

Bazı altıntop (*Citrus paradisi*) ve şadoklarda (*Citrus maxima*) genetik akrabalık ve farklılıklarının SSR markırlarıyla tanımlanması

Identification of diversity and relationships of grapefruit (*Citrus paradisi*) and pummelo (*Citrus maxima*) accessions by using SSR molecular markers

İlknur POLAT, Ertuğrul TURGUTOĞLU

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 07100, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): İ. Polat, e-posta (e-mail): i_polat@hotmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 09 Aralık 2011
Düzeltilme tarihi 16 Nisan 2012
Kabul tarihi 20 Nisan 2012

Anahtar Kelimeler:

Citrus paradisi
Citrus maxima
SSR,
Genetik akrabalık
Genetik farklılık

ÖZ

Seleksiyon ve introduksiyon yoluyla elde edilmiş 30 adet altıntop (*Citrus paradisi* Macf.), 1 adet *Citrus hassaku* ve 5 adet şadok [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.]'un genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığını belirlemek amacıyla SSR (simple sequence repeat) moleküler markır tekniği kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 26 adet SSR primerinden 15 tanesi polimorfizm sağlamıştır. UPGMA (unweighted-pair group method arithmetic average) dendrogram ve PCA (principal component analysis) analizleri sonucu bireylerin birbirleriyle olan genetik yakınlıkları ve uzaklıkları belirlenmiştir. Dice (1945)'in benzerlik katsayısına göre benzerlik oranları 0,60-0,97 arasında değişim göstermiş, matrix korelosyonu (r) 0,88 olarak bulunmuştur. Değerlendirme sonucunda, Foster B 6/5 28-12 ile Ray Ruby altıntopu arasında incelenen primerlere göre % 97 oranında bir benzerlik olduğu saptanmış, Red Şadok ise % 60 oranıyla en uzak bireyi oluşturmuştur. Çalışmada kullanılan tüm şadoklar bir grup içerisinde yer almıştır. Buna karşın şadok grubu içerisinde bazı altıntopların da yer aldığı belirlenmiştir. Bu durumun altıntopların şadok ile portakal melezi olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Bazı altıntoplarda ise genetik yakınlık oldukça fazladır. Düşük varyasyon göstermesinin sebebi, altıntopların mutasyon orijinli olmasından kaynaklanabilir.

ARTICLE INFO

Received 09 December 2011
Received in revised form 16 April 2012
Accepted 20 April 2012

Keywords:

Citrus paradisi
Citrus maxima
SSR
Genetic relationship
Genetic distinguish

ABSTRACT

In this study, genetic relationship and diversity were determined by SSR (simple sequence repeat) markers among thirty grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.), one *Citrus hassaku* and five pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] accessions derived from selections and introduction. Of the 26 SSR primers used produced fifteen polymorphic fragments. Genetic relationship and distance were determined by using UPGMA (unweighted-pair group method arithmetic average) dendrogram and PCA (principal component analysis) analysis. The Dice (1945)'s similarity coefficient among grapefruit and pummelo accessions ranged from 0.60 to 0.97 and matrix correlation (r) was 0.88. The analyses showed that there was 97% genetic similarity in terms of primers investigated between Foster B 6/5 28-12 and Ray Ruby grapefruit. On the contrary, Red Şadok with 60% of genetic similarity was the farthest among 36 accessions. All pummelos were took place within one group. But, some grapefruits also nested in the pummelos group. This result may be due to the grapefruits are natural hybrid between pummelo and sweet orange. Genetic variation was quite low in some grapefruit accessions. Similarity-based analyses supported the theory of grapefruits are of nucellar origin.

1. Giriş

Ülkemiz 2010 yılı verilerine göre altıntop 213,768 ton üretim rakamı ile toplam turuncgil üretiminin % 5,98'ini oluşturmaktadır (TUİK 2010). Ülkemizde üretilen altıntopun yaklaşık % 72,5'u ihraç edilmektedir (AKİB 2010).

Altıntopun (*Citrus paradisi* Macf.), şadok [*C. maxima* (Burm.) Merr.] ile portakalın (*C. sinensis* L.) doğal melezlenmesi sonucu elde edildiği bildirilmiştir (Barrett ve Rhodes 1976; Scora ve

ark. 1982; Nicolosi ve ark. 2000). Pek çok altıntop çeşidinin de, limonlarda olduğu gibi, melez altıntop ağacının somaklonal varyasyonu sonucunda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Nicolosi ve ark. 2000).

Turuncgillerde genetik tanımlama çalışmaları yapmak oldukça zordur. Bunun sebepleri arasında türler hatta cinsler arası melezlenmeler, poliembrion, apomiksis oranının oldukça

yüksek olması yer almaktadır. Bununla birlikte, somatik mutasyonların vejetatif çoğaltmayla korunması, yüzyıllardır yapılan turunçgil kültürü ve buna bağlı olarak primitif turunçgil türlerinin kaybolmuş olmasından kaynaklanmaktadır. Tanımlama çalışmalarında, morfolojik ve bazı kimyasal özellikler ile çevre koşullarına ve ağacın gelişim dönemine göre değişiklik gösterebilmekte ve genotipler arasında karakterler bakımından varyasyon düşük olabilmektedir. Bu nedenle, genetik materyallerin toplanması, toplanan materyallerin morfolojik, pomolojik, fenolojik ve biyokimyasal özelliklerinin bilinmesinin yanında genetik özelliklerinin de bilinmesi çok büyük önem arz etmektedir (Nicolosi ve ark. 2000; Bretó ve ark. 2001; Corazza-Nunes ve ark. 2002; Barkley ve ark. 2006).

SSR (simple sequence repeats) markırlar, genomda bol olması, yüksek polimorfizm göstermesi, Mendel kalıtımına uygunluğu, kodominantlık ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olmasından dolayı taksonomik çalışmaları yürütmek, yakın akraba grupları içerisinde filogenetik sınıflandırmayı yapmak, parmakizi oluşturmak, gen kaynakları koleksiyonlarında genetik farklılıkları belirlemek amacıyla, özellikle turunçgillerde de son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. SSR'lar, 1-10 (genellikle 3-6) baz çifti arasında, kısa diziler halinde genomda rastgele dağılmış tekrar dizileridir (Barkley ve ark. 2006; Jiang ve ark. 2006; Novelli ve ark. 2006; Shanker ve ark. 2007; Tan ve ark. 2007).

Turunçgillerde genetik kaynaklarda bulunan bireylerde parmakizi oluşturmak, genetik farklılığı belirlemek ve filogenetik ilişkiyi tespit etmek amacıyla SSR markırlar kullanılmıştır. Mesela; Barkley ve ark. (2006) turunçgil gen kaynaklarında bulunan, 4 adet altıntop ve 13 adet şadok melezinin de yer aldığı 370 adet turunçgilin, moleküler tanımlamasını ve genetik farklılığını belirlemek, populasyon yapısını tespit etmek amacıyla SSR markırlarını kullanmışlardır. Portakallarda genetik karakterizasyon çalışması yapmak amacıyla Novelli ve ark. (2006), SSR markırlarını kullanmışlardır. Jiang ve ark. (2006), portakal (*C. sinensis*), üçyapraklı [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] ve bazı turunçgil çeşitlerinde, Golein ve ark. (2006) limonlarda, karakterizasyon ve genetik tanımlama yapmak amacıyla SSR primeri kullanmışlardır. Uzun ve ark. (2010a), SRAP markırlarla birlikte SSR markırlar da kullanılarak, 45 limon (*C. limon* L.), 5 citron (*C. medica* L.), 4 kaba limon (*C. jambhiri* Lush.) ve 2 *C. volkameriana* (Tan. and Pasq.) arasında genetik tanımlama çalışması yapmışlardır. İncesu ve ark. (2011), seleksiyonla elde edilmiş 21 adet Satsuma mandarininde genetik tanımlama yapmak amacıyla 9 RAPD primeri ile birlikte 14 SSR primeri kullanmışlardır.

Altıntop ve şadoklarda moleküler tanımlama çalışmaları incelendiğinde az sayıda çalışma yapılmış olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan bir tanesinde, genetik varyabilitiyi belirlemek amacıyla, 38 altıntop (*C. paradisi*) ve 3 şadok (*C. maxima*) ele alınarak, 21 RAPD primeri ve 20 SSR primeri kullanılmıştır (Corazza-Nunes ve ark. 2002). Bir diğer çalışmada, Uzun ve ark.(2010b), Poorman dışında çalışmamızda da kullanmış olduğumuz 30 adet altıntop, 1 adet *C. hassaku* (Hort. ex Tanaka) ve 5 adet şadokun genetik tanımlamasını yapmak amacıyla ISSR markırlarını kullanmışlardır.

Bu çalışmada, seleksiyon ve introduksiyon yoluyla elde edilmiş 30 adet altıntop (*C. paradisi*), 1 adet *C. hassaku* ve 5 adet şadok (*C. maxima*)'un genetik farklılık ve birbiriyle olan genetik yakınlıkları SSR (simple sequence repeat) moleküler markır kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki materyalleri

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi "Tuzcu Turunçgil Koleksiyonu"nda bulunan 30 adet altıntop (*C. paradisi*), 1 adet *C. hassaku* ve 5 adet şadok (*C. maxima*) kullanılmıştır. DNA örnekleri, TÜBİTAK tarafından desteklenen 106G049 nolu proje kapsamında, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Bu materyallerin isimleri Çizelge 1'de verilmiştir.

2.2. Simple sequence repeats (SSRs) primerleri

SSR primerleri, Roose ve ekibi tarafından tespit edilmiş olan ve liste halinde sunulan internet sitesinden belirlenmiştir (Roose 2009). Çalışmada kullanılan 26 primerin ismi ve baz dizilimi Çizelge 2'de verilmiştir.

2.3. PCR reaksiyon ve amplifikasyon koşulları

Bütün PCR reaksiyonları 10 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon koşulları, Polat (2009)'ın, Barkley ve ark. (2006)'nın mevcut çalışmalarından bir takım modifikasyonlar yaparak oluşturduğu yöntemle göre yapılmıştır. Kullanılan reaksiyon koşulu aşağıda verilmiştir. PCR bileşenleri olarak toplam hacim 10 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenlerden meydana gelmiştir. Reaksiyon koşulu 1,0 µl DNA (20 ng DNA), 1,0 µl dNTP (0,1 mM dNTPs), 1,0 µl MgCl₂ (2,5 mM MgCl₂), 0,2 µl Taq (0,6 U Taq DNA polymerase), 1,0 µl her bir primer (0,3 µM her bir primer), 1,0 µl (1 X) PCR buffer ve 4,8 µl ddH₂O şeklinde olmuştur.

PCR programlarında, Polat (2009)'ın Barkley ve ark. (2006)'nın yapmış oldukları çalışmadan bir takım modifikasyonlar yaparak elde ettiği yöntem kullanılmıştır. Primerlerin çalışma durumlarına göre 2 farklı PCR protokolü oluşturulmuştur. I. PCR protokolü, 94°C'de 3 dk, ardından 35 döngü olacak şekilde, 94°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn, 72°C'de 1dk ve son olarak 72°C'de 10 dk şeklindedir. Bu protokolde, TAA1, CT21, AC01, CAG01, CAC19, TAA33, CAC39, CCT01, TAA45, CAC33, ATC09, CAT01, CAC23 ve TAA27 primeri çalışmıştır. II. PCR protokolünde yapışma (annealing) 40°C'dir ve TAA52, TAA15 ve cAGG9 primeri çalışmıştır.

PCR ürünleri % 2,5'lük high resolution agarose jelde (100-1200 bp'lik çözünürlükte) yürütölmüş ve bant büyüklüklerini belirlemek amacıyla 100 bp Ladder DNA kullanılmıştır. Jel, ethidium bromide ile boyanarak, Kodak GelLogic 200 sistemi ile görüntölenmiştir.

2.4. Verilerin analizi

Jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilen görüntüler, bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek skor edilmiştir.

Herbir populasyon için oluşturulan markır verileri NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System) bilgisayar paket programında analiz edilmiştir (Rohlf 1993). Genotipler arasındaki benzerlikler, elde edilen dendrogramlara göre belirlenmiştir. Benzerlik indeksleri Dice (1945)'e göre hesaplanmıştır. Ayrıca, iki boyutlu grafik üzerinde genotipler arasındaki mesafeleri gösteren Temel Bileşenler Analizi (Principle Component Analyze = PCA) yapılmıştır.

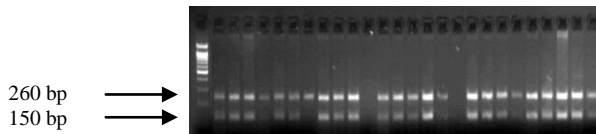
Çizelge 1. Genetik karakterizasyon çalışmasında kullanılan altıntop ve şadokların tür adı, çeşit adı, orijini veya elde edildiği ülke.

No	Tür Adı	Çeşit Adı	Orijini veya Elde Edildiği Ülke
1	<i>C. paradisi</i> Macf.	Cocktail	ABD
2	<i>C. paradisi</i> Macf.	Pernambuco B 6/4 (A,34)	İtalya
3	<i>C. paradisi</i> Macf.	Mc Carty B 6/7 29-9	ABD
4	<i>C. paradisi</i> Macf.	Altıntop SRA 640	Bilinmiyor
5	<i>C. paradisi</i> Macf.	Frost Marsh (1005 R)	ABD
6	<i>C. hassaku</i> Hort ex Tanaka	<i>Citrus hassaku</i>	Japonya
7	<i>C. paradisi</i> Macf.	Sweetie SRA 602 altıntopu	İsrail
8	<i>C. paradisi</i> Macf.	Oroblanco	ABD
9	<i>C. paradisi</i> Macf.	Davis Seedless (7291 T, N)	ABD
10	<i>C. paradisi</i> Macf.	Duncan B 6/6 30-5	ABD
11	<i>C. paradisi</i> Macf.	Flame altıntopu	ABD
12	<i>C. paradisi</i> Macf.	Foster B 6/5 28-12	Türkiye
13	<i>C. paradisi</i> Macf.	Foster B 6/5 28-16	Türkiye
14	<i>C. paradisi</i> Macf.	Foster B 6/5 29-16	Türkiye
15	<i>C. paradisi</i> Macf.	Henderson altıntopu - California (Özbek Özler)(1)	ABD
16	<i>C. paradisi</i> Macf.	Henderson altıntopu SRA 336	ABD
17	<i>C. paradisi</i> Macf.	Little River (7161 R)	ABD
18	<i>C. paradisi</i> Macf.	Frost Marsh (3190 R, N)	ABD
19	<i>C. paradisi</i> Macf.	J. B. C. 430 Marsh (10016 T)	ABD
20	<i>C. paradisi</i> Macf.	Marsh Seedless B 6/3 28-4	Türkiye
21	<i>C. paradisi</i> Macf.	Ray Ruby altıntopu (Paksoy A. Ş. - Adana)	Türkiye
22	<i>C. paradisi</i> Macf.	Redblush (3191 R, N) (CRC - 3)	ABD
23	<i>C. paradisi</i> Macf.	Red Blush	ABD
24	<i>C. paradisi</i> Macf.	Reed Grapefruit (6309 R)	ABD
25	<i>C. paradisi</i> Macf.	Rio Red altıntopu (Paksoy A. Ş. - Adana)	ABD
26	<i>C. paradisi</i> Macf.	Ruby altıntopu SRA 287	ABD
27	<i>C. paradisi</i> Macf.	Ruby altıntopu SRA 286	ABD
28	<i>C. paradisi</i> Macf.	Shambar altıntopu SRA 22	ABD
29	<i>C. paradisi</i> Macf.	Star Ruby (Özbek Özler Teksas)	ABD
30	<i>C. paradisi</i> Macf.	Whenny altıntopu GA - 338 - SRA	Avustralya
31	<i>C. paradisi</i> Macf.	Poorman	Avustralya
32	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Şadok Pink SRA 322	Bilinmiyor
33	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Şadok Kao Panne SRA 321	ABD
34	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Red Şadok	ABD
35	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Reinking Şadok (5292 T)	ABD
36	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Şadok WN	ABD

3. Bulgular

PCR çalışmaları sonucunda, 26 SSR primerinin 15 tanesinden (CT21, AC01, CAG01, CAC19, TAA33, CAC39, CCT01, TAA45, CAC33, ATC09, CAT01, TAA15, TAA52, CAC23 ve cAGG9) polimorfizm sağlanırken, 2 tanesinden (TAA1 ve TAA27) monomorfik bant elde edilmiştir. Bununla birlikte, TAA41, TAA3, CAC15, GT03 ve CT02 primerlerinden başarılı bir amplifikasyon elde edilememiştir (Çizelge 2).

Materyal olarak kullanılan 30 altıntop, 1 adet *C. hassaku* ve 5 şadokun primerlere göre sağlamış olduğu bant fragmentleri ve polimorfizm oranı Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 2'den de görüldüğü gibi, TAA45, TAA52, CAC19, CAC23, cAGG9, CAC33, CAC39, TAA33, CCT01, AC01, CAT01 polimorfizm oranı en yüksek (%100) primerleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte, TAA15 ve CAG01 polimorfizm oranı en düşük (% 33) primerler olarak tespit edilmiştir. CAC19, cAGG9 ve CAT01, dörder bant ile en fazla bant elde edilen primerleri oluşturmaktadır. Şekil 1'de CAC23 primerinin göstermiş olduğu bant deseni görülmektedir.



Şekil 1. CAC23 primerinin altıntoplarda göstermiş olduğu bant deseni.

UPGMA (unweighted-pair group method arithmetic average)

yöntemi ve Neighbor-Joining yöntemiyle elde edilen dendrogram (Şekil 2) ve PCA analizleri (Şekil 3) sonucu bireylerin birbirleriyle olan genetik yakınlık ve uzaklıkları belirlenmiştir. Dice (1945)'ın benzerlik katsayısına göre benzerlik oranları 0,60-0,97 arasında değişim göstermiş, matrix korelasyonu (r) 0,88 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız SSR primerlerine göre, benzerlik oranı en yüksek Foster B 6/5 28-12 ile Ray Ruby altıntopu (Paksoy A. Ş. - Adana) arasında ve % 97 oranında olduğu tespit edilmiştir. Red Şadok ise % 60 oranıyla en uzak bireyi oluşturmaktadır (Şekil 2). Çeşitlerin birbiriyle olan yakınlık ve uzaklık durumlarına göre düzlem üzerinde dağılımlarına baktığımızda da bu durum çok net bir şekilde görülmektedir. Neighbor-Joining sonucu (Şekil 2), birbiriyle yakın ve uzak bireyler daha net bir şekilde görülmektedir. Şadoklar aynı grup içerisinde yer almıştır. Bununla birlikte şadok kümesi içerisinde Poorman, Wenny, Red Şadok ve Coctail de yer almaktadır. Şadok ve altıntopların PCA analizleri sonucu göstermiş olduğu desen (Şekil 3) incelendiğinde, Red Şadok'un 36 birey içerisinde uzak noktada yer aldığı görülmektedir. Yine, şadokların farklı bir grup içerisinde yer aldığı ve greyfurtların birbirleri arasındaki yakınlığının oldukça fazla olduğu görülmektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

Şadok (*C. maxima* x *C. grandis*) ile portakalın (*C. sinensis*) doğal melezlenmesi sonucu ortaya çıktığı kabul edilen altıntop (*C. paradisi*) türü içinde, somaklonal varyasyonlar sonucunda mevcut birçok çeşit ortaya çıkmıştır. Mevcut bu çeşitler

Çizelge 2. Kullanılan primerler, baz dizilimleri, fragment uzunlukları, polimorfik fragmentler ve polimorfizm oranları.

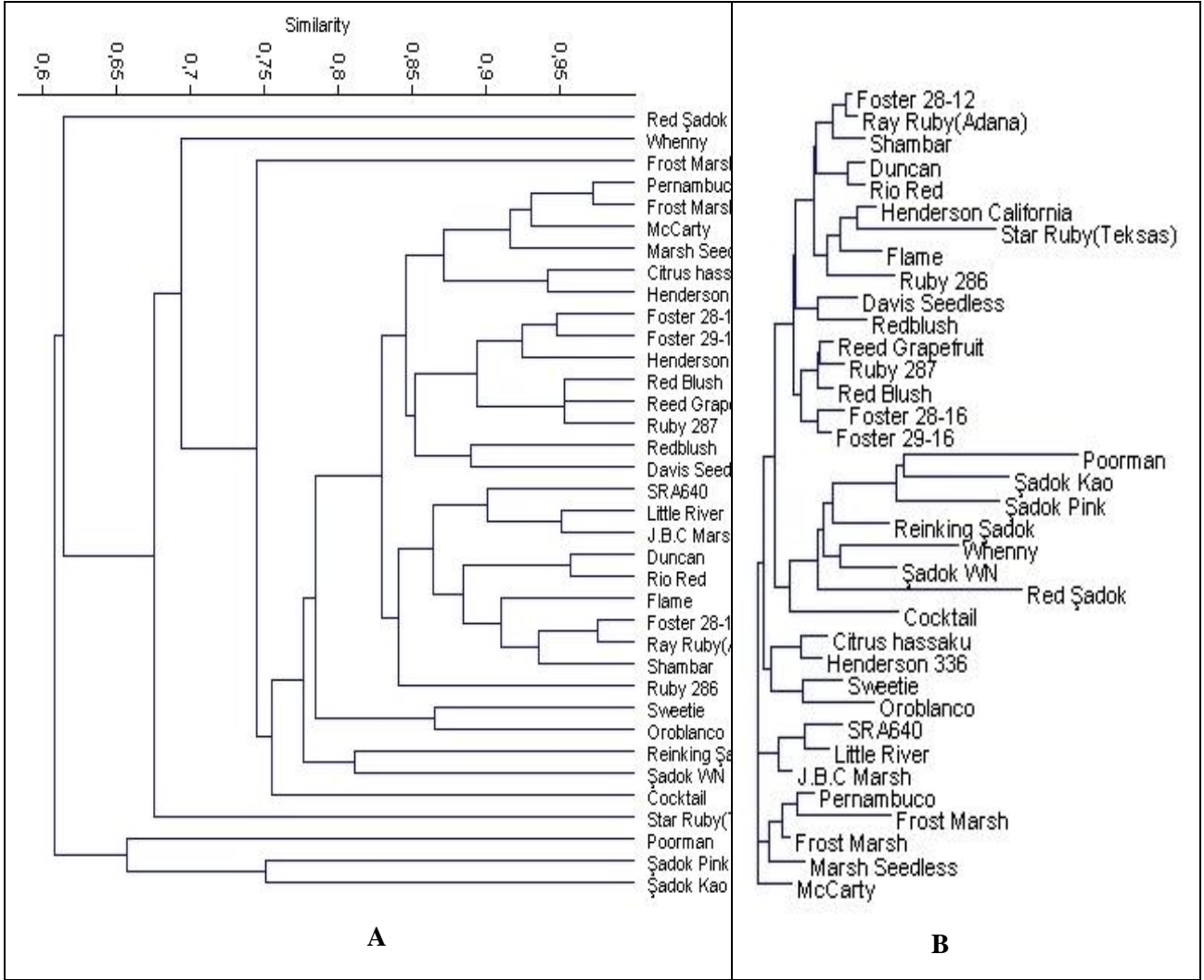
Primerler	F ve R Baz dizilimi	Tekrar Motif	Fragment Uzunlukları (bp)	Polimorfik Fragment (bp)	Polimorfizm Oranı (%)
TAA1	F-GACAACATCAACAAACAGCAAGAGC R-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	TAA	198	-	0
TAA45	F-GCACCTTTTATACCTGACTCGG R- TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG	TAA	145	145	100
TAA52	F-GATCTTGAAGTGAAGTAAAG R-ATGTATTGTGTTGATAACG	TAA	110, 90	110, 90	100
CAC19	F-ACAACCTTCAACAAAACCTAGG R- AAGACTTGGTGCGACAGG	CAC	260, 240, 230, 200	260, 240, 230, 200	100
TAA15	F-GAAAGGGTACTTGACCAGGC R- CTCCCAGCTGCAACAAGC	TAA	200, 195, 185	200, 185	33
TAA27	F-GGATGAAAAATGCTCAAAAATG R- TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	TAA	200, 195	-	0
TAA41	F-AGGTCTACATTGGCATTGTC R- ACATGCAGTGCTATAATGAATG	TAA	-	-	-
CAC23	F-ATCACAATTACTAGCAGCGCC R- TTGCCATTGTAGCATGTTGG	CAC	260, 150	260,150	100
cAGG9	F-AATGCTGAAGATAATCCGCG R- TGCTTGGCTCTCCACTCC	AGG	390, 200, 110, 105	390, 200, 110, 105	100
TAA3	F-AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC R- GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	TAA	-	-	-
CAC15	F-TAAATCTCCACTCTGCAAAAAGC R- GATAGGAAGCGTCGTAGACCC	CAC	-	-	-
CAC33	F-GGTGATGCTGCTACTGATGC R- CAATGTGAATTTGTGATTCCG	CAC	240, 200, 150	240, 200, 150	100
CAC39	F-AGAAGCCATCTCTGCTGC R-AATTCAGTCCCATTCCATTCC	CAC	195	195	100
TAA33	F-GGTACTGATAGTACTGCGGCG R-GCTAATCGCTACGTCTTCGC	TAA	180	180	100
CCT01	F-TCAACACCTCGAACAGAAGG R- CCCACATGCTAGCACAAAAGA	CCT	490, 210	490, 210	100
GT03	F-GCCTTCTTGATTTACCGGAC R- TGCTCCGAACCTCATCATTG	GT	-	-	-
CT02	F-ACGGTGCGTTTTGAGGTAAG R- TGACTGTTGGATTGGGATG	CT	-	-	-
AC01	F-TTGACATCAACATAAAAACAAGAAA R- TTTTAAAATCCCTGACCAGA	AC	160, 150	160,150	100
CAG01	F-AACACTCGCACCAAATCCTC R- TAAATGGCAACCCAGCTTTG	CAG	350,170, 150	350, 170	33
CAT01	F-GCTTTCGATCCCTCCACATA R- GATCCCTACAATCCTTGGTCC	CAT	190, 180, 170, 120	190, 180, 170, 120	100
ATC09	F-TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG R- TGTGAGTGTTTTGTGCGTGTG	ATC	210, 190	210	50
AG14	F-AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA R- CTCCTCTTGCGGAGTGTTTC	AG	-	-	-
CTT01	F-TCAGACATTGAGTTGCTCG R- TAACCACTTAGGCTTCGGCA	CTT	-	-	-
CT21	F-CGAACTCATTAAAAGCCGAAAC R- CAACAACCACTCTCACG	CT	160, 155	160, 155	100
TC26	F-CTTCTCTTGCGGAGTGTTTC R- GAGGGAAAGCCCTAATCTCA	TC	-	-	-
CT19	F-CGCCAAGCTTACCACTCACTAC R- GCCACGATTTGTAGGGGATAG	CT	-	-	-

içerisinde varyasyon oldukça düşüktür. Dolayısıyla genetik yapıyı belirlemek daha zor olmaktadır. Bu çeşitlerin düşük varyasyon gösterdiği diğer çalışmalarda da görülmüştür (Fang ve Roose 1997; Corazza- Nunes ve ark. 2002).

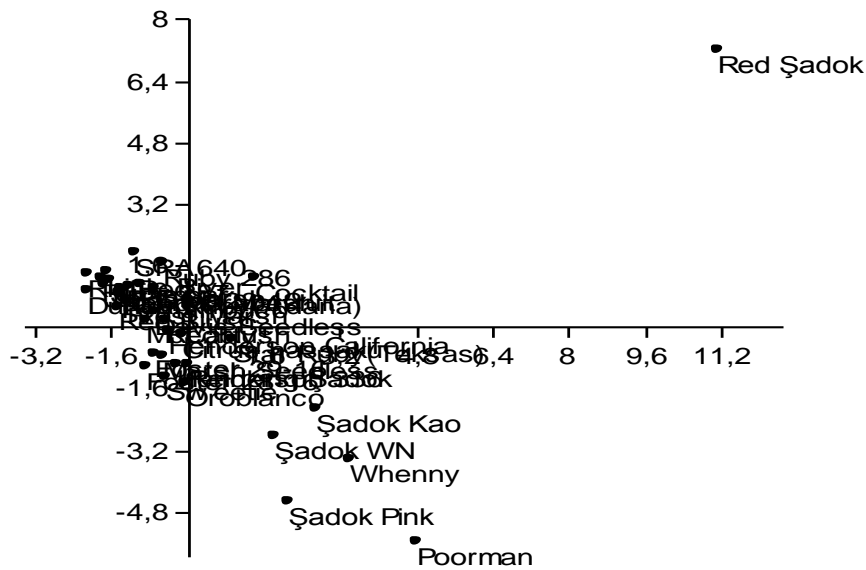
Corazza-Nunes ve ark. (2002) 38 altıntop (*C. paradisi*) ve 3 şadokda (*C. maxima*), genetik varyabilitiyi belirlemek amacıyla, 21 RAPD primeri ve 20 SSR primeri kullanmıştır. RAPD amplifikasyonu ve SSR lokus analizleri, altıntop kalıtım çalışmasında, düşük genetik polimorfizm sağlamıştır. Morfolojik olarak farklılıklar görülmesine rağmen, tür ve çeşitler genetik olarak birbirleriyle oldukça yakın bulunmuştur.

Royal, Triumph, Imperial ve Cannores arasında %100 genetik yakınlık tespit edilmiştir. Bunun nedeninin, farklı çeşitlerin tek bireyden (klondan) mutasyon sonucu elde edilmeleri ya da moleküler markırların çeşitleri ayırt etmede yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Uzun ve ark. (2010b), ISSR markırları kullanarak, 30 adet altıntop, 1 adet *C. hassaku* ve 5 adet şadokun genetik tanımlamasını yapmışlardır. Çalışmada, altıntop ve şadoklar iki ayrı küme (cluster) oluşturmuştur. Bununla birlikte, bazı altıntoplar arasında yeterince ayırım sağlanamamıştır. Pernambuco, Rio Red ve Ruby SRA 286 altıntopları arasında



Şekil 2. Şadok ve altıntoplar arasındaki akrabalığı gösteren UPGMA (A) ve Neighbor-Joining (B) yöntemiyle elde edilmiş dendrogramlar.



Şekil 3 Şadok ve altıntopların principle component analizi (PCA) sonucu göstermiş olduğu dağılım deseni.

genetik farklılık bulunmamıştır. Bunun nedeni, mutasyon sonucu bir bireyden elde edilmeleri olarak açıklanmıştır. Bu çalışmada ise altıntoplarda tüm bireylerde genetik farklılık tespit edilmiştir. Birbirine en yakın bireyler % 97 oranıyla, Foster B 6/5 28-12 ile Ray Ruby altıntopu (Paksoy A. Ş. - Adana) olarak belirlenmiştir. Benzerlik oranı en yüksek bulunan çeşitlerden Foster altıntopu, Walters altıntopundan doğal mutasyon sonucu oluşmuş olup, Ray Ruby çeşidinin ise orijini bilinmemektedir (Hodgson 1967).

Sweetie ve Oroblonco birbirine yakın bireyler olarak tespit edilmiştir. Cottin (2002) Sweetie'nin Oroblonco'nun sinonimi olduğunu bildirmiştir. Oroblonco, CRC 2240 kodlu az asitli, diploid şadok (*C. grandis*) ile çekirdekli, beyaz, tetraploid Marsh altıntopun (*C. paradisi*) melezlenmesi sonucu elde edilmiş triploid bir çeşittir (Soost ve Cameron 1981).

Marsh çeşidi, Duncan ve portakallardan birisinin (*C. grandis* x *C. sinensis*) melezlenmesi sonucu elde edilmiştir. Flame, Henderson ve Rio Red ise Marsh'dan mutasyon sonucu oluşmuştur (Bowman ve Gmitter 1990). Dolayısıyla, çalışmamızda da Rio Red, Duncan ve Henderson (California) birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur.

Uzun ve ark. (2010b) çalışmalarında *C. hassaku* ile Cocktail'in aynı kümede, melezler içerisinde yer aldığını tespit etmiştir. Bu çalışmada da melezler içerisinde yer almıştır. Henderson 336 ile aynı kümededir. Aynı zamanda Cocktail ile yakın kümede bulunmaktadır. *C. hassaku*, Japonya orijindir, şadok ile mandarinin melezlenmesi sonucu elde edildiği tahmin edilmektedir (Hodgson 1967). Henderson'ın atası Marsh'tır ve Marsh'ta da portakal genleri mevcuttur (Bowman ve Gmitter 1990).

Marsh Seedless eski bir çeşit olup, birçok çeşidin elde edilmesini sağlamıştır. Beyaz meyve etli olan bu çeşit, yine eski çeşitlerden ve beyaz meyve etli olan McCarty ve Frost Marsh çeşitleri ile aynı kümede yer almıştır (Şekil 2).

Corazza-Nunes ve ark. (2002), çalışmalarında yer alan şadoklardan Pink, Kao Panne ve Red şadok aynı alt kümede yer alırken, Reinking ve Pummelo WN farklı bir alt grupta yer almıştır. Uzun ve ark. (2010b), ISSR markırları kullanarak, 30 adet altıntop, 1 adet *C. hassaku* ve 5 adet şadokun genetik tanımlamasını yapmışlardır. Çalışmada, altıntop ve şadoklar iki ayrı küme (cluster) oluşturmuştur. Şadok kümesindeki tüm şadoklar birbirinden net bir şekilde ayrılabilirlerine karşın, altıntop kümesindeki bazı bireyler birbirlerinden yeterince ayırım gösterememiştir. Bu durumun, altıntopun mutasyon orijini olmasından dolayı düşük varyasyonun görülmesinden olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda, genel olarak şadoklar ayrı bir kümede yer almıştır (Şekil 2). Reinking Şadok çeşidi bir şadok melezi, ebeveynleri Kao Phuang Şadoğu ile Shamouti portakalıdır (Morton 1987). Şadok WN çeşidinin de her ne kadar şadok özelliği gösterse de bir şadok melezi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, Şadok kümesi içerisinde Poorman, Whenny ve Cocktail yer almıştır. Poorman çeşidinin orijini bilinmemesine karşın bir şadok melezi olabileceği belirtilmekte ve tohumlarının monoembriyonik olması bu görüşü desteklemektedir (Hodgson 1967). Yine, Whenny çeşidi her ne kadar altıntopa benzemekle birlikte, tohumlarının monoembriyonik olmasından dolayı şadok melezi olabilir (Hodgson 1967). Yine, Cocktail de melez bir çeşittir, Frua mandarini ve düşük asitli şadok arasında yapılan melezleme sonucu elde edilmiştir (Kahn ve ark. 2001).

Barkley ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada, 370 adet

farklı turunçgil gruplarına ait bireyleri SSR moleküler markır yardımıyla, populasyon yapısını ve genetik farklılığını başarılı bir şekilde tespit etmişlerdir. Çalışmada altıntop ve şadoklar diğer turunçgil gruplarına (*Citrus*) göre farklı bir grupta yer almıştır. SSR markırlar oldukça fazla informativdir ve kodominanttır. Dolayısıyla, genetik koleksiyonda genetik farklılığı belirlemede, parmakizi oluşturmada, akrabaları arasında filogenetik ilişkiyi belirlemede oldukça uygun markır sistemidir. Aynı şekilde, SSR'ların uygun bir markır sistemi olduğu, Gülşen ve Roose (2001)'un bazı akraba türler ve bazı ebeveyn olduğu söylenen şadok (*C. maxima*), ağaç kavunu (*C. medica*) ve mandarinde (*C. reticulata*), Jiang ve ark. (2006)'nın portakal (*C. sinensis*), üçyapraklı (*Poncirus trifoliata*) ve bazı turunçgil çeşitlerinde, Novelli ve ark. (2006)'nın portakallarda, Golein ve ark. (2006)'nın limonlarda, Uzun ve ark. (2010a)'nın limon (*C. limon* L.), citron (*C. medica* L.), kaba limon (*C. jambhiri*) ve *C. volkameriana*'da, Ghorabaie ve ark. (2010)'nın bazı turunçgillerde, Incesu ve ark. (2011)'nin Satsuma mandarininde, Biswas ve ark. (2011) ve Amar ve ark. (2011)'nin bazı turunçgil ve akrabalarında yapmış oldukları çalışmalarda da tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, moleküler markır sistemlerinden SSR'lar kullanılarak, seleksiyon ve introduksiyon yoluyla elde edilmiş 30 adet altıntop (*C. paradisi*), 1 adet *C. hassaku* ve 5 adet şadok (*C. maxima*)'un genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığı genel olarak belirlenmiştir. Turunçgillerde mutasyon sonucu oluşan bireyleri moleküler olarak ayırt etmek oldukça zordur. Fakat, kodominant markır olan SSR'lar, altıntop ve şadokların tanımlanmasında kullanılabileceği bu çalışmayla da görülmüştür.

Teşekkür

Yazarlar, çalışmaya 106 G 049 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK-KAMAG'a teşekkür eder.

Kaynaklar

- AKİB (2010) Akdeniz İhracatçılar Birliği. 2009-2010 Ocak-Aralık Dönemi Turunçgil İhracat Kayıt Rakamları. www.akib.org.tr. Erişim tarihi: 4 Kasım 2011.
- Amar MH, Biswas MK, 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.
- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a Citrus germplasm collection utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). Theoretical and Applied Genetics 112: 1519-1531.
- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. Systematic Botany 1: 105-136.
- Biswas MK, Chai L, Amar MH, Zhang X, Deng XX (2011) Comparative analysis of genetic diversity in Citrus germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. Scientia Horticulturae 129: 798-803.
- Bretó MP, Ruiz C, Pina JA, Asins MJ (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 285-93.
- Bowman KD, Gmitter FG (1990) Caribbean forbidden fruit: Grapefruits missing link with the past and bridge to the future? Fruit Variety Journal 44: 41-44.
- Corazza-Nunes MJ, Machado MA, Nunes WMC, Cristofani M, Targon MLPN (2002) Assessment of genetic variability in grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and pummelos (*C. Maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSRs markers. Euphytica 126: 169-76.

- Cottin R (2002) *Citrus of the World. A Citrus Directory. Version 2.* SRA INRA CIRAD, San Giuliano.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.
- Ghorabaie HRR, Ghazvini RF, Golein B, Nabipour AR (2010) Identification of some Citrus accessions in a Citrus germplasm utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). *Horticulture Environment and Biotechnology* 51: 343-347.
- Golein B, Talaie A, Zamani Z, Moradi B (2006) Development and characterization of new microsatellite loci from Lemon (*Citrus limon*). *International Journal of Agriculture and Biology* 8: 172-174.
- Gülşen O, Roose ML (2001) Limonlarda genetik çeşitlilik, bazı turunçgillerle akrabalık derecelerinin DNA markirlarının kullanılarak belirlenmesi. *Bahçe* 30: 53 - 63
- Hodgson RW (1967) *Horticultural Varieties of Citrus. The Citrus Industry* (Edited by W., Webber, H.J. and Batchelor, L.D. (eds) The Citrus Industry, v 1. University of California Press, Berkeley, CA, USA, 431-591.
- Jiang D, Zhong GY, Hong QB (2006) Analysis of microsatellites in Citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica* 33: 345-353.
- İncesu M, Tuzcu Ö, Yeşiloğlu T, Aka Kaçar Y, Yıldırım B, Boncuk M, Çimen B (2011) Molecular diversification and preliminary evaluations of some satsuma selections' performance under mediterranean conditions. *African Journal of Biotechnology* 10: 4347-4357.
- Kahn TL, Krueger RR, Gumpf DJ, Roose ML, Arpaia ML, Batkin TA, Bash JA, Bier OJ, Clegg MT, Cockerham S.T. *et al.* (2001) *Citrus* genetic resources in California: Analysis and recommendations for long-term conservation. Report No. 22. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis.
- Morton J (1987) *Fruits of warm climates.* Julia F. Morton, Miami, FL. (eds) Pummelo. p. 147-151.
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1155-1166.
- Novelli VM, Cristofan M, Souza AA, Marcos 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.
- Polat İ (2009) Üç Yapraklı (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) ve Üç Yapraklı melezleri grubu turunçgillerin genetik akrabalık ve farklılıklarının SSR moleküler markirlarla tanımlanması. *Derim* 26: 30-41
- Rohlf FJ (1993) NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York.
- Roose ML (2009) Use of molecular markers to understand phylogeny and genetic diversity of citrus. PCR primers for Citrus germplasm characterization. <http://www.plantbiology.ucr.edu/faculty/roose.html>. Accessed: 18 October 2009.
- Scora RW, Kumamoto J, Soost RK, Nauer EM (1982) Contribution to the origin of the Grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Systematic Botany* 7: 170-177.
- Shanker A, Bhargava A, Bajpai R, Singh S, Srivastava S, Sharma V (2007) Bioinformatically mined simple sequence repeats in UniGene of *Citrus sinensis*. *Scientia Horticulturae* 113: 353-361.
- Soost RK, Cameron JW (1981) 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. In: Matsumoto K (Ed), *Proceedings of the International Society of Citriculture* Vol. 1, pp. 59-60.
- Tan ML, Song JK, Deng XX (2007) Production of two mandarin trifoliolate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. *Euphytica* 157:155-160.
- TUİK (2010) Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri. www.tuik.gov.tr. Erişim: 23 Kasım 2011.
- Uzun A, Yesiloglu T, Polat I, Aka-Kacar Y, Gulsen O, Yildirim B, Tuzcu O, Tepe S, Canan I, Anil S (2010a) Evaluation of genetic diversity in lemons and some of their relatives based on SRAP and SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 29: 693-701.
- Uzun A, Gulsen O, Yesiloglu T, Aka-Kacar Y, Tuzcu O (2010b) Distinguishing grapefruit and pummelo accessions using ISSR markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46: 170-177.