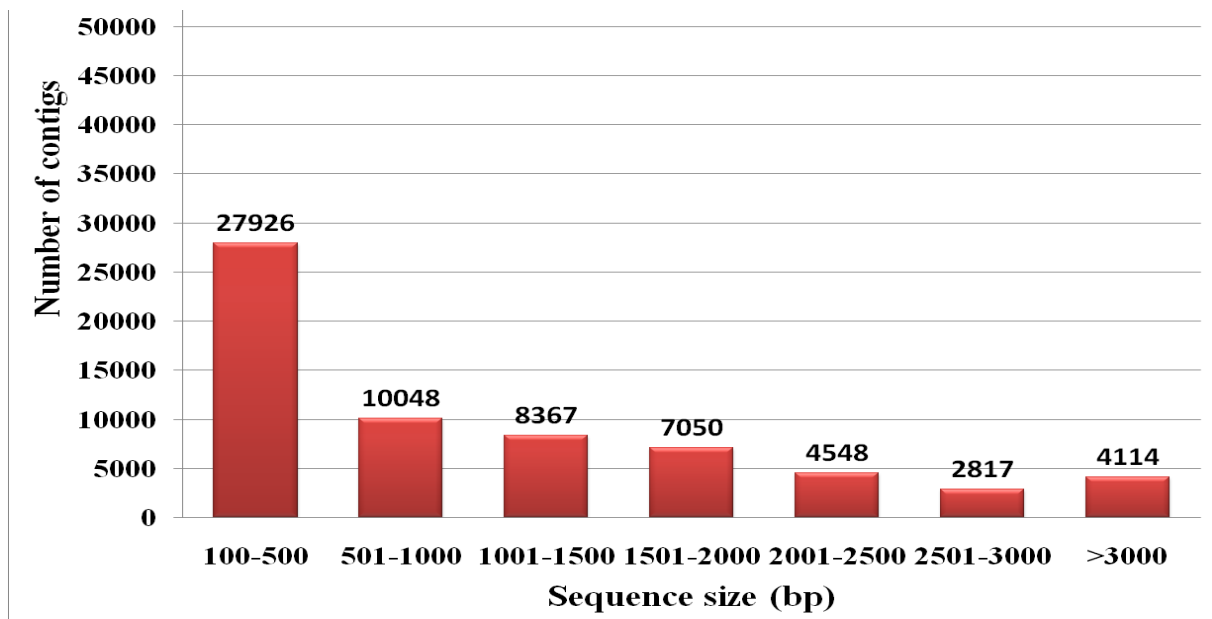
Şekil 13. Küt diken ile çekirdeksiz limon çeşitleri arasında farklı düzeylerde ifade edilen gen sayıları

Limonda elde edilen genlerin birbirleri ile benzerlik düzeyleri incelendiğinde, genlerin % 46.5'inin % 60-80 düzeyinde, % 23'ünün % 80-95 düzeyinde, %21,2'sinin % 40-60 düzeyinde, % 5.9'unun % 17-40 düzeyinde benzer motifleri taşıdığı ortaya konulmuştur. Bunun yanında limondaki genlerin diğer türlerle karşılaştırılmasında, genlerin asma, kavak ve *Ricinus communis* türleri ile daha fazla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 14).

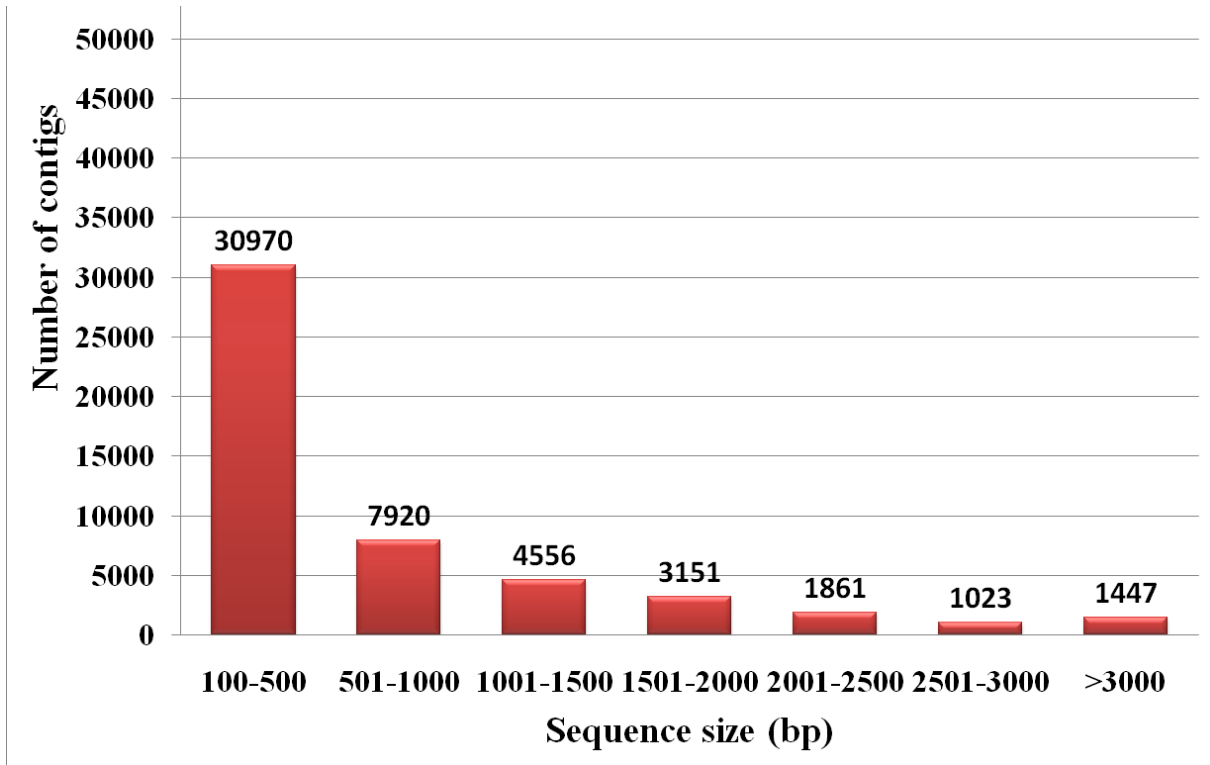
Limon çeşitlerinde belirlenen genlerin uzunluk dağılımı Şekil 15-18'de verilmiştir. Buna göre tüm çeşitlerde en fazla gen sayısı 100-500 bp uzunluğunda saptanmıştır. Bunu 500-1000 bp uzunluğundaki gen sayısı takip etmiştir. 2500-3000 bp uzunluğundaki genlerin sayısı ise bütün çeşitlerde en az sayıda bulunmuştur.



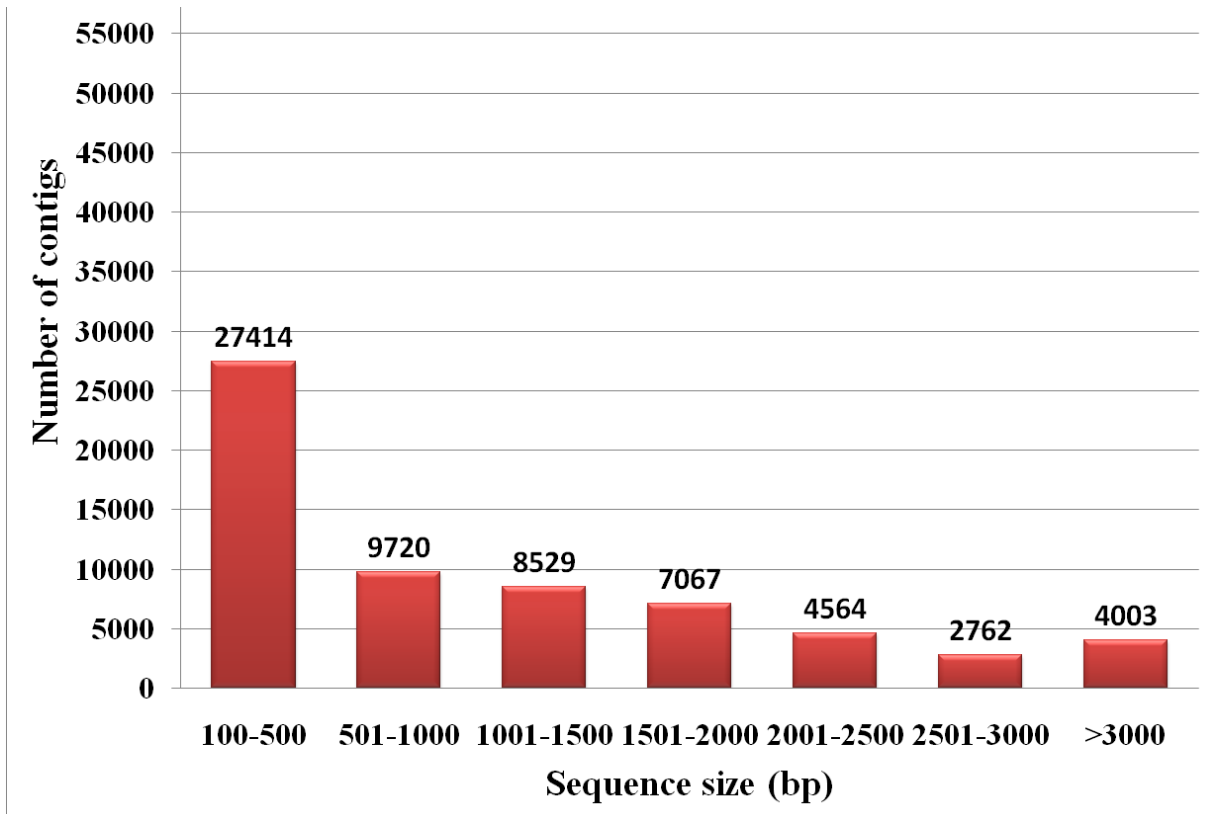
Şekil 14. Limonda elde edilen genlerin birbirleri ile benzerlik durumları ve diğer türlerdeki genlerle benzeyen gen oranları



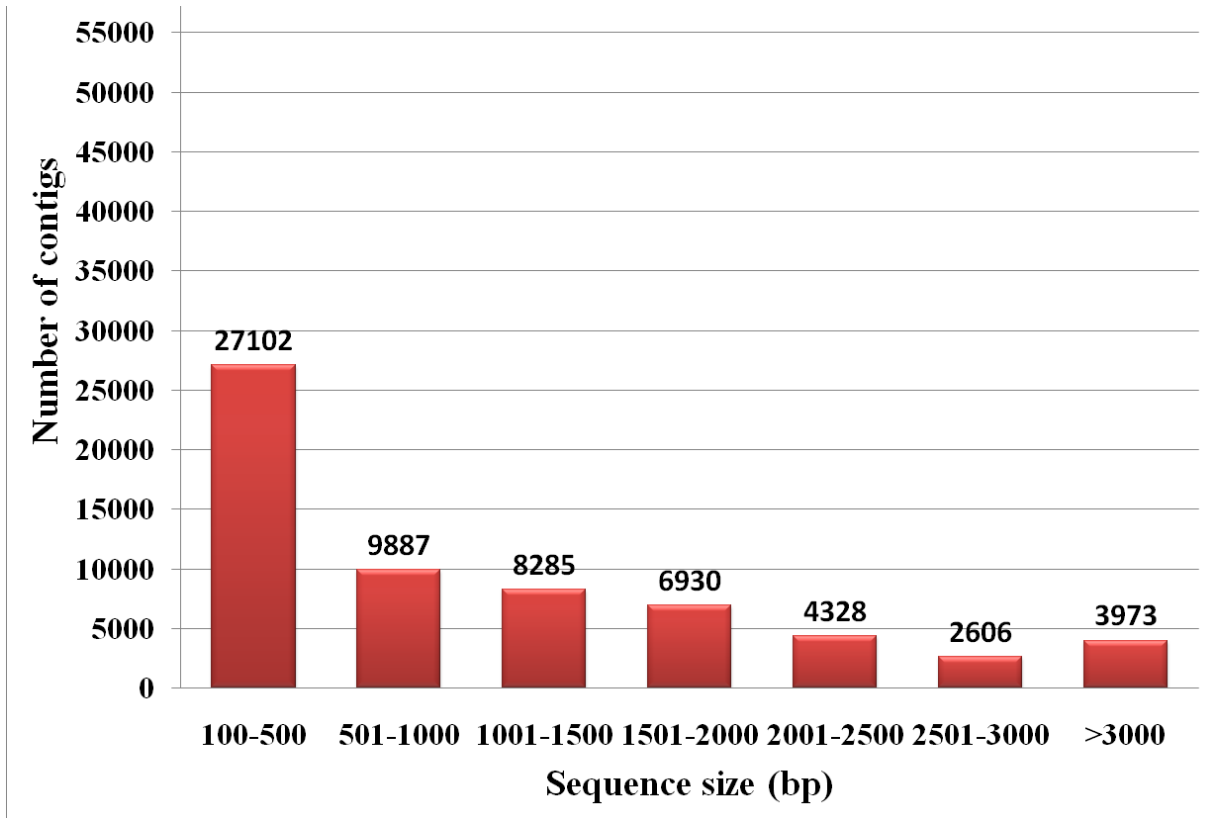
Şekil 15. Kütüden limon çeşidinde gen uzunluklarının dağılımı



Şekil 16. Gülşen limon çeşidinde gen uzunluklarının dağılımı

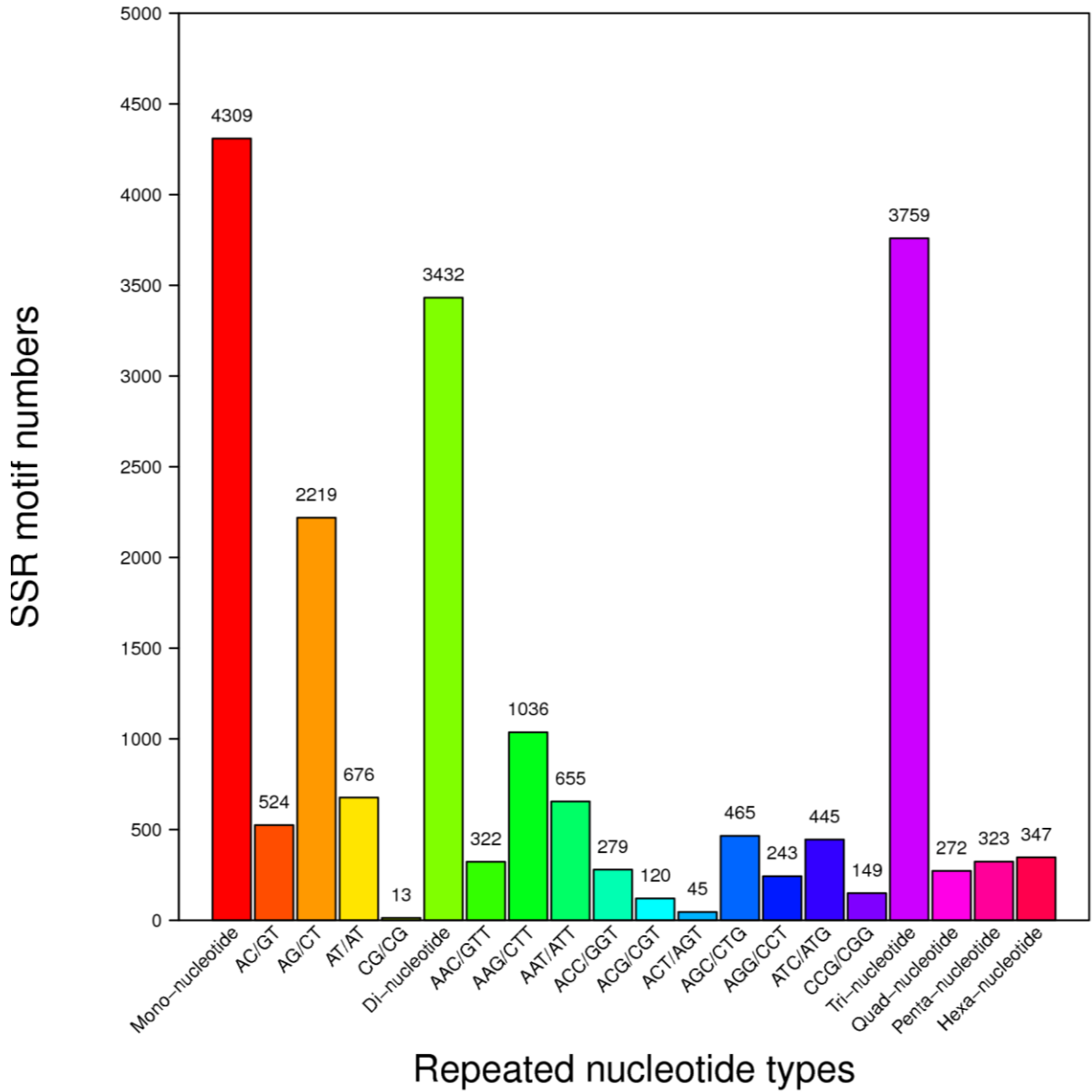


Şekil 17. Alata limon çeşidinde gen uzunluklarının dağılımı



Şekil 18. Uzun limon çeşidinde gen uzunluklarının dağılımı

Limon çeşitlerinde yapılan RNA sekanslama işlemleri sonucunda toplam 12442 adet SSR motifi tespit edilmiştir. Bu motiflerin 4309 tanesi tek baz tekrarı, 3432 tanesi çift baz tekrarı, 3759 tanesi üçlü baz tekrarı, 272 tanesi dördü baz tekrarı, 323 tanesi beşli ve 347 tanesi ise altılı baz tekrarı şeklindedir (Şekil 19).



Şekil 19. Limonda bulunan SSR motifleri ve bunlarda tekrarlanan baz sayılarının dağılımı

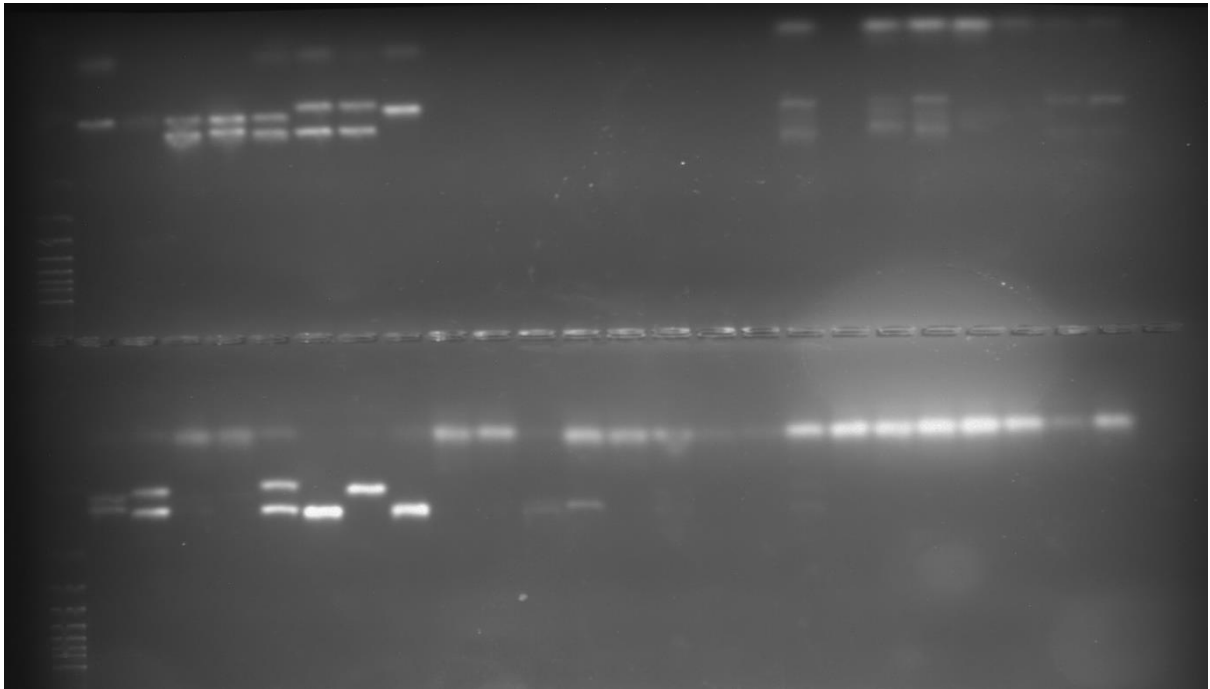
Elde edilen SSR motifleri kullanılarak yapılan çalışmalarda çok sayıda yeni SSR primeri elde edilmiştir. Bunlar arasında tekrar dizi sayısı fazla olan 53 tanesi belirlenerek primer dizileme işlemleri yapılmıştır (Tablo 2). Bu primerlerle limon başta olmak üzere farklı turuncğil türlerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Tür ve çeşitlerin ayırımında başarılı bulunanlar belirlenerek turuncğillerde genetik çalışmalara uygun yeni SSR primerleri bilimsel literatüre kazandırılmış olacaktır. Gen bankalarında yaptığımız incelemelerde turuncğillerde geliştirilen SSR primelerinin çoğunlukla portakal ve mandarin türlerinde geliştirildikleri saptanmıştır. Çalışmamızda başarılı sonuçlar elde edilecek SSR primerleri limondan geliştirildikleri için bu konuda özgün olacaklardır.

Tablo 2. Çalışmada elde edilen ve dizilimi yapılan SSR primerleri, tekrar motifleri, sekans bilgileri ve bunların annealing sıcaklıkları

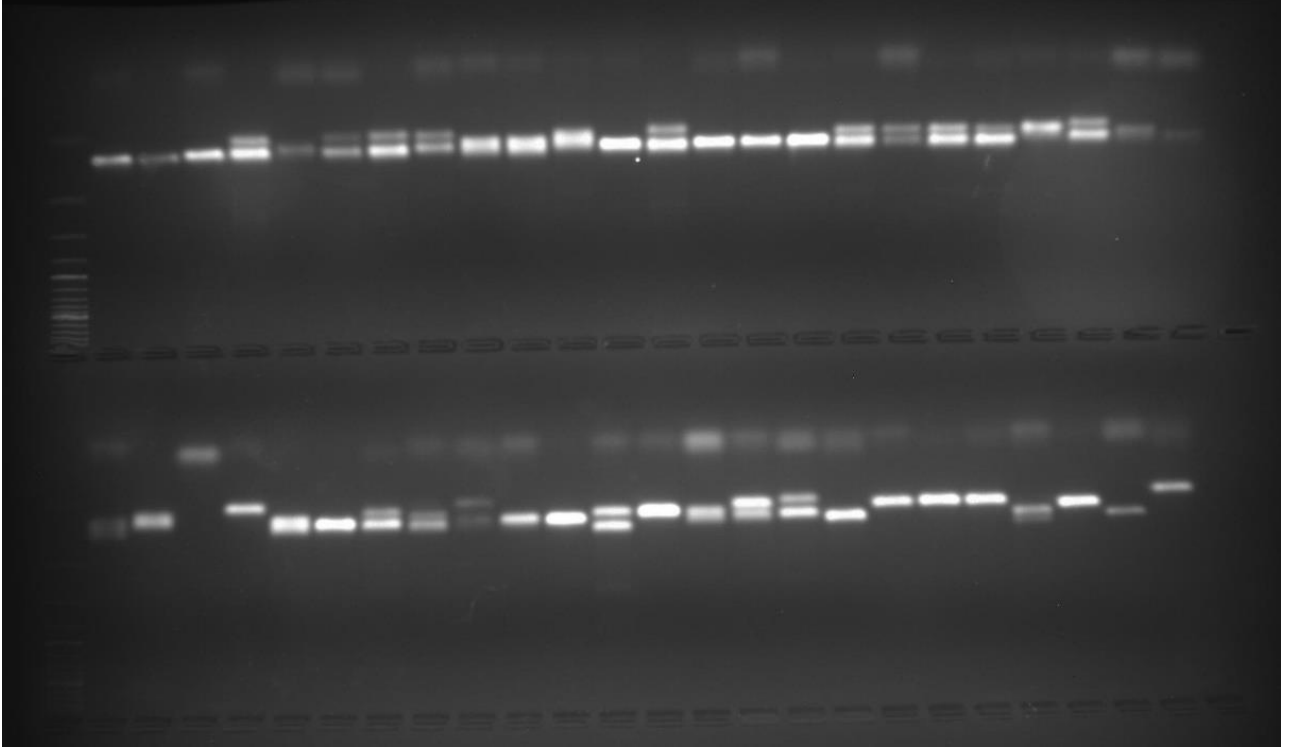
No	Tekrar Dizisi	Baz Sayısı	İleri Primer	Geri Primer	Annealing Sıc. (°C)
1	A(1*22)	22	AATTCCTTCAGCTTTTTACCTGG	CGAAAGAAGACGAATTGAGAGAG	60
2	AAC(3*8)	24	CTTTCGCTGATTCTTGGCTATCT	GGTTGTCACATGATGAACACATT	61
3	AAG(3*7)	21	TTTCAGGTGAAAAAGAAAAGGCT	CTTTTGCAACGACTCTCTCATTT	61
4	AAT(3*8)	24	TAACAGCTGGTTGTGTAAATGGC	TCTGACCGCTACCATTCTTACTC	61
5	AATT(4*6)	24	TGGATGCACAATAACAAGAACAG	CGGCCATATACATATGTGAGCTA	60
6	AC(2*11)	22	GGAAGCTTTGAGCCTTTGATACT	TCCCAGATCCTATGTCTTCATA	60
7	ACA(3*8)	24	TATCATCTCCACCTTACCTGGTG	CTTTTGAAAGATTAGATGCGGAA	60
8	AG(2*11)	22	CACCAAGAACCTATGGTGAAGTG	ATAACTCGCTCCACAACCTCAGTC	61
9	AGA(3*7)	21	CAGTACCAGTAGTAGCAGCAGCA	AGAGAGAAACACTCCCCATTTTC	60
10	AGC(3*7)	21	GAGCAATTGATGGTTCTGAATCT	GATCAGGAACAAGTTGATGGTGT	60
11	AGG(3*7)	21	AGCATGATTTTGATTTTGGCTAC	ACCATCGAAGACTCCGTCAC	60
12	AT(2*10)	20	TGCTTATGAGTCAGAAATTCAGC	TAACCAGGAACCAGTAATGGAGA	59
13	ATC(3*7)	21	GATTCCACCAACAGAGAAAGAGA	TGAAGAAATGAAAAGCCATTGTT	60
14	ATG(3*8)	24	CGAAAAGGGTGTGAGCATTATTA	CGTATGAGGAGGAGGGTTGTAG	60
15	ATT(3*8)	24	GCGCTGTATGGCCTTTTATTTAT	ACAGCTGGTTGTGTAAATGGC	61
16	CAG(3*9)	27	AAACCAACACAAGAAGACGAAGA	ATCTTCTTATTTCCGGCAGAATCC	60
17	CAT(3*8)	24	AAAACGATCAGTATGCTTTTATGC	CCAAACAAGTAAACTATCACGTCAG	59
18	CCG(3*7)	21	TAGAATGAGAAGAGCGGAGAAAA	ACAATCAAACAAACAAAGCCACT	60
19	CCT(3*7)	21	AGCTCTCTTTCCTATGGACGTTT	TTCTTCCACTCCTCTCTTCATCA	60
20	CGG(3*8)	24	CCTCCGAGATCAGTCAACACTAC	ACCAATCTTCCCACTTTTCAACT	60
21	CGT(3*8)	24	GACATGTAAATATTCATGCCCTCA	GTGAAATTCAATTGTCAGCATCAC	60
22	CT(2*9)	18	GAGATTCTGACTTCTGATTGCGT	AACTGAAGAACTCAAATGAGCG	60
23	CTC(3*7)	21	GAGTAATTTTCATCGAAACTCGGA	GTTTGGAAGAGTGAGGGATTTTC	60
24	CTT(3*8)	24	CACATCCTCTTCGTTATCCTCAG	ATTTGAATGGAGTCAGTGGTGTT	60
25	GA(2*10)	20	ACCTTTCAGATTAGTGCGATGAA	TTTAATTAATCCGAGCATCTTGC	60
26	GAA(3*8)	24	TACGGCAGCAATTAACACCTAGA	TGCTTTCTCTGTTTCTTTAGGCA	60
27	GAG(3*7)	21	CTGTCAATAATCTCCCTCGTTTG	GTCTGTTTTTGTTGTTTTTGGC	60
28	GAT(3*7)	21	TCAAATCTAGTTCGATAGACGGC	TACTCTCCTCCGATTTCCCTAAC	60
29	GCA(3*7)	21	AGTACTCAACCAACTGCCAACAT	GAAGGAATATTTGTTGTTGTGGC	60
30	GCC(3*7)	21	TATCTCAATATCCATGGGAGGAA	AAATCCGTGAATCTCCATTTTCT	60
31	GCG(3*7)	21	TGAAGGGGGAAGGGTAGAAG	TCACATACTCCCGCCTTATCTC	60
32	GGA(3*8)	24	TACCCGTATTCAAGACTGCAAAT	AACAAAACACAAAGAAAGCATCC	60
33	GGC(3*7)	21	ACAATCAAACAAACAAAGCCACT	TAGAATGAGAAGAGCGGAGAAAA	60
34	GT(2*11)	22	GAGTACTGCTTGTGGTTCCAGAC	ATGAGACGGCAGTTAAAGACTTG	60
35	GTAG(4*6)	24	GGCTACAAGTATACCCTCATGACTC	TGGAACAAATAACAAGAGGCAGT	59
36	GTC(3*8)	24	TTGCTTTTATGTGGGTGGTTTAT	AACTTGCTTAGGCTGTCCGTGT	60
37	GTG(3*7)	21	TGGAACACCTTGACCTATATGCT	ATATGCAAATGGTGCTGCTTC	60
38	GTT(3*7)	21	ACTACCTCTACGACCAAACTCGG	AACTCAAATACCTAGGGCTTCCC	61
39	TA(2*11)	22	ATAAAAATTGGGGAAGAAAAGGG	CTATATGCCTTACAAGCTTTGGC	61

40	TAC(3*7)	21	TGATCCTCTGCATGGTTCTAAGT	CAAAAAGCTCCAAATCCAATATG	60
41	TAG(3*7)	21	ACGGTGTGTTACTGGTGGTATT	CACTATGAGATGTTGATGATGCC	60
42	TAT(3*8)	24	GGGAAGAACAAGTTGATGAAAAA	TCGCAAATCCATAGAGAAGAAGA	60
43	TATG(4*5)	20	TATTTGGGAGAATGAAAAGTTGC	CTTCTTCCATCTCAAACCTCCTT	60
44	TC(2*11)	22	GAGGGGGAAATTGTGAATTAAAC	ACAGGACTACAGGGGAGAAAAAG	60
45	TCG(3*8)	24	AGGTATTCGGTTCCTAGATCCTC	AAGAAGATGATGACGAGGATGAC	59
46	TCT(3*7)	21	AACTTTGTGGCAAGATGAAAAG	CCGCATCAAAAAGTCAGAATATC	60
47	TCT(3*8)	24	CTCTCCTTCTCTGCTTCCTTTT	GAAGAAGAGTCAGAAGTGCCAAG	60
48	TG(2*11)	22	ATGGAAACAAGTGCCCTAGATG	TCCATGAAACGAAGATGATAACC	59
49	TGC(3*8)	24	AAGCCTCGACCCATTGATTATTA	GAGGATCATCTGCTGAGGTTG	61
50	TGT(3*8)	24	AAGCGTTTCAGTGATGGAGTAAG	TTTCGCTGATTCTTGGCTATCT	60
51	TTA(3*7)	21	GTTTTATAGCTATGGCCTCTGGG	ATGATGTGGATCAACGGTTCCT	60
52	TTC(3*7)	21	CTGCTCCCTTCATCATCTTCTAA	CCTCAACACACAAAACATTTTCA	60
53	TTG(3*7)	21	GAGTGAGAACGATTGATGAGGTT	CAAACCAAACATCACGTGTAAAA	60

Dizinen 53 adet SSR primeri limonla birlikte diğr turunçgil türleri ile çalışarak polimorfizm gösterenler belirlenmiştir (Şekil 20). Polimorfik olanlar daha sonra turunçgil ve akraba türlerle çalışılmış olup, bu materyallerin ayırt edilmesinde başarılı oldukları tespit edilmiştir (Şekil 21). Bu primerler turunçgillerde genetik çeşitlilik, genetik haritalama ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılabilecektir.



Şekil 20. Çalışmada RNA sekanslama işlemleri sonucu geliştirilen SSR primerlerinin turunçgillerde denenmesi ve elde edilen polimorfizm



Şekil 21. Çalışmada RNA sekanslama işlemleri sonucu geliştirilen 8 nolu SSR primeri ile turunçgil ve akraba gruplarda elde edilen jel görüntüsü

Protein Çalışmaları

Çalışmanın protein bölümünde, radyasyon uygulanması sonucu elde edilmiş olan üç adet çekirdeksiz limon çeşidinin (Alata, Uzun, Gülşen) çekirdekli kontrol (Kütdiken) çeşidi ile karşılaştırılarak çekirdeksizliğe neden olan protein/proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bazı çevresel faktörler dışında tohum protein içeriği genellikle genetik olarak kontrol edilmektedir (Bolon ve ark., 2010). Araştırmada kullanılan çeşitlerin aynı çevresel şartlar altında yetiştirilmiş olması proteomik varyasyonların genetik kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır (Islam ve ark. 2012). Bu nedenle çekirdeksiz limon çeşitlerindeki peptit farklılıklarının önemli ölçüde mutasyon kaynaklı olduğu görülmektedir. Bununla ilgili olarak Gulsen ve ark. (2007) çekirdeksiz limon geliştirilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada 7 krad cobalt (^{60}Co) gamma radyasyonu uygulayarak oluşan muhtemel mutasyonlar sonucunda ağaç morfolojisinde değişik gözlediklerini belirtmişlerdir. Meyve proteinlerinin 2D gel elektroforezi temelli ve mass spektrometrik peptit dizilemesi ile birlikte yapılan proteomik analizlerin çeşitler arasındaki varyasyonu ortaya koyması bakımında güçlü bir çalışma olduğu görülmüştür. Delta2D DECODON programı kullanılarak yaklaşık 400-425 spotun 2DGE analizi, çeşitler arasındaki genel protein örneklerinin benzer olduğunu ortaya koymuştur.

K, G, U ve A limon çeşitlerinin bütün haldeki meyvelerinin ezilerek ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmesinin ardından elde edilen proteinlerin 2-D analizi sonucunda çeşitlerde 5-150 kDa ve pH 3.0-10.0 arasında değişen yaklaşık 400-425 farklı protein spotu gözlenmiştir (Tablo 3). Çeşitlerin 2D jel protein profili genel olarak 5 spesifik noktada lokalize olmuştur (Şekil 22). G çeşidinde spot-1, 3, 4, 5 ve 6; A çeşidinde spot 1, 2, 3, 4 ve 6; U çeşidinde de spot 5 ve 6'nın görülmediği fakat bu spotların çekirdekli K çeşidinde görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 23).

Ayrıca çeşitler ikili olarak birbiriyle kıyaslanmış ve çekirdekli-çekirdeksiz çeşitler arasında spot farklılıkları saptanmıştır. Kütdiken ve Alata çeşitleri karşılaştırıldığında; Şekil 24-a'da görüldüğü üzere işaretlenmiş olan 4 adet spot sadece Kütdiken çeşidinde bulunurken (kırmızı renkli) Alata çeşidinde bulunmamaktadır. Şekildeki görüntü jelin tamamı olmayıp daha net olması için sadece farklı spotların olduğu bölüm büyütülerek verilmiştir. Kütdiken ve Gülşen çeşitleri karşılaştırıldığında; Şekil 24-b'de görüldüğü üzere işaretlenmiş olan 4 adet spot sadece Kütdiken çeşidinde bulunurken (kırmızı renkli) Gülşen çeşidinde bulunmamaktadır. Ancak bu spotlardan sarı renkle işaretlenen Alata çeşidinde olan spottan farklıdır. Kütdiken ve Uzun çeşitleri karşılaştırıldığında; Şekil 24-c'de görüldüğü üzere işaretlenmiş olan 1 adet spot sadece Kütdiken çeşidinde bulunurken (kırmızı renkli) Uzun çeşidinde bulunmamaktadır. Bu spot aynı zamanda Kütdiken'de olan ama Gülşen çeşidinde olmayan spottur. Belirlenen bu spotların çeşitlerin ayırt edilmesinde kullanılabilecek niteliktedir.

Çeşitlerdeki bu spot farklılıklarının yanında hepsinde ifade edilen bazı spotların (7, 8, 9, 10 ve 11'inci spotlar) ifade düzeylerinin farklılığı belirgin şekilde görülmekte olup, bu spotların LC-MS/MS analizi sonucunda peptit farklılıklarının olduğu da görülmüştür. Bu farklılıklar özellikle aşağı doğru gen ifadesi düzenlemesi şeklinde olmakla birlikte bazı proteinlerde de yukarı yönlü düzenleme şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 23, 25). Sonuçlar proteomik düzeydeki kimyasallar kullanılarak yapılan tekerrürlerle teyit edilmiştir. DECODON programıyla yapılan istatistik çalışmalarında çok sayıda protein spotunda quantite farklılıklarının belirgin şekilde ortaya çıktığı görülmektedir (Tablo 4). Örneğin 7'nci protein spotunun U ve K'daki ifade seviyesi A ve G'dekine göre belirgin şekilde fazla olmuştur. Çeşitler arasındaki protein spot farklılıklarının çoğunluğu 4-7aralığındaki izoelektrik noktada ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerde görülmüştür (Şekil 22). Yapılan incelemelerde çeşitlerin relatif hacimce yüzde oranlarının belirli bir alanda dağılım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 26).

Tablo 3. Çeşitlerin Delta 2D DECODON analiz raporu.

Group 1 (1 image)**Alata**

1392 x 1040 pixels / No calibration

425 spots detected using algorithm 20060419 with parameters Local Background Region = 43, Average Spot Size = 14, Weak Spot Sensitivity = 20.0, Use Spot Models = true.

1426 cancelled spots.

1 label

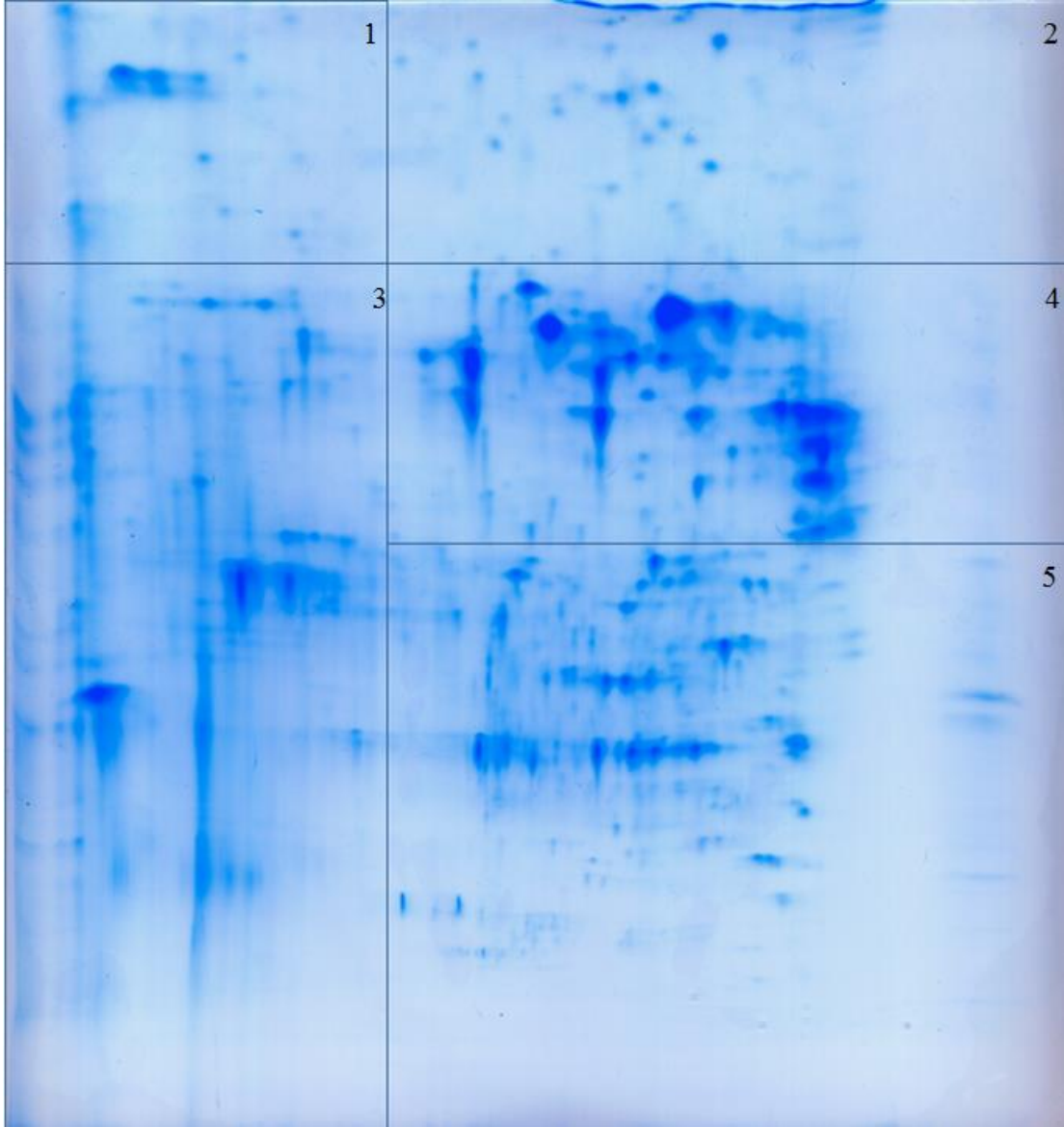
Group 2 (1 image)**Kütdiken**

1392 x 1040 pixels / No calibration

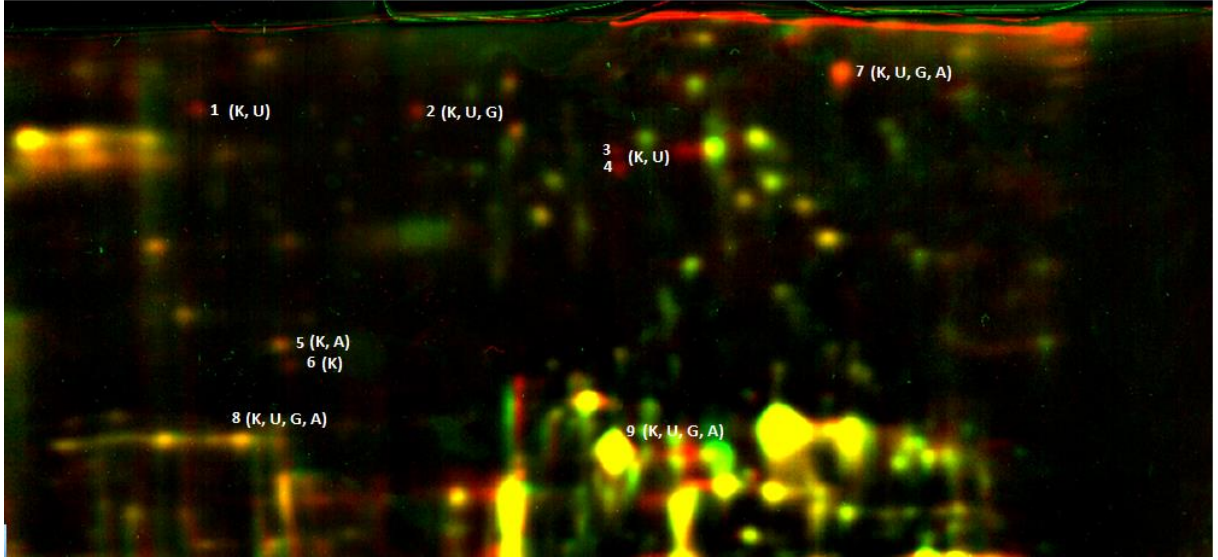
408 spots detected using algorithm 20060419 with parameters Local Background Region = 43, Average Spot Size = 14, Weak Spot Sensitivity = 20.0, Use Spot Models = true.

1519 cancelled spots.

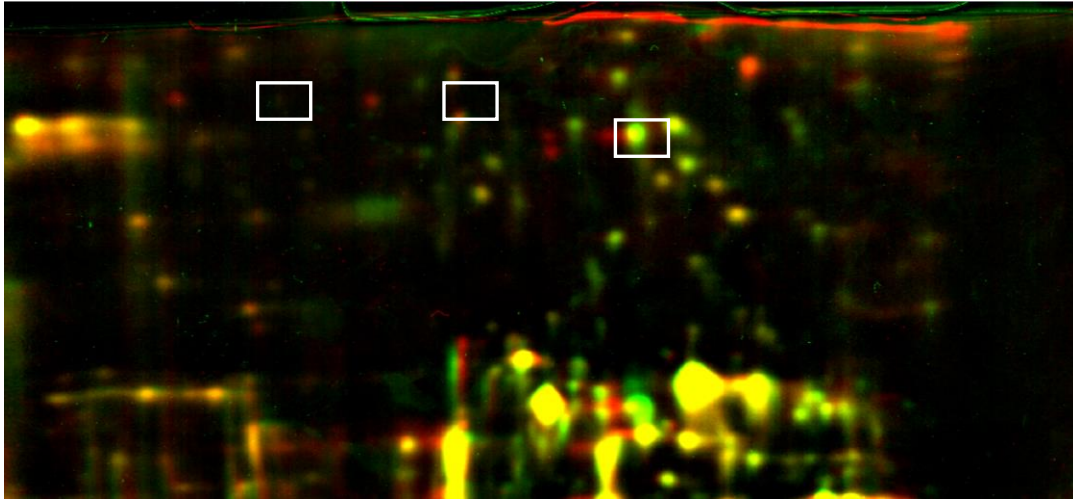
5 labels



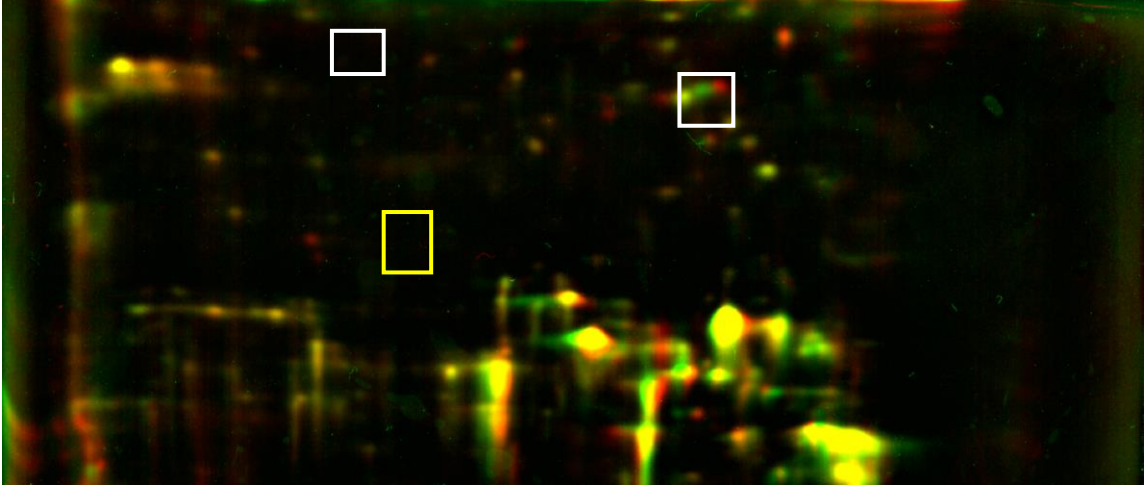
Şekil 22. Proteinlerin izoelektrik nokta ve moleküler ağırlıklarına göre lokalizasyonu



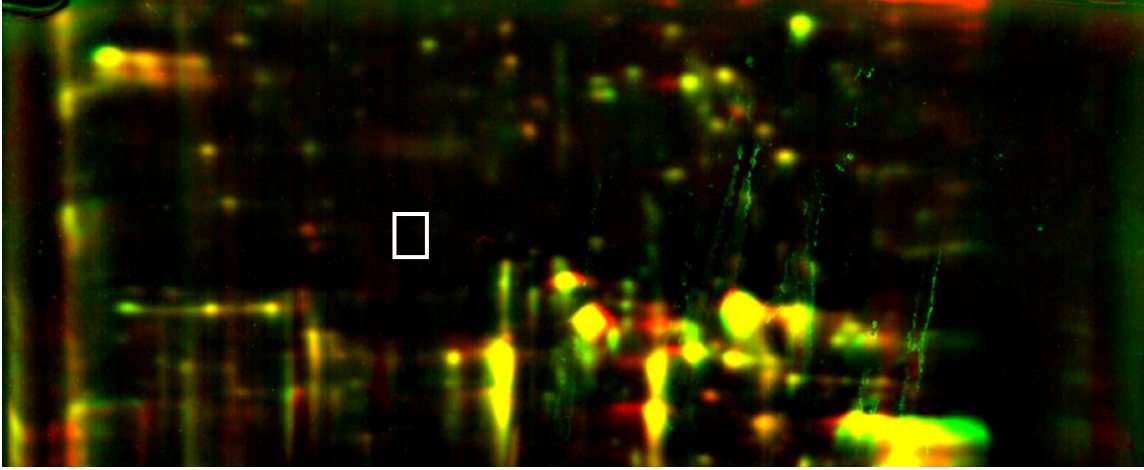
Şekil 23. Kütdiken, Alata, Gülşen ve Uzun çeşitlerinde 2DGE protein spotlarının karşılaştırılması. Spot 1, 3, 4 K ve U'da; Spot 2 K, U ve G'de; Spot 5 K ve A'da; Spot 6 K'da; Spot 7,8,9 K, U, G, A çeşitlerinde ifade edilmiştir.



Şekil 24-a. Kütdiken ve Alata çeşitleri protein spotları karşılaştırılması. İşaretli spotlar sadece Kütdiken çeşidinde bulunmaktadır.



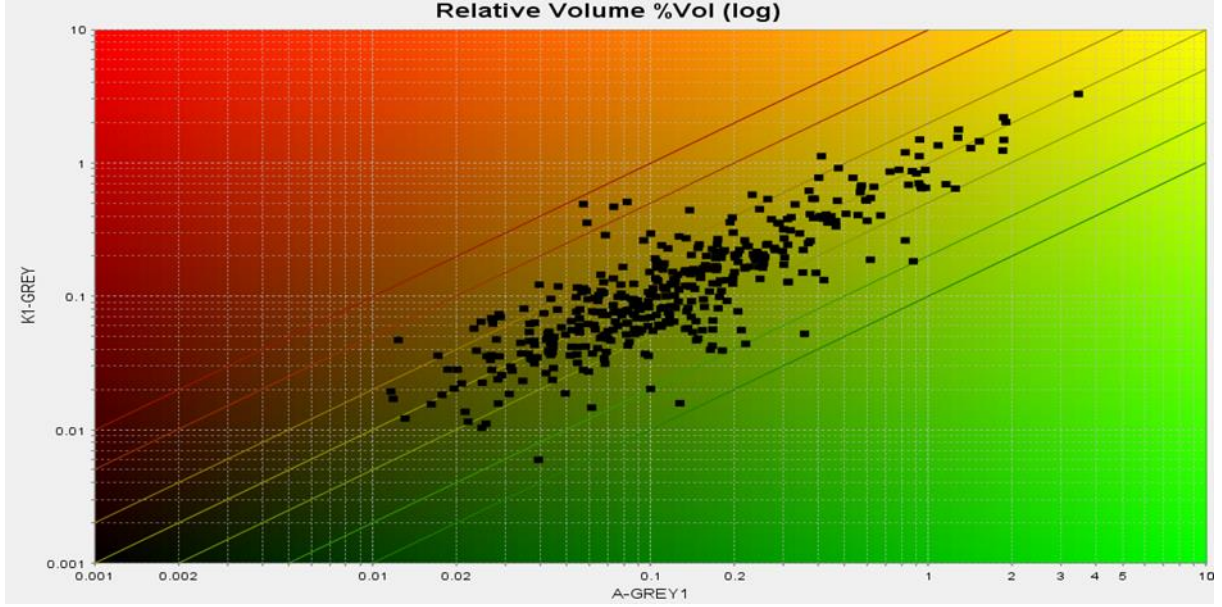
Şekil 24-b Kütiken ve Gülşen çeşitleri protein spotları karşılaştırılması. İşaretli spotlar sadece Kütiken çeşidinde bulunmaktadır.



Şekil 24-c. Kütiken ve Uzun çeşitleri protein spotları karşılaştırılması. İşaretli spot sadece Kütiken çeşidinde bulunmaktadır.



Şekil 25. Kütiken çeşidi 2D jel görüntüsü



Şekil: 26. Çeşitlerdeki spotların yüzde oranlarına göre dağılımı

Çeşitler arasındaki protein ifadesi seviyelerinde farklılıkları belirgin şekilde görülmektedir. Çeşitler kendi aralarında ve kontrol ile kıyaslandığında spot farklılıklarının olduğu görülmüş ve bu spotlar analiz edilmiştir. Belirtilen spotlar kesilerek proteinleri saflaştırılıp Eksigent ekspert™ nano LC 400 system ile analiz edilmiş ve bilinen veri tabanında ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) programı ile kıyaslanmıştır.

Çekirdekli limon K çeşidi ve çekirdeksiz G çeşidindeki spotların LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen “TTIIGVTYNGGVVLGADSR”, “SGSAADSQTVSDYVR” peptitlerinin %99 oranında, “TVTINSEGVSR” nin ise %96.5 oranında tr|A0A067F2B5|A0A067F2B5_CITSI accession numarası ile: Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN= CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çeşitlerde diğer peptitlerdeki benzerlik oranının düşük veya hiç olmadığı görülmüştür. Yeşil renk ile belirtilenler büyük benzerlik oranını, kırmızı renktekiler düşük benzerlik oranını, gri renktekiler ise ya çok düşük benzerlik oranı yada benzerlik olmadığını belirtmektedir (Şekil 6-8). Bu sonuçlara göre “TTIIGVTYNGGVVLGADSR” peptidinin K, G ve A çeşitlerinin üçünde de bulunması nedeni ile birbirinden ayırt etmek için kullanılabilmesi zor görünmektedir. Diğer taraftan “SGSAADSQTVSDYVR” peptidinin çekirdekli çeşitte bulunmayıp (veya çok düşük benzerlik göstermesi) G ve A’da bulunması bu peptitlerin G ve A çeşitlerini K’dan ayırdedebilecek bir markır olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Ayrıca “TVTINSEGVSR” peptidi sadece G çeşidinde veritabanı ile yüksek benzerlik göstermiş olup bu çeşidi diğerlerinden ayırt etmek için markır olarak kullanılabilir. Fakat

tüm bunlara rağmen, bu benzerlikler *Citrus limon* bitkisine ait veritabanı (full sekans) bulunmaması nedeniyle portakal (*Citrus sinensis*) veritabanı ile karşılaştırılmış olduğu için *Citrus limon*'a ait veri tabanının sonraki yıllarda literatüre eklenmesiyle daha fazla peptit benzerlik veya farklılıklarının ortaya çıkması muhtemel görünmektedir.

Yukarıda belirtilen peptitlerin dışında kontrolde olup ta diğer çeşitlerde bulunmayan ve benzerlik oranı %90'ın altında çok sayıda peptit belirlenmiş olmasına rağmen *Citrus sinensis* ile coverage oranının düşük olması nedeniyle bu aşamada markır belirlemek için önerilmesinin yeterli olmayacağı düşünülmektedir. Bu peptitlerden bazıları aşağıda belirtildiği gibi olup veri tabanı ile kıyaslama sonuçlarına ait detaylar EK-1-3'te verilmiştir.

Gülşen çeşidinde görülen farklı peptitler ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

ECACVIELPDLK (tr|A0A067F2B5|A0A067F2B5_CITSI Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN= CISIN_ 1g030119mg PE=3 SV=1); **NISVVAGIEAR** (tr|A0A067F2B5| A0A067F2B5_CITSI Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g030119mg PE=3 SV=1); **AEDFFFSGLGKPGNTANR** (tr|A0A067CZF3|A0A067CZF3_CITSI Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g027381mg PE=4 SV=1); **FSKSSADDLK** (RRRRRtr|A0A067H1F3|A0A067H1F3_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g013578mg PE=4 SV=1); **GVEVPLSILGAEIDR** (tr|A0A067G5J2| A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1); **EYQLASEGVDQAR** (tr|A0A067FQ90|A0A067FQ90_CITSI Uncharacterized protein OS= *Citrus sinensis* GN=CISIN_1g027111mg PE=4 SV=1); **PDQAKVDASAMQQP** (tr|A0A067H1T8| A0A067H1T8_CITSI REVERSED Uncharacterized protein (Fragment) OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1); **ELDLVPTVPQLSLAR** (tr|A0A067FZH5| A0A067FZH5_ CITSI Ferritin (Fragment) OS= Citrus sinensis GN=CISIN_1g0217032mg PE=3 SV=1); **GPVRMPTK** (tr|A0A067FGY6|A0A067FGY6_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS= Citrus sinensis GN=CISIN_1g0334821mg PE=3 SV=1); **ALIVDDL VATGGTLSAAIR** (tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1); **KGGINAPTK** (tr|A0A067G023|A0A067G023_CITSI Uncharacterized protein OS=*Citrus sinensis* GN=CISIN_1g034703mg PE=4 SV=1); **VAGVQSLWQERR**

(tr|A0A067G2Y2|A0A067G2Y2_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g018850mg PE=4 SV=1); **KAEMENSK** (tr|A0A067H6A6|A0A067H6A6_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012310mg PE=4 SV=1); **NISVVAGIEAR** (tr|A0A067H1T8|A0A067H1T8_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1); **ISYSVGDFEFTR** (tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1).

Alata çeşidinde görülen farklı peptitler ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

RLSNKPITLR (tr|A0A067EL98|A0A067EL98_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017474mg PE=4 SV=1); **QYEDMKIQIESATEK** (tr|A0A067EVL6|A0A067EVL6_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g006553mg PE=4 SV=1); **SVPAVATTTR** (tr|A0A067D0F0|A0A067D0F0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g042950mg PE=4 SV=1); **LGTVLDGIPRER** tr|A0A067H1D8|A0A067H1D8_CITSI REVERSED 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010070mg PE=3 SV=1; **GSASLWLCYDKSGR** (tr|A0A067DBS4|A0A067DBS4_CITSI REVERSED Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g047027mg PE=4 SV=1); **LGGGAGDCGGVDSSR** (tr|A0A067GBD0|A0A067GBD0_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g038337mg PE=4 SV=1); **GAPPAAVSSVNSLPR** (tr|A0A067FDM4|A0A067FDM4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009095mg PE=4 SV=1); **AAALTASQLATYDESKR** (tr|A0A067H8T8|A0A067H8T8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g036113mg PE=3 SV=1); **IVWLPIVDR** (tr|A0A067ETJ7|A0A067ETJ7_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g044391mg PE=4 SV=1); **VAGAAENLVAAGSK** (tr|A0A067GWM2|A0A067GWM2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g032043mg PE=4 SV=1); **MDNFLRLSEEINGTR** (tr|A0A067EL39|A0A067EL39_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016395mg PE=4 SV=1); **MDNFLRLSEEINGTR** (tr|A0A067EL39|A0A067EL39_CITSI REVERSED

Uncharacterized protein OS= Citrus sinensis GN=CISIN_1g016395mg PE=4 SV=1); **LVDCIPMLLPK** (tr|A0A067FIN8|A0A067FIN8_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004202mg PE=4 SV=1); **FWINSSASR** (tr|A0A067E4V0|A0A067E4V0_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000271mg PE=4 SV=1); **GNVGLGRRTMR** (tr|A0A067FLZ6|A0A067FLZ6_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007895mg PE=4 SV=1); **NSTVDTVQNAGNVPGPEK** (tr|A0A067GJL1|A0A067GJL1_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0138152 mg PE= 4 SV=1); **RYSSSILER** (tr|A0A067D6H6|A0A067D6H6_CITSI REVERSED Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g044993mg PE=4 SV=1); **RYVGMKSNR** (tr|A0A067DP51|A0A067DP51_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g036662mg PE=4 SV=1); **LAAIQRTARK** (tr|A0A067EYB3|A0A067EYB3_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022457mg PE=4 SV=1); **VPDKLVLAVQDKMK** (tr|A0A067F638|A0A067F638_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g008767mg PE=4 SV=1); **VPDKLVLAVQDKMK** (tr|A0A067F638|A0A067F638_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g008767mg PE=4 SV=1); **SFNLTQMP** (tr|A0A067GU46|A0A067GU46_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013807mg PE=4 SV=1); **APGFLGDHIKGASMGTSALLCPASSKPSGLRMPSPK** (tr|A0A067EJD4|A0A067EJD4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004359mg PE=4 SV=1); **SPTTIHAINGSTYDYLKKPENGEIAR** (tr|A0A067ED68|A0A067ED68_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g037268mg PE=4 SV=1); **MVVAISEENPR** (tr|A0A067D539|A0A067D539_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g030650mg PE=4 SV=1); **GVLELAKEPSR** (tr|A0A067DKP5|A0A067DKP5_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g044156mg PE=4 SV=1); **KNVTRGIAPSR** (tr|A0A067FZU8|A0A067FZU8_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g036930mg PE=4 SV=1); **RIEEAMSSST** (tr|A0A067FEE6|A0A067FEE6_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016454mg PE=4 SV=1)

Kütdiken çeşidinde görülen farklı peptitler ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

TDSAQVSPVAESVK (tr|A0A067G907|A0A067G907_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g018573mg PE=4 SV=1); **ISYSVGDFEFTR** (tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1); **LSGNPSDVYQPLGDIK** (tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1); **AFRDTIDLFVER** (tr|A0A067H1C8|A0A067H1C8_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1); **ALIVDDLVTGGTLSAAIR** (tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1); **ISGVNYTAEMPKR** (tr|A0A067DRH5|A0A067DRH5_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000290mg PE=4 SV=1); **GGFGGRGGGGFR** (tr|A0A067FDC6|A0A067FDC6_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005470mg PE=3 SV=1); **APRLEESVAANNDR** (tr|A0A067FDT7|A0A067FDT7_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g001970mg PE=4 SV=1); **GAYGVVCSSINR** (tr|A0A067FUK0|A0A067FUK0_CITSI Mitogen-activated protein kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017909mg PE=3 SV=1); **AAAEQLVAMAEAVK** (tr|A0A067GYT2|A0A067GYT2_CITSI REVERSED Polyadenylate-binding protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g006641mg PE=3 SV=1); **DGLSCQSIIGPDSTEK** (tr|A0A067GQV0|A0A067GQV0_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g001185mg PE=4 SV=1); **SLIEMESEIAAR** (tr|A0A067E9W9|A0A067E9W9_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002103mg PE=4 SV=1); **IEGQATDVEIAR** (tr|A0A067F0L9|A0A067F0L9_CITSI ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022551mg PE=3 SV=1); **DSLTSVPGNHGKFCR** (tr|A0A067FYR4|A0A067FYR4_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010784mg PE=4 SV=1); **GAEDEIKRDAEPK** (tr|A0A067H591|A0A067H591_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1); **TGSTSIALTDR** (tr|A0A067DNC5|A0A067DNC5_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017332mg PE=3 SV=1); **CSLQAMIPNSADALPTLRMR**

(tr|A0A067HBN0|A0A067HBN0_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN =CISIN_1g012334mg PE=4 SV=1); **TGDATMAENDMK** (tr|A0A067DX48|A0A067DX48_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g014297mg PE=4 SV=1); **NYAYSYPGESSPGFTKCLGSIWTGKER** (tr|A0A067GAG0|A0A067GAG0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005854mg PE=4 SV=1); **IGDFRGNNFNYPFGSGRR** (tr|A0A067FDI0|A0A067FDI0_CITSI Uncharacterized protein OS= Citrus sinensis GN=CISIN_1g009821mg PE=3 SV=1); **GAVSDLPLDLT** (tr|A0A067F9V1|A0A067F9V1_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g006673mg PE=4 SV=1); **LLFPWTKDNPLVMEEESP** (tr|A0A067ENT9|A0A067ENT9_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007521mg PE=4 SV=1); **VSELLEMAQQVK** (tr|A0A067FBX1|A0A067FBX1_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g029755mg PE=4 SV=1); **ELNENNIPLNVNR** (tr|A0A067FQ90|A0A067FQ90_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027111mg PE=4 SV=1); **MGHESDLSIR** (tr|A0A067EJ23|A0A067EJ23_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g048535mg PE=3 SV=1); **WDKTYWPTYK** (tr|A0A067EKE6|A0A067EKE6_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012488mg PE=4 SV=1); **GNAYRGFIVSGAK** (tr|A0A067FEQ7|A0A067FEQ7_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g031759mg PE=4 SV=1); **LGGLNAYVTGSPDSK** (tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1); **LGGLNAYVTGSPDSK** (tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1); **TGVNEPAASESAESLR** (tr|A0A067H446|A0A067H446_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013999mg PE=4 SV=1).

[illegible]

K

[illegible]

G

Şekil 27. Kütdiken (K), Gülşen (G) ve Alata (A) çeşitlerinde spot analizi sonucu belirlenen peptitlerden bazıları

Tablo 4. Alata (yeşil renkli) ve Kütdiken (Kırmızı renkli) çeşitlerindeki protein spotlarının ayrı ayrı ve relatif değerleri. *Q*: *quantite*, *Avg*: *Ortalama değer*; *%V*: *hacimce yüzde oran*; *Label*: *Spot etiketi*

Mark	Hide	Norm	Norm	A-%V	K1-%V	K1-...	A-Avg	K1-Avg	A-GREY1-Label	K1-GREY1-Label	A-Q	K1-Q
☐	☐	☒	☒	0.094	0.059	0.631	0.025	0.019			0.263	0.398
☐	☐		☒		0.032	∞		0.025				0.296
☐	☐	☒	☒	0.063	0.133	2.127	0.019	0.024			0.339	0.436
☐	☐	☒		0.071		0.000	0.019				0.240	
☐	☐	☒	☒	0.128	0.135	1.054	0.025	0.022			0.445	0.497
☐	☐	☒	☒	0.072	0.111	1.539	0.023	0.023			0.299	0.456
☐	☐	☒	☒	0.033	0.080	2.411	0.019	0.032			0.130	0.288
☐	☐	☒	☒	0.139	0.074	0.530	0.064	0.040			0.295	0.405
☐	☐	☒		0.031		0.000	0.015				0.191	
☐	☐	☒	☒	0.064	0.092	1.433	0.015	0.014			0.171	0.358
☐	☐		☒		0.079	∞		0.034				0.315
☐	☐	☒	☒	0.358	0.279	0.779	0.051	0.043			0.285	0.478
☐	☐	☒	☒	0.278	0.230	0.826	0.042	0.041			0.382	0.447
☐	☐	☒	☒	0.031	0.042	1.353	0.013	0.011			0.213	0.442
☐	☐	☒	☒	0.060	0.064	1.070	0.019	0.017			0.179	0.329
☐	☐		☒		0.047	∞		0.014				0.341
☐	☐	☒	☒	0.181	0.196	1.082	0.028	0.040			0.208	0.429
☐	☐	☒	☒	0.346	0.198	0.570	0.049	0.035			0.326	0.412
☐	☐		☒		0.035	∞		0.011				0.116
☐	☐		☒		0.097	∞		0.019		K5		0.414
☐	☐	☒	☒	0.114	0.174	1.529	0.032	0.035			0.189	0.326
☐	☐	☒	☒	0.273	0.222	0.816	0.039	0.042			0.336	0.558
☐	☐	☒	☒	0.900	1.016	1.128	0.046	0.050			0.436	0.595
☐	☐	☒		0.088		0.000	0.064				0.197	
☐	☐	☒		0.095		0.000	0.054				0.183	
☐	☐		☒		0.064	∞		0.037				0.387
☐	☐	☒	☒	0.334	0.403	1.207	0.029	0.043			0.337	0.615
☐	☐	☒	☒	0.368	0.448	1.217	0.090	0.084			0.328	0.469
☐	☐		☒		0.088	∞		0.029				0.307
☐	☐	☒	☒	0.292	0.236	0.809	0.047	0.052			0.430	0.450
☐	☐	☒	☒	0.051	0.053	1.034	0.047	0.034			0.165	0.308
☐	☐	☒	☒	0.100	0.109	1.087	0.043	0.035			0.224	0.394
☐	☐		☒		0.166	∞		0.054				0.398

Tablo 4. Devamı

K1	K1	A...	K1	A...	K1	K1...	A...	K1	A-GREY1	K1-GREY	A...	K1
Mark	Hide	Norm	Norm	%V	%V	%V	Avg	Avg	Label	Label	Q	Q
☐	☐	☒	☒		0.021	∞		0.007				0.339
☐	☐	☒	☒	0.113	0.123	1.090	0.028	0.030			0.417	0.491
☐	☐	☒	☒		0.050	∞		0.018				0.033
☐	☐	☒	☒	0.045	0.040	0.890	0.014	0.012			0.187	0.329
☐	☐	☒	☒	0.020	0.021	1.023	0.011	0.012			0.169	0.336
☐	☐	☒	☒	0.104	0.096	0.921	0.031	0.028			0.351	0.455
☐	☐	☒	☒	0.440	0.618	1.406	0.060	0.061			0.322	0.543
☐	☐	☒	☒	0.103	0.107	1.034	0.031	0.031			0.320	0.434
☐	☐	☒	☒	0.125	0.093	0.739	0.026	0.021			0.280	0.551
☐	☐	☒	☒	1.085	0.740	0.682	0.108	0.095			0.543	0.568
☐	☐	☒	☒	0.198	0.180	0.909	0.030	0.032			0.199	0.338
☐	☐	☒	☒	0.115	0.023	0.202	0.022	0.017			0.203	0.278
☐	☐	☒	☒	0.068	0.109	1.592	0.024	0.027			0.283	0.433
☐	☐	☒	☒		0.115	∞		0.033				0.360
☐	☐	☒	☒	0.096		0.000	0.033				0.196	
☐	☐	☒	☒	0.052	0.057	1.101	0.013	0.014			0.317	0.416
☐	☐	☒	☒	0.212	0.253	1.196	0.054	0.044			0.344	0.459
☐	☐	☒	☒	0.145	0.322	2.211	0.022	0.032		K2	0.257	0.895
☐	☐	☒	☒		0.095	∞		0.035				0.373
☐	☐	☒	☒	0.062	0.088	1.415	0.025	0.027			0.128	0.315
☐	☐	☒	☒	0.293	0.208	0.709	0.041	0.035			0.689	0.561
☐	☐	☒	☒		0.081	∞		0.027				0.522
☐	☐	☒	☒	1.437	0.735	0.511	0.067	0.061			0.688	0.759
☐	☐	☒	☒		0.054	∞		0.025				0.385
☐	☐	☒	☒	0.174	0.169	0.973	0.029	0.033			0.446	0.399
☐	☐	☒	☒	0.083		0.000	0.050				0.278	
☐	☐	☒	☒	0.254	0.272	1.070	0.043	0.039			0.303	0.414
☐	☐	☒	☒	0.102	0.078	0.767	0.035	0.023			0.220	0.333
☐	☐	☒	☒	0.103	0.100	0.975	0.042	0.039			0.281	0.417
☐	☐	☒	☒	0.031		0.000	0.014				0.101	
☐	☐	☒	☒	0.086	0.087	1.012	0.024	0.021			0.222	0.344
☐	☐	☒	☒	0.395	0.339	0.858	0.068	0.071			0.339	0.522
☐	☐	☒	☒	0.427	0.708	1.658	0.049	0.057			0.478	0.532
☐	☐	☒	☒	0.018		0.000	0.016				0.141	
☐	☐	☒	☒	0.123		0.000	0.029				0.273	
☐	☐	☒	☒	0.237	0.237	1.003	0.089	0.067			0.330	0.487
☐	☐	☒	☒	0.057	0.059	1.043	0.016	0.017			0.138	0.411
☐	☐	☒	☒	0.343	0.250	0.729	0.033	0.038			1.000	0.642
☐	☐	☒	☒	0.159	0.507	3.194	0.028	0.044			0.314	0.451
☐	☐	☒	☒		0.017	∞		0.013				0.007
☐	☐	☒	☒	0.200	0.142	0.714	0.028	0.025			0.269	0.372
☐	☐	☒	☒	0.086	0.082	0.959	0.016	0.019 A1			0.230	0.434
☐	☐	☒	☒	0.268	0.232	0.867	0.066	0.055			0.319	0.526
☐	☐	☒	☒		0.119	∞		0.038				0.421
☐	☐	☒	☒	0.121	0.208	1.724	0.028	0.036			0.220	0.415
☐	☐	☒	☒	0.357	0.434	1.216	0.088	0.071			0.303	0.444
☐	☐	☒	☒	0.020		0.000	0.009				0.164	

Tablo 4. Devamı

K1	K1	A2	K1	A2	K1	K1	A2	K1	A2	A-GREY1	K1-GREY	A2	K1
Mark	Hide	Norm	Norm	%V	%V		Avg	Avg		Label	Label	Q	Q
☐	☐	☒	☒	0.657	0.749	1.140	0.081	0.072				0.478	0.695
☐	☐	☒	☐	0.032		0.000	0.029					0.146	
☐	☐	☒	☒	0.079	0.330	4.174	0.030	0.046				0.172	0.325
☐	☐	☒	☒	0.201	0.093	0.464	0.023	0.020				0.449	0.316
☐	☐	☒	☒	0.044	0.050	1.129	0.018	0.016				0.195	0.273
☐	☐	☒	☒	0.512	0.455	0.889	0.038	0.047				0.375	0.502
☐	☐	☒	☒	0.081	0.055	0.680	0.033	0.033				0.171	0.333
☐	☐	☒	☒	0.296	0.225	0.761	0.036	0.031				0.555	0.566
☐	☐	☒	☒	0.491	0.469	0.954	0.057	0.050				0.587	0.654
☐	☐	☒	☐	0.139		0.000	0.066					0.160	
☐	☐	☒	☐	0.239		0.000	0.044					0.224	
☐	☐	☒	☒	0.095	0.049	0.514	0.031	0.025				0.256	0.375
☐	☐	☒	☒	0.079	0.059	0.739	0.026	0.017				0.351	0.419
☐	☐	☐	☒		0.066	∞		0.017					0.311
☐	☐	☒	☒	0.042	0.039	0.922	0.012	0.010				0.265	0.361
☐	☐	☒	☒	0.360	0.147	0.408	0.039	0.033				0.320	0.408
☐	☐	☐	☒		0.034	∞		0.022					0.282
☐	☐	☒	☒	0.172	0.280	1.630	0.037	0.037				0.251	0.586
☐	☐	☒	☐	0.140		0.000	0.035					0.143	
☐	☐	☒	☒	0.093	0.113	1.218	0.041	0.034				0.303	0.401
☐	☐	☒	☒	0.133	0.072	0.539	0.049	0.039				0.338	0.363
☐	☐	☒	☒	1.245	1.549	1.244	0.051	0.059				0.730	0.780
☐	☐	☐	☒		0.084	∞		0.028					0.325
☐	☐	☒	☐	0.146		0.000	0.054					0.319	
☐	☐	☒	☐	0.024		0.000	0.010					0.125	
☐	☐	☒	☒	3.986	3.759	0.943	0.116	0.093				1.000	1.000
☐	☐	☐	☒		0.033	∞		0.025					0.287
☐	☐	☒	☒	0.046	0.140	3.069	0.022	0.031				0.173	0.320
☐	☐	☒	☒	0.062	0.113	1.821	0.039	0.037				0.175	0.347
☐	☐	☒	☐	0.077		0.000	0.033					0.192	
☐	☐	☐	☒		0.182	∞		0.035					0.464
☐	☐	☒	☐	0.040		0.000	0.033					0.148	
☐	☐	☒	☒	0.039	0.051	1.309	0.010	0.009				0.251	0.390
☐	☐	☐	☒		0.311	∞		0.064					0.350
☐	☐	☒	☒	0.036	0.021	0.595	0.014	0.006				0.212	0.309
☐	☐	☒	☐	0.227		0.000	0.043					0.286	
☐	☐	☒	☐	0.060		0.000	0.019					0.223	
☐	☐	☒	☒	0.164	0.183	1.114	0.030	0.040				0.336	0.484
☐	☐	☐	☒		0.111	∞		0.027	K3				0.438
☐	☐	☒	☒	0.077	0.121	1.562	0.025	0.028				0.197	0.338
☐	☐	☒	☐	0.062		0.000	0.017					0.144	
☐	☐	☒	☒	0.048	0.054	1.118	0.014	0.012				0.209	0.327
☐	☐	☒	☒	0.203	0.114	0.559	0.039	0.039				0.251	0.336
☐	☐	☒	☒	0.049	0.070	1.422	0.012	0.011				0.197	0.605
☐	☐	☒	☒	0.432	0.298	0.691	0.059	0.058				0.473	0.515

TARTIŞMA VE SONUÇ

Özellikle turunçgillerde mutasyon orijinli materyallerin birbirinden moleküler markırlar (DNA) yardımıyla ayırt edilmesinin güçlüğü konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Barrett ve Rhodes (1976), *Citrus* ve bazı akraba gruplarında ağaç, yaprak, çiçek ve meyvelere standardize edilmiş 146 adet karakteri kullanarak akrabalık düzeylerini belirleme çalışmaları yapmışlar ve portakal, turunç, limon, altıntop ve laym türleri içerisindeki varyasyonların kökeninin bir genotipe dayanan mutasyonlardan meydana geldiğini bildirmişlerdir. Roose (1988), portakal, turunç, altıntop gibi türler içerisinde yer alan mutasyon orijinli çeşitlerin izoenzim markırlarıyla ayırt edilemediğini bildirmiştir. Buna karşın melez orijinli olan çeşitlerde daha geniş bir izoenzim varyasyonu olduğunu ve bu çalışmalarla ayırt edilebildiklerini belirtmiştir. Luro ve ark. (1995), minisatellit markırları ile yaptıkları çalışmalarda 10 adet portakal çeşidi arasında genetik farklılık tespit edememişlerdir. Fang ve Roose (1997), turunçgillerde mutasyonların fenotipik farklılıklar ortaya koymasına karşın genom üzerinde çok küçük bir bölgede meydana geldiğini hatta bazen bir tek nükleotitte oluştuğunu bu yüzden RFLP çalışmaları ile mutasyonları belirlenmesinin zor olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar portakallar içerisinde düşük düzeyde bir polimorfizm elde etmişler ve çoğu portakal çeşidinin kökeninin tek bir ata olduğunu, çeşitlerin mutasyon yoluyla meydana geldiğini savunmuşlardır. Luro ve ark. (2000), SSR markırları ile yaptıkları çalışmada, portakallar içerisinde varyasyonların bir atadan meydana gelen mutasyonlarla oluştuğunu ve genetik olarak birbirlerinden ayırt edilemediklerini belirtmişlerdir. Oliveira ve Radmann (2005), izoenzim markırları ile yaptıkları çalışmada, Lanelate, Navelate, Navelina ve Salustiana portakal çeşitlerinin benzerlik düzeyini 1.00 olarak tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacıların bildirdiğine göre, Novelli ve ark. (2000), aralarında fenotipik farklılıklar olsa bile portakal çeşitlerini, RFLP, RAPD ve mikrosatellit markırları ile ayırt etmenin çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Novelli ve ark. (2006), 41 portakal çeşidinde mikrosatellit markırları ile yaptıkları çalışmada genetik benzerlik düzeyini 0.96 ile 1.00 arasında saptamışlar ve çoğu çeşit arasında bu değeri 1.00 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar portakal çeşitleri arasındaki morfolojik farklılıkların mutasyon orijinli olduğunu ve portakalların genetik olarak dar bir yapıya sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacıların bildirdiğine göre, Orford ve ark. (1995), minisatellit markırları ile portakallar arasında genetik farklılık tespit edememiş ve portakalların moleküler markırlarla karakterizasyonun zorluğunu vurgulamışlardır. Qing-Qin ve ark. (2007), SSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda kullandıkları 19 portakal çeşidi arasında bir farklılık tespit edememişler ve bu çeşitlerin mutasyonla meydana geldiğini

bildirmişlerdir. Amar ve ark. (2011) SSR, SRAP ve CAPS-SNP markır sistemlerini kombine ettikleri çalışmada turunçgiller içerisinde en yüksek benzerlik oranını portakallarda belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Malik ve ark. (2012), RAPD markırları ile yaptıkları çalışmalarda portakallar içerisinde düşük genetik çeşitlilik olduğunu, buna karşın yüksek düzeyde fenotipik varyasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun meydana gelen somatik mutasyonlara bağlı olduğunu ifade etmişlerdir. Öte yandan Breto ve ark. (2001) Klemantin mandarini klonlarında 16 ISSR primeri ile polimorfizm belirleyememişlerdir.

Limonlarla ilgili yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur. Gülşen ve Roose (2001), ISSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda limonlar arasındaki genetik varyasyonun çok dar olduğunu ve birçok limonun mutasyon orijinli olduğunu bildirmişlerdir. Uzun ve ark. (2009) 12 limon çeşidinde RAPD ve ISSR markırları ile yaptıkları çalışmada limonlar arasında çok yüksek düzeyde benzerlik saptamışlar ve bazı materyalleri ayırt edememişlerdir. Bu noktada, özellikle mutasyon orijinli bireylerin ayırt edilmesi için daha ileri tekniklerin kullanılması yararlı olacaktır.

RNA çalışmalarında limon çeşitlerinde elde edilen unigenlerin genomdaki görevlerine göre yapılan gruplandırmada, bunların en fazla biyolojik işlemlerde görevli oldukları görülmüştür. Daha sonra genlerin görev aldıkları alanlar sırasıyla, hücre bileşenleri ile ilgili konular ve moleküler fonksiyonlar olarak sıralanmıştır. Benzer şekilde, Patel ve ark. (2014) altıntop meyvesinin flavedo bölümünde yaptıkları sekanslama çalışmalarında genlerin çoğunlukla biyolojik işlemlerde görev aldıklarını ortaya koymuşlardır. Daha sonra sırasıyla, hücre bileşenleri ve moleküler fonksiyonlar konusundaki genler yoğunlukta bulunmuştur. Yine Liang ve ark. (2015) altıntopun farklı organlarından alınan dokularla yaptıkları çalışmalarda genlerin fonksiyonları ile ilgili olarak aynı sonucu elde etmişlerdir. Limon çeşitlerinde belirlenen genlerin uzunluk dağılımı incelendiğinde, tüm çeşitlerde en fazla gen sayısı 100-500 bp uzunluğunda saptanmıştır. Bunu 500-1000 bp uzunluğundaki gen sayısı takip etmiştir. 2500-3000 bp uzunluğundaki genlerin sayısı ise bütün çeşitlerde en az sayıda bulunmuştur. Domateste yapılan benzer bir çalışmada da, 100-500 bp uzunluğundaki genlerin sayısı en fazla bulunmuştur. Yine bunu 500-1000 bp uzunluğundaki gen sayısı takip etmiştir (Sunderasan ve ark. 2016). Limon çeşitlerinde yapılan RNA sekanslama işlemleri sonucunda toplam 12442 adet SSR motifi tespit edilmiştir. Bu motiflerin 4309 tanesi tek baz tekrarı, 3432 tanesi çift baz tekrarı, 3759 tanesi üçlü baz tekrarı, 272 tanesi dörtlü baz tekrarı, 323 tanesi beşli ve 347 tanesi ise altılı baz tekrarı şeklindedir. Altıntopta konu ile ilgili yapılan

çalışmada, elde edilen SSR motifleri dağılımı çalışmamızdan farklı olmuştur. O çalışmada en fazla motif üçlü baz tekrarında elde edilirken onu ikili baz tekrar sayısı takip etmiştir (Liang ve ark. 2015).

Protein çalışmaları sonucunda, elde edilen spotlarda yapılan peptit analizleri sonuçları limon bitkisinin tam sekansı dünyada bulunmadığı için yakın tür olan portakal sekansı ile karşılaştırılabilmiştir. Buna göre, çeşitler arasında önemli peptit farklılıkları görülmüştür. *Citrus limon*'a ait veri tabanının sonraki yıllarda literatüre eklenmesiyle daha fazla peptit benzerlik veya farklılıklarının ortaya çıkması muhtemel görünmektedir. Bu nedenle belirlenen peptitlerin markır olduğunun net olarak belirtilebilmesi için *Citrus limon*'a ait veri tabanının çıkarılması gerekmektedir. Veri tabanının oluşturulması durumunda farklı olarak ifade edilen diğer birçok peptidin de çekirdeksizlik ile ilgili çeşitlerin tanımlanmasında kullanılabilecek değerli birer markır olma potansiyeli vardır. Ayrıca bu çalışmadan yola çıkarak yapılabilecek sonraki araştırmalarda çekirdek oluşumu ile ilgili proteinlerin net olarak belirlenmesi durumunda biyoteknolojik yöntemlerle yapılacak ıslah programlarında kullanılabilecek potansiyeline de sahiptir.

Bu çalışmada ülkemizde son dönemde geliştirilmiş olan üç adet yeni çekirdeksiz limon çeşidi ile bu çeşitlerin orijini olan çekirdekli Kütdiken limonu arasında DNA, RNA ve protein profillerinin karşılaştırılması ile çekirdeksizliği belirleyen markır/markırların geliştirilme imkanları araştırılmıştır. DNA çalışmalarında bu konuda önemli farklılık bulunmamıştır. Bu konuda literatürde benzer sonuçların alındığı çok sayıda çalışma mevcuttur. RNA çalışmaları ile limon çeşitlerindeki gen sayıları ve bunların karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bunun yanında RNA sekans sonuçlarından elde edilen sonuçlardan yararlanılarak turunçgiller için yeni SSR primerleri geliştirilmiş ve bazı turunçgil çeşitlerinde test edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Protein çalışmalarında limonlar arasında farklılık gösteren protein spotları tespit edilmiştir. Bunun yanında yapılan peptit analizinde elde edilen sonuçlar, limonun dünyada tam sekans bilgisi bulunmadığından portakal sekansı ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda, çekirdekli ve çekirdeksiz çeşitler arasındaki farkı ortaya koyabilecek spot farklılıkları ve peptitler belirlenmiştir. Limon sekans bilgisi yayımlandıktan sonra bu peptitlerden yola çıkılarak çekirdeksizlikle ilgili yeni primerlerin geliştirilmesi mümkündür. Çalışmanın hedefi olan üç yöntemden en az biri ile çekirdekli ve çekirdeksiz çeşitleri ayırt edebilecek markırın tespiti konusu protein çalışmaları ile elde edilmiş durumdadır. Bu çalışma, bu yönleriyle özgün ve orijinal bir çalışma konumundadır.

KAYNAKLAR

- Amar, M.H., Biswas, M.K., Zhang, Z., Guo, W.W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae* 128:220–227.
- Ananthakrishnan, G., Orbovic, V., Pasquali, G., Calovic, M., Grosser, J.W., 2007. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through agrobacterium-mediated genetic transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43, 593–601.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112, 1519–1531.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1, 105–136.
- Bolon, Y.T., Joseph, B., Cannon, S., Graham, M., Diers, B., Farmer, A., et al. 2010. Complementary genetic and genomic approaches help characterize the linkage group I seed protein QTL in soybean. *BMC Plant Biology*, 10 (1), 41.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Breto, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A., Asins, M.J. 2001. The diversification of Citrus clementina Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21:285-293.
- Capparelli, R., Viscardi, M., Amoroso, M.G., Blaiotta, G., Bianco, M., 2004. Inter-simple sequence repeat markers and flow cytometry for the characterization of closely related *Citrus limon* germplasms. *Biotechnology Letters* 26, 1295–1299.
- Chen, C., Bowman, K.D., Choi, Y.A., Dang, P.M., Rao, M.N., Huang, S., Soneji, J.R., McCollum, T.G., Gmitter Jr, F.G., 2008. EST-SSR genetic maps for Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. *Tree Genetics & Genomes* 4, 1–10.
- Corazza-Nunes, M.J., M.A. Machado, W.M.C Nunes, M. Cristofani, M.L.P.N. Targon., 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 126, 169-176.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12,13–15.

- Fang, D.Q., Roose, M.L., 1997. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 408–417.
- FAO, 2013. Food and Agricultural Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org>.
- Golein, B., Koltunow, A. M., Talaie, A., Zamani Z., Ebadi, A., 2005. Isolation and characterization of microsatellites loci in the lemon (*Citrus limon*), *Molecular Ecology Notes*, 5, 253–255.
- Guo, W.W., X.X. Deng., H.L. Yi., 2000. Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C.paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* 116, 281–285.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2001. Lemons: diversity and relationships with selected citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126, 309–317.
- Gulsen, O., Uzun, A., Pala, H., Canihos, E., Kafa, G., 2007. Development of seedless and ‘mal secco’ tolerant mutant lemons through budwood irradiation. *Sci. Hortic.* 112, 184–190.
- Gulsen, O., Roose, M.L., Pala, H., Caniños, E., Uzun, A., Kafa, G., Canan, İ., Turunçgillerde Bazı Önemli Meyve Karakterlerini Kontrol Eden Genlerin Haritalanması Ve Moleküler Isaretleyicilerin Olusturulması, (Sonuç Raporu, Proje No: TÜBİTAK TOVAG-105 O 628), (2009).
- Gulsen, O., Uzun, A., Canan, I., Seday, U., Canihos, E., Pala, H., 2010. A New Citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers, *Euphytica*, 173: 265-277
- Han, F., Romagosa, I., Ullrich, S.E., Jones, B.L., Hayes, P.M., Wesenberg, D.M., 1997. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Molecular Breeding* 3, 427–437.
- Hu-Wu, J., Ferguson, A.R., Mooney, P.A., 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. *Euphytica*, 141: 229–235.
- Isaacson T., Damasceno C. M. B., Saravanan R. S., He Y., Catalá C., Saladié M., and Rose J. K. C. 2006. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues., *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 769–74.
- Islam S., Yan G., Appels R., Ma W. 2012. Comparative proteome analysis of seed storage and allergenic proteins among four narrow-leafed lupin cultivars. *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 1230–8.

- Jinping, X., LiGeng, C., Ming, X., Hailin, L., WeiQi, Y., 2009. Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. *Scientia Horticulturae* 121, 505–510.
- Johnson MTJ, Carpenter EJ, Tian Z, Bruskiewich R, Burris JN, Carrigan CT, Chase MW, Clarke ND, Covshoff S, dePamphilis CW, Edger PP, Goh F, Graham S, Greiner S, Hibberd JM, Jordon-Thaden I, Kutchan TM, Leebens-Mack J, Melkonian M, Miles N, Myburg H, Patterson J, Pires JC, Ralph P, Rolf M, Sage RF, Soltis D, Soltis P, Stevenson D, Stewart CN, Surek B, Thomsen CJM, Villarreal JC, Wu X, Zhang Y, Deyholos MK, Wong GKS. 2012. Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS One*.2012;7:e50226. doi: 10.1371/journal.pone.0050226.
- Joo An, H., Jin, S.B., Kang, B.C., Park, H.G., 2008. Production of Somatic Hybrids between Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) and Navel Orange (*Citrus sinensis*) by Protoplast Fusion. *Journal of Plant Biology*, 51, 186–191.
- Li, D.D., Shi, W., Deng, X.X., 2002. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep.* 21, 153–156.
- Li, G., Quiros, C.F. 2001. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on A Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103, 455-461.
- Liang, M., Yang, X., Li, H., Su, S., Yi, H., Chai, L., Deng, X. 2015. De Novo Transcriptome Assembly of Pummelo and Molecular Marker Development. *PLoS ONE* 10(3): e0120615. doi:10.1371/journal.pone.0120615.
- Luro, F., Laigrent, F., Bove, J.M., Ollitrault, P. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *Hortscience* 30: 1063-1067.
- Malik, S.K., Ronini, M.R., Kumar, S., Choudhary, R. 2012. Assessment of genetic diversity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cultivars of India using morphological and RAPD markers. *Agricultural Research* 1: 317–324.
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Patrizia Russo, M., Cunsolo, V., Saletti, R., Reforgiato Recupero, G., Foti, S., 2009. Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics*, 73, 134-152.

- Novelli, VM., Cristofani, M., Souza, A.A. Machado, MA. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 90-96.
- Oliveira, R.P., Aguilar-Vildoso, C.I., Cristofani, M., Machado, M.A., Skewed. 2004. RAPD markers in linkage maps of Citrus. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 437-441.
- Oliveira, R.P., Radmann, E.B. 2005. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 332-334.
- Qing-Qin, C., Hai-Jun, M., Xiao-Peng, W., Hua-Lin, Y., Xiu-Xin, D. 2007. Genetic diversity of male sterile and low fertility germplasm of *Citrus* revealed using SSR markers. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 4: 99–104.
- Patel, M., Manvar, T., Apurwa, S., Ghosh, A., Tiwari, T., Chikara, S.K. 2014. Comparative de novo transcriptome analysis and metabolic pathway studies of *Citrus paradisi* flavedo from naive stage to ripened stage. *Mol. Biol. Rep.* 41:3071–3080.
- Raza, H., Khan, M.M., Khan, A.A., 2003. Seedlessness in citrus. *Int. J. Agr. Biol.* 3, 388–391.
- Roose, M.L., 2000. Linkage mapping and marker assisted selection in citrus. 9th Congress Intl. Soc. Citriculture 1, 69-70.
- Schafer, G., M. Bastianel, A.L.C. Dornelles, 2004. Identification of zygote trifoliate orange seedlings with RAPD molecular markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 39, 167-172.
- Shahsavari, A.R., Izadpanah, K., Tafazoli, E., Sayed Tabatabaei, B.E. 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 112, 310–314.
- Somsri, S., Jompook, P., Kanhom, P., Thayamanont, P., Meecharoen, S., Kumcha, U., 2009. Development of seedless fruits mutants in citrus including tangerine (*C. reticulata*) and Pummelo (*C. grandis*) through induced mutations and biotechnology. In: *Induced Mutation in Tropical Fruit Trees*, IAEA-TECDOC–1615, Vienna, Austria, p. 33-40.
- Sunderasan, S., Philosoph-Hadas, S., Riov, J., Mugasimangalam, R., Kuravadi, N.A., Kochanek, B., Salim, S., Tucker, M.L., Meir S. 2016. Denovo Transcriptome Sequencing and Development of Abscission Zone-Specific Microarray as a New Molecular Tool for Analysis of Tomato Organ Abscission. *Front. Plant Sci.* 6:1258. doi: 10.3389/fpls.2015.01258.

- Sutarto, I., Agisimanto, D., Supriyanto, A., 2009. Development of promising seedless Citrus mutants through gamma irradiation. ed: Q.Y. Shu, Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p: 306–308.
- Syrový, L.; Hodný, Z. 1991. Staining and Quantification of Proteins Separated by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Chromatog. 569, 175- 196.
- Tuzcu, O., 1990. Türkiyede Yetiştirilen Başlıca Turunçgil Çeşitleri. Akdeniz İhracatçı Birlikleri Yayınları, Mersin-Türkiye, 71s.
- Uzun, A., Gulsen, O., Kafa, G., Seday, U., 2008. ‘Alata’, ‘Gulsen’, and ‘Uzun’ Seedless Lemons and ‘Eylul’ Early-maturing Lemon. Hortscience, 43, 1920–1921.
- Uzun, A., Yesiloğlu, T., Aka-Kacar, Y., Tuzcu, O., Gulsen, O., 2009a. Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs), Scientia Horticulturae, 121, 306-312.
- Uzun, A., Gulsen, O., Kafa, G., Seday, U., 2009b. Field performance and molecular diversification of lemon selection. Scientia Horticulturae, 120, 473-478.
- Wang, L.L., Ping, Z.L., Qin, G.Y., Xia, W.M., Ming, C.L., Lan, Y.J., Yan, W., Min, Y.F., Zhi, W.L. 2008. DNA Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Late-Bolting Radish Cultivars with RAPD, ISSR and SRAP Markers. Scientia Horticulturae, 116: 240-247.
- Wu, X., Clough, S. J., Huber, S. C. and Oh, M. 2013. IEF-2DE Analysis and Protein Identification. Bio-protocol 3(19): e924.
- Ye, W., Qin, Y., Ye, Z., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, L., Wu, X., Lin, S., Hu, G., 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar ‘Wuzishatangju’ (*Citrus reticulata* Blanco). Plant Science, 177, 19–27.

EK 1. Gülşen çeşidinden alınan spotun portakal veritabanı ile karşılaştırılması

N	Unused	Total	%Cov	%Cov(50)	%Cov(95)	Accessions	Names
	Used	Annotation	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
	dMass	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z	Sc
	Spectrum	Specific	Time	PrecursorSignal	PrecursorElution		
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI				Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1					2	99.0000009536743
	SGSAADSQTVSDYVR				0.00768552022054791		
	1541.70349121094	771.859	1541.69580078125	771.855163574219	2		
	11	1.1.1.5553.18	1	42.5894	17574.83	41.8839	
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI				Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1					2	99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR				cleaved	G-T@N-term	
	0.00109727005474269	1892.00146484375	947.008	1892.00036621094			
	947.007446289063	2	13	1.1.1.5747.18	1	60.2098	1646.359
	60.1358						
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI				Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1					1.45593166351318	
	96.4900016784668	TVTINSEGVSR	0.00904003996402025				
	1161.60803222656	581.8113	1161.59899902344	581.806762695313	2		
	11	1.1.1.5502.11	1	37.918	657.2059	37.6043	
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI				Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1					0	76.1799991130829
	SGSAADSQTVSDYVR				0.00768552022054791		
	1541.70349121094	771.859	1541.69580078125	771.855163574219	2		
	10	1.1.1.5550.19	1	42.3231	17574.83	41.8839	
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI				Proteasome subunit beta type OS=Citrus		

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 76.1799991130829
 SGSAADSQTVSDYVR 0.00768552022054791
 1541.70349121094 771.859 1541.69580078125 771.855163574219 2
 10 1.1.1.5554.19 1 42.6839 17574.83 41.8839
 1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 76.1799991130829
 SGSAADSQTVSDYVR 0.0074413800612092 1541.70324707031
 771.8589 1541.69580078125 771.855163574219 2 10
 1.1.1.5557.18 1 42.9517 9425.478 41.9743
 1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 39.640000462532
 SGSAADSQTVSDYVR 0.00768552022054791
 1541.70349121094 771.859 1541.69580078125 771.855163574219 2
 10 1.1.1.5551.20 1 42.4174 17574.83 41.8839
 1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR cleaved G-T@N-term
 0.00109727005474269 1892.00146484375 947.008 1892.00036621094
 947.007446289063 2 13 1.1.1.5745.16 1 60.0185 1646.359
 60.1358
 1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR cleaved G-T@N-term
 0.00109727005474269 1892.00146484375 947.008 1892.00036621094
 947.007446289063 2 14 1.1.1.5748.17 1 60.2973 1646.359
 60.1358
 1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743

	TTIIGVTYNGGVVLGADSR			cleaved		G-T@N-term
	0.00109727005474269		1892.00146484375	947.008		1892.00036621094
	947.007446289063	2	12	1.1.1.5749.13	1	60.3722 1649.063
	60.1358					
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI			Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR			Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -
	0.000130218002595939		1892.98425292969	947.4994		1892.984375
	947.499450683594	2	12	1.1.1.5751.19	1	60.58 4965.004
	60.6846					
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI			Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR			Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -
	0.000130218002595939		1892.98425292969	947.4994		1892.984375
	947.499450683594	2	9	1.1.1.5752.15	1	60.6546 4965.004
	60.6846					
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI			Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR			Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -
	0.000130218002595939		1892.98425292969	947.4994		1892.984375
	947.499450683594	2	13	1.1.1.5754.18	1	60.8501 4965.004
	60.6846					
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI			Proteasome subunit beta type OS=Citrus		
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR			Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -
	0.000130218002595939		1892.98425292969	947.4994		1892.984375
	947.499450683594	2	11	1.1.1.5755.18	1	60.9415 4965.004
	60.6846					

1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056			
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI		Proteasome subunit beta type OS=Citrus					
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743		
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -			
0.000130218002595939			1892.98425292969	947.4994		1892.984375		
	947.499450683594	2	12	1.1.1.5756.16	1	61.0245	4965.004	
	60.6846							
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056			
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI		Proteasome subunit beta type OS=Citrus					
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743		
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -			
0.000130218002595939			1892.98425292969	947.4994		1892.984375		
	947.499450683594	2	10	1.1.1.5758.18	1	61.2158	4965.004	
	60.6846							
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056			
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI		Proteasome subunit beta type OS=Citrus					
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743		
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -			
0.000130218002595939			1892.98425292969	947.4994		1892.984375		
	947.499450683594	2	11	1.1.1.5759.14	1	61.2906	4965.004	
	60.6846							
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056			
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI		Proteasome subunit beta type OS=Citrus					
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743		
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -			
0.000130218002595939			1892.98425292969	947.4994		1892.984375		
	947.499450683594	2	12	1.1.1.5761.16	1	61.4821	4965.004	
	60.6846							
1	5.46	5.46	64.410001039505	19.0699994564056	19.0699994564056			
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI		Proteasome subunit beta type OS=Citrus					
	sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1				0	99.0000009536743		
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9		cleaved G-T@N-term -			
0.000252288009505719			1892.98413085938	947.4993		1892.984375		

947.499450683594 2 11 1.1.1.5762.17 1 61.5776 5456.108
 60.5933

1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR Deamidated(N)@9 cleaved G-T@N-term -
 0.000252288009505719 1892.98413085938 947.4993 1892.984375
 947.499450683594 2 7 1.1.1.5764.18 1 61.7646 3993.437
 60.7763

1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR Deamidated(N)@9 cleaved G-T@N-term -
 0.000496428983751684 1892.98388671875 947.4992 1892.984375
 947.499450683594 2 6 1.1.1.5768.18 1 62.1296 2469.627
 61.1418

1 5.46 5.46 64.410001039505 19.0699994564056 19.0699994564056
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR Deamidated(N)@9 cleaved G-T@N-term -
 0.000496428983751684 1892.98388671875 947.4992 1892.984375
 947.499450683594 2 8 1.1.1.5772.17 1 62.4909 919.8622
 61.5079

2 3.96 3.96 49.4500011205673 12.6399993896484 12.6399993896484
 tr|A0A067F2B5|A0A067F2B5_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g030119mg PE=3 SV=1 2 99.0000009536743
 ECACVIELPDLK cleaved V-E@N-term 0.0309542007744312
 1331.67749023438 666.846 1331.646484375 666.830505371094 2
 5 1.1.1.5709.6 1 56.7107 3228.428 55.9697

2 3.96 3.96 49.4500011205673 12.6399993896484 12.6399993896484
 tr|A0A067F2B5|A0A067F2B5_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g030119mg PE=3 SV=1 1.95860815048218
 99.0000009536743 NISVVAGIEAR 0.00852935016155243

1127.63842773438 564.8265 1127.6298828125 564.822204589844 2
 11 1.1.1.5637.6 1 50.1592 98.5353 50.2267
 3 1.55 1.55 16.5199995040894 8.03600028157234 8.03600028157234
 tr|A0A067CZF3|A0A067CZF3_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g027381mg PE=4 SV=1 1.55284202098846
 98.5000014305115 AEDFFFSGLGKPGNTANR -
 0.00216352008283138 1926.92028808594 964.4674 1926.92248535156
 964.468505859375 2 10 1.1.1.5720.13 1 57.7331 1260.765
 57.7714
 4 0.84 0.84 17.0499995350838 2.27300003170967 0
 RRRRRtr|A0A067H1F3|A0A067H1F3_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013578mg PE=4 SV=1
 0.841637551784515 92.0300006866455 FSKSSADDLK missed K-
 S@3 0.080647200345993 1096.62072753906 549.3176 1096.5400390625
 549.277282714844 2 6 1.1.1.5708.2 1 56.6042 2281.773
 56.1493
 5 0.71 0.71 23.1099992990494 6.30299970507622 0
 tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1 0.688246190547943
 88.6900007724762 GVEVPLSILGAEIDR
 0.00116622995119542 1566.86291503906 784.4387 1566.86169433594
 784.438110351563 2 13 1.1.1.5860.5 1 70.4762 1139.203
 70.4566
 5 0.71 0.71 23.1099992990494 6.30299970507622 0
 tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1 0 40.2599990367889
 GVEVPLSILGAEIDR 0.00116622995119542
 1566.86291503906 784.4387 1566.86169433594 784.438110351563 2
 11 1.1.1.5859.11 1 70.41 1139.203 70.4566
 5 0.71 0.71 23.1099992990494 6.30299970507622 0
 tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1 0 29.3199986219406
 GVEVPLSILGAEIDR 0.00116622995119542

1566.86291503906 784.4387 1566.86169433594 784.438110351563 2
9 1.1.1.5862.7 1 70.6671 1139.203 70.4566
6 0.54 0.54 18.860000371933 5.70200011134148 0
tr|A0A067FQ90|A0A067FQ90_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g027111mg PE=4 SV=1 0.511449217796326
83.0099999904633 EYQLASEGVDQAR 0.000179655005922541
1464.68469238281 733.3496 1464.68444824219 733.349548339844 2
8 1.1.1.5546.16 1 41.9484 159.1033 41.8839
7 0.44 0.44 41.2200003862381 10.6899999082088 10.6899999082088
RRRRRtr|A0A067H1U5|A0A067H1U5_CITSI; RRRRR
tr|A0A067H1T8|A0A067H1T8_CITSI REVERSED Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1
0.443697482347488 99.0000009536743 PDQAKVDASAMQQP
Deamidated(Q)@3 cleaved R-P@N-term; cleaved P-Q@C-term; missed K-V@5
0.0559256002306938 1485.73291015625 743.8737 1485.67700195313
743.845764160156 2 8 1.1.1.5590.10 1 45.9172 18810.65
46.0454
8 0.33 0.33 8.28699991106987 8.28699991106987 0
tr|A0A067FZH5|A0A067FZH5_CITSI Ferritin (Fragment) OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g0217032mg PE=3 SV=1 0.334419012069702
73.3500003814697 ELDLVPTVPQLSLAR
0.00103119004052132 1649.93627929688 825.9754 1649.93518066406
825.974914550781 2 12 1.1.1.5840.13 1 68.6834 581.0725
68.6304
9 0.27 0.27 21.2099999189377 8.08100029826164 0
tr|A0A067FGY6|A0A067FGY6_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0334821mg PE=3 SV=1
0.268411219120026 67.8300023078918 GPVRMPTK missed R-M@4
-0.0421747006475925 884.448059082031 443.2313 884.490234375
443.252380371094 2 5 1.1.1.5011.2 1 28.1773 69.1789
28.279

9 0.27 0.27 21.2099999189377 8.08100029826164 0
tr|A0A067FGY6|A0A067FGY6_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0334821mg PE=3 SV=1 0
67.8300023078918 GPVRMPTK missed R-M@4 -
0.0421747006475925 884.448059082031 443.2313 884.490234375
443.252380371094 2 5 1.1.1.5012.2 1 28.2685 69.1789
28.279

10 0.14 0.14 38.1000012159348 0 0
tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1
0.131943628191948 48.4699994325638 ALIVDDL VATGGTLSAAIR
-0.00622578011825681 1855.03527832031 928.5249
1855.04150390625 928.528015136719 2 12 1.1.1.5876.12 1
71.9591 5274.329 71.9112

10 0.14 0.14 38.1000012159348 0 0
tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1 0
40.2599990367889 ALIVDDL VATGGTLSAAIR -
0.00622578011825681 1855.03527832031 928.5249 1855.04150390625
928.528015136719 2 11 1.1.1.5875.14 1 71.8771 5274.329
71.9112

10 0.14 0.14 38.1000012159348 0 0
tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1 0
40.2599990367889 ALIVDDL VATGGTLSAAIR -
0.00622578011825681 1855.03527832031 928.5249 1855.04150390625
928.528015136719 2 11 1.1.1.5879.11 1 72.2252 5274.329
71.9112

11 0.12 0.12 10.4699999094009 0 0
tr|A0A067G023|A0A067G023_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g034703mg PE=4 SV=1 0.12436006218195
48.7199991941452 KGGINAPTK missed K-G@1 -
0.0599332004785538 884.448059082031 443.2313 884.507995605469

443.261260986328 2 5 1.1.1.5011.2 1 28.1773 69.1789
28.279

11 0.12 0.12 10.4699999094009 0 0
tr|A0A067G023|A0A067G023_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g034703mg PE=4 SV=1 0 48.7199991941452
KGGINAPTK missed K-G@1 -0.0599332004785538
884.448059082031 443.2313 884.507995605469 443.261260986328 2
5 1.1.1.5012.2 1 28.2685 69.1789 28.279

12 0.07 0.07 5.44399991631508 0 0 RRRRR
tr|A0A067G2Y2|A0A067G2Y2_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g018850mg PE=4 SV=1 0.0680338814854622
34.060001373291 VAGVQSLWQERR missed R-R@11 -
0.0178887993097305 1427.74548339844 714.88 1427.76330566406 714.888977050781
2 7 1.1.1.5893.4 1 73.4652 180.3554 73.4498

13 0.06 0.06 5.36499992012978 0 0 RRRRR
tr|A0A067H6A6|A0A067H6A6_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g012310mg PE=4 SV=1 0.0609802231192589
31.8500012159348 KAEMENSK Oxidation(M)@4 missed K-A@1
0.0479067005217075 951.481079101563 476.7478 951.433166503906
476.723846435547 2 4 1.1.1.5554.6 1 42.6298 720.4681
42.1561

14 0.05 2 49.3800014257431 6.79000020027161 6.79000020027161
tr|A0A067H1T8|A0A067H1T8_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1 0
99.0000009536743 NISVVAGIEAR 0.00852935016155243
1127.63842773438 564.8265 1127.6298828125 564.822204589844 2
11 1.1.1.5637.6 0 50.1592 98.5353 50.2267

15 0.05 0.05 8.82000029087067 0 0
tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1 0.0338582694530487
21.0099995136261 ISYSVG DVEFTR 0.0044370498508215
1371.67150878906 686.843 1371.6669921875 686.8408203125 2
10 1.1.1.5678.6 1 53.8947 828.0076 53.8706

EK 2. Alata çeşidinden alınan spotun portakal veritabanı ile karşılaştırılması

N	Unused	Total	%Cov	%Cov(50)	%Cov(95)	Accessions	Names
	Used	Annotation	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
	dMass	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z	Sc
	Spectrum	Specific	Time	PrecursorSignal	PrecursorElution		
1	3.74	3.74	14.4099995493889	14.4099995493889	14.4099995493889		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI;				tr A0A067FII4 A0A067FII4_CITSI		
	Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3						
SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1							
		2	99.0000009536743	SGSAADSQTVSDYVR			
	0.013056599535048	1541.70886230469	771.8617	1541.69580078125			
	771.855163574219	2	5	1.1.1.7083.2	1	42.4715	64.1223
	42.3801						
1	3.74	3.74	14.4099995493889	14.4099995493889	14.4099995493889		
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI;				tr A0A067FII4 A0A067FII4_CITSI		
	Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3						
SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1							
		1.74472737312317	99.0000009536743				
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR		Deamidated(N)@9	cleaved	G-T@N-term		
	0.00694986013695598	1892.99133300781	947.5029	1892.984375			
	947.499450683594	2	8	1.1.1.7787.2	1	60.9268	81.6199
	60.8997						
2	2	2	2.69499998539686	2.69499998539686	2.69499998539686		
	tr A0A067EL98 A0A067EL98_CITSI				Uncharacterized	protein	OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g017474mg PE=4 SV=1							
					2	99.0000009536743	
	RLSNKPITLR		missed R-L@1	-0.0671536028385162			
	1196.66821289063	599.3414	1196.7353515625	599.374938964844	2		
	4	1.1.1.7376.2	1	49.3267	20.148	49.3316	
3	0.85	0.85	2.33999993652105	2.33999993652105	0		
	tr A0A067EVL6 A0A067EVL6_CITSI				Uncharacterized	protein	OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g006553mg PE=4 SV=1							
					0.850780963897705		
	93.2900011539459	QYEDMKIQIESATEK		Gln->pyro-Glu@N-term			

missed K-I@6 -0.014172799885273 1794.82043457031 898.4175
1794.83459472656 898.424560546875 2 6 1.1.1.7760.4 1
58.6519 416.2756 57.9902

4 0.6 0.6 4.63000014424324 4.63000014424324 0
tr|A0A067D0F0|A0A067D0F0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g042950mg PE=4 SV=1 0.603800654411316
81.9800019264221 SVPVATTTR -0.00493112998083234
1001.54565429688 501.7801 1001.55053710938 501.782562255859 2
5 1.1.1.7717.2 1 55.2424 635.5706 54.9764

5 0.52 0.52 2.31199990957975 2.31199990957975 2.31199990957975
RRRRRtr|A0A067HD33|A0A067HD33_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H4F9|A0A067H4F9_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H1T3|A0A067H1T3_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H1D8|A0A067H1D8_CITSI REVERSED 3-phosphoshikimate 1-
carboxyvinyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010070mg PE=3 SV=1;
REVERSED 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g010070mg PE=3 SV=1; REVERSED 3-phosphoshikimate 1-
carboxyvinyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010070mg PE=3 SV=1;
REVERSED 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g010070mg PE=3 SV=1 0.522878706455231
98.9700019359589 LGTVLDGIPRER Oxidation(P)@9 missed R-E@10
-0.0574018992483616 1340.68383789063 671.3492 1340.7412109375
671.377868652344 2 6 1.1.1.7252.3 1 45.7527 55.0424
45.6965

6 0.34 0.34 2.02300008386374 2.02300008386374 0
RRRRRtr|A0A067DBS4|A0A067DBS4_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g047027mg PE=4 SV=1
0.340083777904511 69.9400007724762 GSASLWLCYDKSGR
missed K-S@11 -0.0208264999091625 1541.70886230469 771.8617
1541.72961425781 771.872131347656 2 4 1.1.1.7084.2 1
42.5623 64.1223 42.3801

6 0.34 0.34 2.02300008386374 2.02300008386374 0
RRRRRtr|A0A067DBS4|A0A067DBS4_CITSI REVERSED Uncharacterized

protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g047027mg PE=4 SV=1

0 54.4799983501434 GSASLWLCYDKSGR missed K-S@11
 -0.0208264999091625 1541.70886230469 771.8617 1541.72961425781
 771.872131347656 2 4 1.1.1.7083.2 0 42.4715 64.1223
 42.3801

7 0.2 0.2 8.38000029325485 8.38000029325485 0

tr|A0A067GBD0|A0A067GBD0_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)

OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g038337mg PE=4 SV=1

0.199970632791519 59.2000007629395 LGGGAGDCGGVDSSR
 0.0824446976184845 1306.6396484375 654.3271 1306.55712890625
 654.285888671875 2 5 1.1.1.5569.2 1 31.4711 99.724
 31.4761

8 0.1 0.1 2.75699999183416 0 0

tr|A0A067FDM4|A0A067FDM4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g009095mg PE=4 SV=1 0.101823523640633

42.8099989891052 GAPPAAVSSVNSLPR -

0.0948567986488342 1421.66784667969 711.8412 1421.7626953125

711.888610839844 2 4 1.1.1.5721.2 1 32.641 49.0193
 32.646

8 0.1 0.1 2.75699999183416 0 0

tr|A0A067FDM4|A0A067FDM4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g009095mg PE=4 SV=1 0 20.0000002980232

GAPPAAVSSVNSLPR -0.0948567986488342

1421.66784667969 711.8412 1421.7626953125 711.888610839844 2
 4 1.1.1.5722.2 1 32.7313 49.0193 32.646

9 0.07 0.07 5.36300018429756 0 0

tr|A0A067H8T8|A0A067H8T8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus

sinensis GN=CISIN_1g036113mg PE=3 SV=1 0.0695604085922241

36.7599993944168 AAALTASQLATYDESKR missed K-R@16 -

0.090783603489399 1794.82043457031 898.4175 1794.9111328125

898.462890625 2 5 1.1.1.7760.4 1 58.6519 416.2756
 57.9902

10 0.05 0.05 1.01600000634789 0 0

tr|A0A067HGP8|A0A067HGP8_CITSI; tr|A0A067HGF3|A0A067HGF3_CITSI;
tr|A0A067HGE7|A0A067HGE7_CITSI; tr|A0A067H840|A0A067H840_CITSI;
tr|A0A067H5J0|A0A067H5J0_CITSI; tr|A0A067H543|A0A067H543_CITSI

Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1

0.0510982386767864 31.7799985408783 SAFFPYR

0.0863158032298088 886.520080566406 444.2673 886.433715820313

444.224151611328 2 4 1.1.1.5626.2 1 31.9542 14.9573

31.9592

10 0.05 0.05 1.01600000634789 0 0

tr|A0A067HGP8|A0A067HGP8_CITSI; tr|A0A067HGF3|A0A067HGF3_CITSI;
tr|A0A067HGE7|A0A067HGE7_CITSI; tr|A0A067H840|A0A067H840_CITSI;
tr|A0A067H5J0|A0A067H5J0_CITSI; tr|A0A067H543|A0A067H543_CITSI

Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005591mg PE=4 SV=1

0 31.7799985408783 SAFFPYR

0.089123398065567 886.522888183594 444.2687 886.433715820313

444.224151611328 2 4 1.1.1.5636.2 1 32.0937 14.7532

32.008

EK 3. Kütüden çeşidinden alınan spotun portakal veritabanı ile karşılaştırılması

N	Unused	Total	%Cov	%Cov(50)	%Cov(95)	Accessions	Names
	Used	Annotation	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
	dMass	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z	Sc
	Spectrum	Specific	Time	PrecursorSignal	PrecursorElution		
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						2 99.0000009536743
	TTIIGVTYNGGVVLGADSR cleaved G-T@N-term -						
	0.00207654992118478		1891.99829101563	947.0064	1892.00036621094		
	947.007446289063	2	13	1.1.1.5937.19	1	60.6123	1998.838
	60.8082						
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0.147520005702972
	28.8300007581711 SGSAADSQTVSDYVR						
	0.0074413800612092		1541.70324707031	771.8589	1541.69580078125		
	771.855163574219	2	10	1.1.1.5744.19	1	43.1001	14475.94
	42.1185						
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0.0385789051651955
	28.4299999475479 TVTINSEGVSR Deamidated(N)@5						
	0.0134277995675802		1162.59643554688	582.3055	1162.5830078125		
	582.298767089844	2	10	1.1.1.5694.10	1	38.5272	125.3322
	38.2951						
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0 28.8300007581711
	SGSAADSQTVSDYVR 0.00780759006738663						
	1541.70361328125	771.8591	1541.69580078125	771.855163574219	2		
	13	1.1.1.5738.20	1	42.5627	15311.06	42.1185	
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0 28.5600006580353
	SGSAADSQTVSDYVR 0.00548824993893504						
	1541.70129394531	771.8579	1541.69580078125	771.855163574219	2		
	7	1.1.1.5751.17	1	43.7268	943.9158	42.7522	
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0 28.5100013017654
	SGSAADSQTVSDYVR 0.00780759006738663						
	1541.70361328125	771.8591	1541.69580078125	771.855163574219	2		
	10	1.1.1.5736.18	1	42.3729	15311.06	42.1185	
1	2.25	2.25	53.3900022506714	8.05099979043007	8.05099979043007	8.05099979043007	
	tr A0A067FIM2 A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus						
sinensis	GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1						0 28.2900005578995
	SGSAADSQTVSDYVR 0.00780759006738663						

1541.70361328125 771.8591 1541.69580078125 771.855163574219 2
 9 1.1.1.5739.19 1 42.6487 15311.06 42.1185
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 27.4300009012222
 SGSAADSQTVSDYVR 0.00524410977959633
 1541.70104980469 771.8578 1541.69580078125 771.855163574219 2
 7 1.1.1.5748.20 1 43.4665 1738.927 42.4817
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 27.2700011730194
 SGSAADSQTVSDYVR 0.00780759006738663
 1541.70361328125 771.8591 1541.69580078125 771.855163574219 2
 8 1.1.1.5741.20 1 42.8332 15311.06 42.1185
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 99.0000009536743
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR cleaved G-T@N-term -
 0.00207654992118478 1891.99829101563 947.0064 1892.00036621094
 947.007446289063 2 14 1.1.1.5940.17 1 60.8781 1998.838
 60.8082
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 85.7299983501434
 TTIIGVTYNGGVVLGADSR cleaved G-T@N-term -
 0.00207654992118478 1891.99829101563 947.0064 1892.00036621094
 947.007446289063 2 11 1.1.1.5939.19 1 60.7949 1998.838
 60.8082
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 28.4000009298325
 TVTINSEGVSR Deamidated(N)@5 0.0134277995675802
 1162.59643554688 582.3055 1162.5830078125 582.298767089844 2
 10 1.1.1.5693.10 1 38.4246 125.3322 38.2951
 1 2.25 2.25 53.3900022506714 8.05099979043007 8.05099979043007
 tr|A0A067FIM2|A0A067FIM2_CITSI Proteasome subunit beta type OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g026587mg PE=3 SV=1 0 27.4300009012222
 TVTINSEGVSR 0.00891796965152025 1161.60791015625
 581.8112 1161.59899902344 581.806762695313 2 9
 1.1.1.5689.9 1 38.0684 631.8396 37.8456
 2 2 28.2499998807907 3.95499989390373 3.95499989390373
 tr|A0A067G907|A0A067G907_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g018573mg PE=4 SV=1 2 99.0000009536743
 TDSAQVSPVAESVK cleaved N-T@N-term 0.0643830001354218
 1416.77404785156 709.3943 1416.70959472656 709.362121582031 2
 8 1.1.1.5905.7 1 57.6511 493.0209 57.7144
 3 0.19 0.19 8.82000029087067 0 0
 tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1 0.115204632282257
 27.6800006628037 ISYSGVDVEFTR 0.00480325985699892

1371.671875 686.8432 1371.6669921875 686.8408203125 2 8
1.1.1.5870.11 1 54.4976 1291.814 54.2716
3 0.19 0.19 8.82000029087067 0 0
tr|A0A067DYM8|A0A067DYM8_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g003209mg PE=4 SV=1 0.0788339450955391
19.9699997901917 LSGNPSDVYQPLGDIK -
9.19090016395785E-05 1701.85729980469 851.9359 1701.857421875
851.935974121094 2 7 1.1.1.5872.17 1 54.7044 810.4251
54.6351
4 0.15 0.15 36.4199995994568 0 0
tr|A0A067H1T8|A0A067H1T8_CITSI; tr|A0A067H1C8|A0A067H1C8_CITSI
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg
PE=4 SV=1; Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1 0.118045032024384
28.5899996757507 AFRDTIDLFVER missed R-D@3
0.00219882000237703 1480.76965332031 741.3921 1480.76745605469
741.390991210938 2 9 1.1.1.5947.12 1 61.4969 1233.187
61.3569
4 0.15 0.15 36.4199995994568 0 0
tr|A0A067H1T8|A0A067H1T8_CITSI; tr|A0A067H1C8|A0A067H1C8_CITSI
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249171mg
PE=4 SV=1; Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g0249171mg PE=4 SV=1 0 26.7800003290176
AFRDTIDLFVER missed R-D@3 0.00219882000237703
1480.76965332031 741.3921 1480.76745605469 741.390991210938 2
9 1.1.1.5945.10 1 61.3061 1233.187 61.3569
5 0.14 0.15 59.5200002193451 0 0
tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1
0.143875554203987 33.9599996805191 ALIVDDLVAATGGTLSAAIR
0.000366018008207902 1855.04187011719 928.5282
1855.04150390625 928.528015136719 2 12 1.1.1.6066.12 1
72.3475 2849.017 72.2095
5 0.14 0.15 59.5200002193451 0 0
tr|A0A067GP70|A0A067GP70_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0249172mg PE=4 SV=1 0
33.9599996805191 ALIVDDLVAATGGTLSAAIR
0.000366018008207902 1855.04187011719 928.5282 1855.04150390625
928.528015136719 2 13 1.1.1.6063.10 1 72.0675 2849.017
72.2095
6 0.11 0.11 11.5299999713898 0 0
tr|A0A067DVM7|A0A067DVM7_CITSI; tr|A0A067DRH5|A0A067DRH5_CITSI
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000290mg PE=4 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000290mg PE=4 SV=1
0.11069829761982 28.2099992036819 ISGVNYTAEMPGR
Oxidation(M)@10 missed K-R@12 0.0352135002613068 1480.76965332031
741.3921 1480.734375 741.37451171875 2 8 1.1.1.5944.11 1
61.2189 1233.187 61.3569
7 0.11 0.11 14.2599999904633 0 0
RRRRRtr|A0A067FPG0|A0A067FPG0_CITSI;

RRRRRtr|A0A067FDC6|A0A067FDC6_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005470mg PE=3 SV=1; REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g005470mg PE=3 SV=1
 0.106238231062889 27.4599999189377 GGFGGRGGGGFR missed R-
 G@6 0.00977692008018494 1080.53112792969 541.2728 1080.52136230469
 541.267944335938 2 9 1.1.1.5764.7 1 44.8666 7823.573
 44.7491

8 0.11 0.11 11.1299999058247 0 0
 tr|A0A067FDT7|A0A067FDT7_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g001970mg PE=4 SV=1 0.11069829761982
 28.6900013685226 APRLEESVAANNDR missed R-L@3
 0.0246485993266106 1540.78405761719 771.3993 1540.75939941406
 771.386962890625 2 5 1.1.1.5864.16 1 53.9719 124.2454
 53.9064

9 0.11 0.11 11.540000140667 0 0
 tr|A0A067FUK0|A0A067FUK0_CITSI Mitogen-activated protein kinase
 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017909mg PE=3 SV=1
 0.105130344629288 27.7300000190735 GAYGVVCSSINR
 0.0296934992074966 1224.62182617188 613.3182 1224.59216308594
 613.303344726563 2 4 1.1.1.5683.10 1 37.5376 543.8414
 37.3961

10 0.11 0.11 18.2099997997284 0 0
 RRRRRtr|A0A067GYT2|A0A067GYT2_CITSI REVERSED Polyadenylate-
 binding protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g006641mg PE=3 SV=1
 0.106238231062889 28.1599998474121 AAAEQLVAMAEAVK
 Oxidation(M)@9 0.0457560010254383 1416.77404785156 709.3943
 1416.72827148438 709.371398925781 2 7 1.1.1.5905.7 0
 57.6511 493.0209 57.7144

11 0.11 0.11 6.54899999499321 0 0
 RRRRRtr|A0A067GQV0|A0A067GQV0_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g001185mg PE=4 SV=1
 0.1056839376688 28.3199995756149 DGLSCQSIIGPDSTEK
 0.016389599069953 1648.77783203125 825.3962 1648.76147460938
 825.388000488281 2 4 1.1.1.5696.21 1 38.7417 40.4579
 38.656

12 0.11 0.11 8.89900028705597 0 0
 RRRRRtr|A0A067EM33|A0A067EM33_CITSI;
 RRRRRtr|A0A067ELC5|A0A067ELC5_CITSI;
 RRRRRtr|A0A067ELC0|A0A067ELC0_CITSI;
 RRRRRtr|A0A067E9W9|A0A067E9W9_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002103mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002103mg PE=4 SV=1; REVERSED
 Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002103mg PE=4 SV=1;
 REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002103mg PE=4
 SV=1 0.106238231062889 28.6399990320206 SLIEMESEIAAR
 -0.0364094004034996 1347.63403320313 674.8243
 1347.67041015625 674.842468261719 2 6 1.1.1.5730.14 1
 41.8102 57.1168 41.753

13 0.11 0.11 17.509999871254 0 0
 tr|A0A067F1F3|A0A067F1F3_CITSI; tr|A0A067F0M4|A0A067F0M4_CITSI;

tr|A0A067F0L9|A0A067F0L9_CITSI ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022551mg PE=3 SV=1; ATP-dependent Clp protease
proteolytic subunit OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022551mg PE=3 SV=1; ATP-
dependent Clp protease proteolytic subunit OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022551mg
PE=3 SV=1 0.105130344629288 28.7499994039536 IEGQATDVEIAR
0.00650251982733607 1300.66882324219 651.3417
1300.66235351563 651.338439941406 2 10 1.1.1.5720.10 1
40.8849 157.3434 40.9316

14 0.1 0.11 19.0699994564056 0 0
tr|A0A067DXX7|A0A067DXX7_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0022652mg PE=4 SV=1
0.0969100147485733 27.1299988031387 DYNMDK
0.0945148020982742 784.400695800781 393.2076 784.30615234375
393.160339355469 2 3 1.1.1.5751.4 1 43.6726 263.2021
43.7484

15 0.1 0.11 13.9699995517731 0 0
RRRRRtr|A0A067FYR4|A0A067FYR4_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010784mg PE=4 SV=1
0.0969100147485733 27.4100005626678 DSLTSVPGNHGKFCR
missed K-F@12 0.0191635992377996 1616.79211425781 809.4033
1616.77294921875 809.393737792969 2 7 1.1.1.5745.20 1
43.1948 931.8778 43.1135

16 0.1 0.11 14.6999999880791 0 0
tr|A0A067GWU8|A0A067GWU8_CITSI; tr|A0A067GM97|A0A067GM97_CITSI
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013125mg PE=3 SV=1;
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013125mg PE=3 SV=1
0.0958256274461746 27.3499995470047 VMPMRTDK missed R-
T@5 0.0478161014616489 976.53125 489.2729 976.4833984375
489.248992919922 2 4 1.1.1.5715.4 1 40.4118 84.9782
40.4751

17 0.1 0.11 9.9200002849102 0 0
RRRRRtr|A0A067HGH2|A0A067HGH2_CITSI;
RRRRRtr|A0A067HG75|A0A067HG75_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H591|A0A067H591_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1
0.0996328666806221 28.4799993038177 GEADEIKRDAEPK
missed K-R@8; missed R-D@9 0.0287034008651972 1585.787109375
793.9008 1585.75842285156 793.886474609375 2 7
1.1.1.5805.20 1 48.6174 2177.616 48.3535

17 0.1 0.11 9.9200002849102 0 0
RRRRRtr|A0A067HGH2|A0A067HGH2_CITSI;
RRRRRtr|A0A067HG75|A0A067HG75_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H591|A0A067H591_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1
0 27.5400012731552 GEADEIKRDAEPK missed K-
R@8; missed R-D@9 0.0287034008651972 1585.787109375 793.9008

1585.75842285156 793.886474609375 2 8 1.1.1.5808.19 1
48.8864 900.1209 48.8997
17 0.1 0.11 9.9200002849102 0 0
RRRRRtr|A0A067HGH2|A0A067HGH2_CITSI;
RRRRRtr|A0A067HG75|A0A067HG75_CITSI;
RRRRRtr|A0A067H591|A0A067H591_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1; REVERSED
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004536mg PE=4 SV=1
0 26.2899994850159 GEADEIKRDAEPK missed K-
R@8; missed R-D@9 0.0287034008651972 1585.787109375 793.9008
1585.75842285156 793.886474609375 2 6 1.1.1.5809.19 1
48.9775 900.1209 48.8997
18 0.1 0.11 8.57900008559227 0 0
RRRRRtr|A0A067DNC5|A0A067DNC5_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017332mg PE=3 SV=1
0.0958256274461746 28.3699989318848 TGSTSIALTDR
0.00482743000611663 1120.57727050781 561.2959 1120.57238769531
561.29345703125 2 7 1.1.1.5805.9 1 48.5716 164.1813
48.5357
19 0.1 0.11 11.9000002741814 0 0
RRRRRtr|A0A067HBN0|A0A067HBN0_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012334mg PE=4 SV=1
0.0952844545245171 28.5299986600876 CSLQAMIPNSADALPTLRMR
missed R-M@18 -0.0512313991785049 2187.04541015625 1094.53
2187.09619140625 1094.55541992188 2 8 1.1.1.5945.21 1
61.3519 445.0482 61.2655
19 0.1 0.11 11.9000002741814 0 0
RRRRRtr|A0A067HBN0|A0A067HBN0_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012334mg PE=4 SV=1 0
28.0299991369247 CSLQAMIPNSADALPTLRMR missed R-M@18
-0.0512313991785049 2187.04541015625 1094.53 2187.09619140625
1094.55541992188 2 8 1.1.1.5942.20 1 61.0734 445.0482
61.2655
20 0.09 0.11 10.3000000119209 0 0
tr|A0A067DX48|A0A067DX48_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g014297mg PE=4 SV=1 0.0867160931229591
26.9699990749359 TGDATMAENDMK 0.0947159007191658
1282.61169433594 642.3131 1282.51696777344 642.265747070313 2
4 1.1.1.5784.9 1 46.6731 1565.108 46.4583
21 0.09 0.11 15.7499998807907 0 0
tr|A0A067GAG0|A0A067GAG0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g005854mg PE=4 SV=1 0.0867160931229591
27.2399991750717 NYAYSYPGESSPGFTKCLGSIWTGKER
missed K-C@17; missed K-E@26 -0.0902135968208313 3084.33813476563
1029.12 3084.4287109375 1029.15014648438 3 8
1.1.1.5926.20 1 59.6118 291.0314 59.5296
22 0.09 0.11 10.9999999403954 0 0
tr|A0A067DJ78|A0A067DJ78_CITSI Beta-hexosaminidase OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g007722mg PE=3 SV=1 0.0851281806826591

27.1299988031387 TYQVFK -0.0112709002569318
 784.400695800781 393.2076 784.411926269531 393.213256835938 2
 3 1.1.1.5751.4 1 43.6726 263.2021 43.7484
 23 0.09 0.11 6.48899972438812 0 0
 tr|A0A067FPM2|A0A067FPM2_CITSI; tr|A0A067FGY1|A0A067FGY1_CITSI;
 tr|A0A067FDI0|A0A067FDI0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g009821mg PE=3 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g009821mg PE=3 SV=1; Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g036874mg PE=3 SV=1 0.0856568440794945
 27.5700002908707 IGDFRGNNFNYPFGSGRR missed R-G@5;
 missed R-R@18 -0.0119316997006536 2186.0654296875 1094.04
 2186.07690429688 1094.04577636719 2 7 1.1.1.5929.18 1
 59.8771 242.5246 59.8035
 24 0.09 0.11 4.53599989414215 0 0
 tr|A0A067F9V1|A0A067F9V1_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g006673mg PE=4 SV=1 0.0861861482262611
 28.0000001192093 GAVSDLPLDLT cleaved T-N@C-term -
 0.002674609888345 1196.62622070313 599.3204 1196.62890625
 599.321716308594 2 4 1.1.1.5822.8 1 50.1186 36.0814
 49.9948
 25 0.09 0.11 7.99999982118607 0 0
 RRRRRtr|A0A067ENT9|A0A067ENT9_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007521mg PE=4 SV=1
 0.0851281806826591 28.0499994754791 LLFPWTKDNPLVMEESPR
 Oxidation(M)@13 missed K-D@7 -0.0584084987640381
 2187.04541015625 1094.53 2187.103515625 1094.55895996094 2
 8 1.1.1.5943.20 1 61.1649 445.0482 61.2655
 26 0.09 0.11 6.38300031423569 0 0
 RRRRRtr|A0A067FBX1|A0A067FBX1_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g029755mg PE=4 SV=1
 0.0861861482262611 28.7999987602234 VSELLEMAQQVK
 0.0499828010797501 1373.7724609375 687.8935 1373.72241210938
 687.868530273438 2 6 1.1.1.5864.13 1 53.9594 3673.6
 52.9941
 27 0.08 0.11 15.4499992728233 0 0
 tr|A0A067H5E8|A0A067H5E8_CITSI 60S ribosomal protein L36 OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g033850mg PE=3 SV=1 0.0788339450955391
 27.1299988031387 RVHFVK missed R-V@1 -
 0.070123203098774 784.400695800781 393.2076 784.470764160156
 393.24267578125 2 3 1.1.1.5751.4 1 43.6726 263.2021
 43.7484
 28 0.08 0.11 11.4000000059605 0 0
 tr|A0A067FQ90|A0A067FQ90_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g027111mg PE=4 SV=1 0.0772745460271835
 27.0300000905991 ELNENNIPLNVNR 0.00413515977561474
 1552.78869628906 777.4016 1552.78454589844 777.399536132813 2
 6 1.1.1.5830.21 1 50.9024 238.2163 50.8172
 29 0.08 0.11 7.82399997115135 0 0
 RRRRRtr|A0A067EJ23|A0A067EJ23_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g048535mg PE=3 SV=1

0.0783135294914246 27.6199996471405 MGHESDLSIR
0.0617858991026878 1143.59606933594 572.8053 1143.53430175781
572.7744140625 2 3 1.1.1.5692.10 1 38.3342 945.1697
37.8456

30 0.08 0.11 2.16499995440245 0 0
tr|A0A067EKE6|A0A067EKE6_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g012488mg PE=4 SV=1 0.0783135294914246
27.8899997472763 WDKTYWPTYK missed K-T@3
0.0986573025584221 1386.75952148438 694.387 1386.66088867188
694.337707519531 2 5 1.1.1.5827.12 1 50.5921 142.6021
50.6346

31 0.08 0.11 8.55299979448318 0 0
RRRRRtr|A0A067FN49|A0A067FN49_CITSI;
RRRRRtr|A0A067FEQ7|A0A067FEQ7_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g031759mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g031759mg PE=4 SV=1
0.075203999876976 27.3000001907349 GNAYRGFIVSGAK missed R-
G@5 0.0174634996801615 1338.72192382813 670.3682 1338.70446777344
670.359497070313 2 4 1.1.1.5862.3 1 53.7351 73.482
53.7241

32 0.07 0.1 18.0999994277954 0 0
RRRRRtr|A0A067FRQ4|A0A067FRQ4_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g008986mg PE=4 SV=1
0.0721165910363197 26.7300009727478 HIAAFVK -
0.0588897988200188 784.400695800781 393.2076 784.459533691406
393.237060546875 2 3 1.1.1.5751.4 1 43.6726 263.2021
43.7484

33 0.07 0.1 19.3299993872643 0 0
tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1 0.0716041475534439
26.9199997186661 LGGLNAYVTGSPDSK
0.00601512985303998 1477.74731445313 739.8809 1477.74133300781
739.8779296875 2 8 1.1.1.5810.18 1 49.0643 498.1208
49.0818

33 0.07 0.1 19.3299993872643 0 0
tr|A0A067G5J2|A0A067G5J2_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g026476mg PE=4 SV=1 0 19.4700002670288
LGGLNAYVTGSPDSK 0.00601512985303998
1477.74731445313 739.8809 1477.74133300781 739.8779296875 2
6 1.1.1.5811.16 1 49.1472 498.1208 49.0818

34 0.07 0.1 22.4199995398521 0 0
RRRRRtr|A0A067F501|A0A067F501_CITSI REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g020162mg PE=4 SV=1
0.0690509676933289 26.7300009727478 YAGTVFK -
0.0112709002569318 784.400695800781 393.2076 784.411926269531
393.213256835938 2 3 1.1.1.5751.4 1 43.6726 263.2021
43.7484

35 0.07 0.1 4.6339999884367 0 0
RRRRRtr|A0A067GV88|A0A067GV88_CITSI;
RRRRRtr|A0A067GSJ7|A0A067GSJ7_CITSI REVERSED Uncharacterized protein

OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g015255mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g015255mg PE=4 SV=1
0.0685421302914619 26.8599987030029 ESKSRQAP cleaved P-M@C-term; missed K-S@3; missed R-Q@5 -0.0184720996767282 901.443298339844
451.7289 901.461730957031 451.738159179688 2 4
1.1.1.5741.6 1 42.7749 542.2385 42.4817
36 0.07 0.1 2.08700001239777 0 0
tr|A0A067EVI9|A0A067EVI9_CITSI Uncharacterized protein (Fragment)
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0418212mg PE=4 SV=1
0.0670191794633865 26.8099993467331 AELLDTGNLVLK -
0.0394905991852283 1284.689453125 643.352 1284.72888183594
643.371765136719 2 4 1.1.1.5831.17 1 50.9759 557.1862
50.8172
37 0.07 0.09 21.5200006961823 0 0
RRRRRtr|A0A067EKE2|A0A067EKE2_CITSI REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g040033mg PE=4 SV=1
0.0655015483498573 26.5899986028671 CTTQNTT cleaved T-P@C-term 0.0938891991972923 767.405883789063 384.7102 767.311950683594
384.663269042969 2 4 1.1.1.5686.3 1 37.7656 10851.1
37.1268
38 0.06 0.09 11.8299998342991 0 0
RRRRRtr|A0A067D9C2|A0A067D9C2_CITSI REVERSED Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0418671mg PE=4 SV=1
0.0644927322864532 26.6400009393692 FNNNSIDLMGLR Oxidation(M)@9
0.0605017989873886 1408.73742675781 705.376 1408.67687988281
705.345703125 2 4 1.1.1.5811.13 1 49.1347 507.666
48.8997
39 0.06 0.08 17.739999294281 0 0
tr|A0A067H2G5|A0A067H2G5_CITSI; tr|A0A067GST9|A0A067GST9_CITSI
Importin subunit alpha OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009184mg PE=3 SV=1; Importin subunit alpha OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009184mg PE=3 SV=1
0.0619809031486511 26.2600004673004 VAVDADEGRRR missed R-R@9; missed R-R@10 0.0923068001866341 1242.73522949219 622.3749
1242.64294433594 622.328735351563 2 5 1.1.1.5747.10 1
43.3342 346.9941 43.2943
40 0.06 0.08 13.5900005698204 0 0
tr|A0A067GYG4|A0A067GYG4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004971mg PE=4 SV=1 0.0604807436466217
26.0399997234344 LTQNSFEDGTPAWGPR
0.00173504999838769 1774.82922363281 888.4219 1774.82751464844
888.421020507813 2 7 1.1.1.5852.20 1 52.8938 282.1992
52.903
41 0.06 0.08 5.24099990725517 0 0
tr|A0A067GHU5|A0A067GHU5_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000515mg PE=4 SV=1 0.0594835169613361
26.0899990797043 VSNSGRGQSVVER missed R-G@6
0.0716613009572029 1373.77282714844 687.8937 1373.701171875
687.857849121094 2 5 1.1.1.5823.12 1 50.2268 569.8966
50.1778

42 0.06 0.08 11.4799998700619 0 0
tr|A0A067EVB0|A0A067EVB0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g008899mg PE=4 SV=1 0.0599818415939808
26.5300005674362 TTLCYDKDGETYR missed K-D@7
0.000317013007588685 1563.68786621094 782.8512 1563.6875
782.851013183594 2 6 1.1.1.5734.19 1 42.1955 340.848
42.1185

43 0.06 0.08 4.5159999281168 0 0
tr|A0A067GTE0|A0A067GTE0_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g004074mg PE=4 SV=1 0.057991947978735
26.3099998235703 LGITSSRAALTER missed R-A@7
0.0101236999034882 1373.77282714844 687.8937 1373.7626953125
687.888610839844 2 4 1.1.1.5824.10 1 50.3098 569.8966
50.1778

44 0.06 0.08 2.86400001496077 0 0
RRRRRtr|A0A067EFS8|A0A067EFS8_CITSI;
RRRRRtr|A0A067EEY0|A0A067EEY0_CITSI;
RRRRRtr|A0A067E7C3|A0A067E7C3_CITSI;
RRRRRtr|A0A067E3Y5|A0A067E3Y5_CITSI REVERSED Uncharacterized protein
OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013352mg PE=4 SV=1; REVERSED Uncharacterized
protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013352mg PE=4 SV=1; REVERSED
Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013352mg PE=4 SV=1;
REVERSED Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013352mg PE=4
SV=1 0.056505486369133 26.1500000953674 LGTGLVIVDYEE
cleaved E-D@C-term 0.0212149005383253 1306.68688964844 654.3507
1306.66564941406 654.340087890625 2 4 1.1.1.5858.13 1
53.412 129.838 53.3591

45 0.06 0.07 9.17399972677231 0 0
tr|A0A067GL45|A0A067GL45_CITSI; tr|A0A067G971|A0A067G971_CITSI
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0002122mg
PE=4 SV=1; Uncharacterized protein (Fragment) OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g0002122mg PE=4 SV=1 0.0550240911543369
26.010000705719 VADRAKKKRFR missed R-A@4; missed K-K@6;
missed K-K@7; missed K-R@8; missed R-F@9 -0.0639847964048386
1373.77282714844 687.8937 1373.83679199219 687.925659179688 2
4 1.1.1.5824.10 1 50.3098 569.8966 50.1778

46 0.05 0.07 25.3500014543533 0 0
tr|A0A067FZG4|A0A067FZG4_CITSI; tr|A0A067FYT4|A0A067FYT4_CITSI;
tr|A0A067FML4|A0A067FML4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g006162mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g006162mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
GN=CISIN_1g006162mg PE=4 SV=1 0.0515870377421379
24.9799996614456 LGPKIDEEHSPAK missed K-I@4 -
0.0403853990137577 1419.69543457031 710.855 1419.73583984375
710.875183105469 2 3 1.1.1.5748.15 1 43.4456 304.14
43.3849

47 0.05 0.07 21.3100001215935 0 0
tr|A0A067HAA3|A0A067HAA3_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
sinensis GN=CISIN_1g005888mg PE=4 SV=1 0.0525662787258625

25.7499992847443 GASMQLGAESAK 0.0696635022759438
 1148.61926269531 575.3169 1148.54956054688 575.282043457031 2
 5 1.1.1.5828.12 1 50.6838 127.5588 50.6346
 48 0.05 0.07 11.7600001394749 0 0
 tr|A0A067ECN4|A0A067ECN4_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g010459mg PE=4 SV=1 0.0496351458132267
 24.9799996614456 GIDSVVREMESAK missed R-E@7 -
 0.00737076997756958 1419.69543457031 710.855 1419.70275878906
 710.858642578125 2 3 1.1.1.5748.15 1 43.4456 304.14
 43.3849
 49 0.05 0.07 18.7700003385544 0 0
 tr|A0A067ET98|A0A067ET98_CITSI; tr|A0A067ESF2|A0A067ESF2_CITSI;
 tr|A0A067ESE6|A0A067ESE6_CITSI; tr|A0A067EJS2|A0A067EJS2_CITSI;
 tr|A0A067EJR7|A0A067EJR7_CITSI; tr|A0A067EGB9|A0A067EGB9_CITSI;
 tr|A0A067EG27|A0A067EG27_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g012534mg PE=4 SV=1 0.0506099946796894
 25.9200006723404 YFSKVASAHGKTDNELSK missed K-V@4; missed
 K-T@11 0.0782421976327896 1981.06872558594 661.3635 1980.99047851563
 661.337463378906 3 7 1.1.1.5815.10 1 49.4872 290.3502
 49.0818
 50 0.05 0.07 20.8499997854233 0 0
 RRRRRtr|A0A067DPQ1|A0A067DPQ1_CITSI REVERSED Uncharacterized
 protein (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0381501mg PE=4 SV=1
 0.0481769628822804 25.33999979496 LAELLLQNDENK -
 0.0329709984362125 1398.70251464844 700.3585 1398.73547363281 700.375
 2 7 1.1.1.5823.13 1 50.231 277.282 50.0863
 51 0.05 0.07 15.1999995112419 0 0
 tr|A0A067DW67|A0A067DW67_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g022042mg PE=3 SV=1 0.0481769628822804
 25.670000910759 YSPPETDEIAAR 0.00334697007201612
 1347.63403320313 674.8243 1347.63061523438 674.822631835938 2
 5 1.1.1.5730.14 1 41.8102 57.1168 41.753
 52 0.05 0.07 10.9999999403954 0 0
 tr|A0A067DMA7|A0A067DMA7_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus
 sinensis GN=CISIN_1g035534mg PE=4 SV=1 0.0476919896900654
 25.9799987077713 AGTGTAMFSMGELGEK
 0.0754538998007774 1585.787109375 793.9008 1585.71166992188
 793.863098144531 2 6 1.1.1.5809.19 1 48.9775 900.1209
 48.8997
 53 0.05 0.07 5.07900007069111 0 0
 tr|A0A067H766|A0A067H766_CITSI; tr|A0A067H4K8|A0A067H4K8_CITSI;
 tr|A0A067H446|A0A067H446_CITSI Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g013999mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis
 GN=CISIN_1g013999mg PE=4 SV=1; Uncharacterized protein OS=Citrus sinensis

GN=CISIN_1g013999mg PE=4 SV=1 0.0457574911415577
25.5800008773804 TGVNEPAASESAESLR
0.0245987009257078 1616.78881835938 809.4017 1616.76416015625
809.389343261719 2 7 1.1.1.5771.13 1 45.547 528.6757
45.4705