



Bazı *Citrus* ve akrabalarının genetik farklılık ve yakınlıklarının SSR moleküler belirteçlerle belirlenmesi

Determination of genetic diversity and relationships within some *Citrus* and related genera by using SSR molecular markers

İlknur POLAT

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya, TURKEY

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

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 20 Mayıs 2013
Düzeltilme tarihi 10 Mart 2014
Kabul tarihi 11 Mart 2014

Anahtar Kelimeler:

Citrus spp.
Simple sequence repeat
Akrabalar
Moleküler belirteç

ÖZ

Çalışmada *Aurantioideae* alt familyasına ait 80 adet, *Toddalioideae* alt familyasına ait 1 adet *Citrus* ve akrabalarının genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığı SSR (simple sequence repeat) moleküler belirteç tekniği kullanılarak incelenmiştir. Kullanılmış olduğumuz 26 SSR primerinin 18'i polimorfizm sağlamıştır. UPGMA (unweighted-pair group method arithmetic average) dendrogram ve temel koordinat analizi (principal coordinate analysis, PCO) sonucu bireylerin birbirleriyle olan genotipik farklılıkları belirlenmiştir. Dice'in benzerlik katsayısına göre genetik benzerlik 0.33-0.90 arasında değişim göstermiştir. En yüksek genetik benzerlik 0.90 ile *Citrus montana* (Wester) ve *Citrus wintersii* Mabb. arasında bulunmuştur. *Toddalioideae* alt familyasında yer alan *Casimiroa tetrameria* (Florida) ise 81 adet *Citrus* ve akrabaları içerisinde en uzak bireyi oluşturmuştur. Çalışmamızda, SSR markırlar birçok *Citrus* ve akrabalarının ayırt edilmesinde uygun moleküler belirteç olarak bulunmuştur.

ARTICLE INFO

Received 20 May 2013
Received in revised form 10 March 2014
Accepted 11 March 2014

Keywords:

Citrus spp.
Simple sequence repeat
Related genera
Molecular marker

ABSTRACT

In the present study, genetic relationship and diversity of 80 *Citrus* and their relatives in *Aurantioideae* subfamily and 1 accessions in *Toddalioideae* subfamily were determined by simple sequence repeat (SSR) markers. From the 26 primer pairs used, 18 SSR primers generated polymorphic fragments. Genetic relationships and distance were determined by using UPGMA (unweighted-pair group method arithmetic average) dendrogram and PCO (principal coordinate analysis) analysis. The Dice similarity coefficient among the accessions ranged from 0.33 to 0.90. *Citrus montana* (Wester) and *Citrus wintersii* Mabb. in a group with 0.90 genetic similarity were determined. In contrary, *Casimiroa tetrameria* (Florida), in *Toddalioideae* subfamily, was found to be the least related sample to the remaining 81 *Citrus* and their relatives. In our study, SSRs molecular markers were found to be suitable to distinguish many *Citrus* and their relatives.

1. Giriş

Turunçgil ve akrabaları arasında seksüel uyumun yüksek, tarihinin oldukça eski olmasından ve geniş bir alanda yayılım göstermesinden dolayı taksonomisi ve filogenetiği oldukça karmaşıktır (Nicolosi ve ark. 2000). Turunçgillerde, türler hatta cinsler arası melezlenme, poliembriyo, apomiksis oranı oldukça yüksektir ve gençlik kısırlığı uzundur. Morfolojik özellikleri çevre koşullarına, ağacın gelişim dönemine göre değişiklik gösterebilmekte ve genotipler arasındaki varyasyon düşük olabilmektedir. Bu nedenle, genetik materyallerinin toplanması, toplanan materyallerin morfolojik, pomolojik, fenolojik, biyokimyasal özelliklerinin bilinmesinin yanısıra genetik özelliklerinin de bilinmesi çok önemlidir (Gmitter ve ark. 1992; Nicolosi ve ark. 2000; Bretó ve ark. 2001; Corazza-Nunes ve ark. 2002; Barkley ve ark. 2006).

Turunçgillerde, parmakizi oluşturmak, genetik farklılığı, filogenetik ilişkiyi tespit etmek ve ıslah çalışması sonucu elde edilen tetraploid bireyleri belirlemek amacıyla farklı moleküler belirteçler kullanılmaktadır. İzozenzimler, *Microcitrus* (*Microcitrus inodora*) x *Eremocitrus* (*Eremocitrus glauca*), *Microcitrus* (*Microcitrus warburgiana*) X *Fortunella* (*Fortunella margarita*), *Fortunella* (*F. margarita*) X *Microcitrus* (*M. warburgiana*), ve *Citrus* (*Citrus grandis* cultivar 'Tosa-buntan') X *Poncirus* (*Poncirus trifoliata*) melezleme kombinasyonlarından elde edilen bireyleri teyit etmek amacıyla kullanılmıştır (Rahman ve Nito 1994). Yine, koleksiyon bahçesinde yer alan 48 adet üçyaprak (*Poncirus trifoliata* Raf.) ve 3 adet turunçgilin (Rubidoux, Rich 16-6 ve Flying Dragon) genetik farklılıklarını (Fang ve ark. 1997) limonlarda genetik çeşitlilik, bazı turunçgillerle akrabalık

derecelerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Gülşen ve Roose 2001). Fang ve ark. (1997) aynı zamanda çalışmalarında restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve inter-simple sequence repeats (ISSR) markırlarını da kullanmıştır. Federici ve ark. (1998), koleksiyon bahçesinde Rutaceae familyası içinde yer alan Citrus ve akrabalarının akrabalık ilişkilerini incelemek amacıyla RFLP ve random amplified polymorphic DNA (RAPD) markırlarını kullanmıştır. Inter-simple sequence repeats (ISSR) yine genetik farklılıkları belirlemek amacıyla kullanılan markır sistemlerindedir (Bretó ve ark. 2001; Gülşen ve Roose 2001; Uzun ve ark. 2009b). RAPD markır sistemi genetik farklılık ve akrabalıkları belirlemek amacıyla Nicolosi ve ark. (2000), Bretó ve ark. (2001) ve Uzun ve ark. (2009b) tarafından da kullanılmıştır. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) bir diğer önemli markır sistemlerindedir (Bretó ve ark. 2001; Campos ve ark. 2005). Sequence related amplified polymorphism markers (SRAP) en son kullanılan markır sistemlerindedir. Uzun ve ark. (2009a), koleksiyon bahçesinde yer alan Aurantioideae familyasına ait 88 tür ve akrabalarının genetik farklılıklarını ve akrabalıklarını belirlemek amacıyla kullanmıştır. Yine koleksiyon bahçesinde bulunan 45 limon (*Citrus lemon* (L.) Burm.f.) 5 citron (*Citrus medica* L.) 4 kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush), iki adet *Citrus volkameriana* (Uzun ve ark. 2011), 51 adet turunc (*Citrus aurantium*) ve akrabaları (Polat ve ark. 2012) ve 65 mandarinin (Kacar ve ark. 2013) genetik farklılıklarını ve akrabalıklarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

SSR belirteçleri, genomda bol olması, yüksek polimorfizm göstermesi, Mendel kalıtımına uygunluğu, kodominantlık ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olmasından dolayı, yakın akraba grupları içerisinde filogenetik sınıflandırmayı yapmak, parmakizi oluşturmak, gen kaynakları koleksiyonlarında genetik farklılıkları belirlemek amacıyla turuncgillerde son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Barkley ve ark. 2006; Jiang ve ark. 2006; Novelli ve ark. 2006; Tan ve ark. 2007; Amar ve ark. 2011). Ayrıca, ıslah çalışması sonucu elde edilen tetraploid hibridlerin belirlenmesinde (Scarano ve ark. 2006; Ferrante ve ark. 2010), genetik haritalama çalışmalarında (Chen ve ark. 2008; Gulsen ve ark. 2010) SSR'lar oldukça yaygın kullanılmaktadır. Uzun ve ark. (2011), Polat ve ark. (2012) ve Kacar ve ark. (2013) çalışmalarında SRAP markırlarıyla birlikte SSR markırlarını da kullanmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir.

Barkley ve ark. (2006), Citrus gen kaynakları koleksiyon bahçesinden, çoğunluğu seksüel yolla elde edilmiş 370 turuncgilde moleküler polimorfizm elde etmek, popülasyon yapısını ve genetik ilişkiyi belirlemek amacıyla 24 adet SSR primeri kullanmıştır. Çalışma sonucu, doğal yolla oluşan sadece birkaç *Citrus* cinsinin var olduğu ve diğer birçok *Citrus*'un bu doğal oluşan formlar arasında farklı melezlenmeler sonucu oluştuğu hipotezini desteklemiştir. Amar ve ark. (2011), turuncgil gen kaynaklarının bulunduğu koleksiyon bahçesinde yer alan 24 *Citrus* ve akrabalarının genetik farklılıklarını belirlemek amacıyla, SSR, SRAP ve CAPS-SNP olmak üzere üç markır sistemi kullanmıştır. Çalışma sonucunda, kümeleme analizi için UPGMA kullanarak dendrogram oluşturulmuş ve SSR markırlarından elde ettiği verilerin genel dendrogramla en uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacıların, koleksiyon bahçelerinde bulunan turuncgil gen kaynakları içerisindeki bireylerin genetik farklılıklarını ve akrabalık ilişkilerini belirlemede SSR kullanmaları ve sonuç olarak da olumlu ve güvenilir veriler elde etmeleri, çalışmamızda SSR belirteçlerinin kullanılmasını sağlamıştır. Çalışmamızda, *Aurantioideae* alt

familyasına ait 80, *Toddalioideae* alt familyasına ait 1 adet turuncgil ve akrabalarının birbiriyle olan genetik farklılığını belirlemek amacıyla SSR moleküler belirteçler kullanılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki Materyalleri

Çalışmamızda kullandığımız turuncgil ve akrabalarına ait 81 bireyin DNA örnekleri, TÜBİTAK tarafından desteklenen 106G049 nolu proje kapsamında Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Bu materyallerin isimleri, alt familyaları ve soyları Çizelge 1'de verilmiştir.

2.2. SSR Primerleri

SSR primerleri, turuncgillerde yaygın olarak kullanılan, Roose ve ekibi tarafından belirlenmiş olan ve liste halinde sunulan internet sitesinden tespit edilmiştir (Roose 2009). Çizelge 2 halinde verilen listede görülen 26 primer çalışılmış, çok iyi amplifikasyon oluşturmayan primerler elemine edilerek, iyi çalışan 20 primerle çalışmaya devam edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız primerler, TAA1, CAC19, TAA45, TAA3, CT21, CAC33, TAA27, CAC39, AC01, TAA33, CAC23, CCT01, CT19, CAG01, CAT01, ATC09, CAC15, TAA52, TAA15 ve CAGG9'dur.

2.3. PCR reaksiyon ve amplifikasyon koşulları

PCR reaksiyonları, Polat (2009)'nın yapmış oldukları çalışmaya göre, 20 ng genomik DNA, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 U Taq DNA polymerase, 25 uM ileri ve geri primerler, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) PCR buffer ve 4.8 µl ddH₂O içeren 10 µl hacimler halinde oluşturulmuştur.

Primerlerin çalışma durumlarına göre 3 farklı PCR protokolü oluşturulmuştur. I. PCR protokolü, 1 döngü 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 da 1 döngü 72 °C'de 10 dk şeklindedir. Bu protoköde TAA1, CAC19, TAA45, TAA3, CT21, CAC33, TAA27, CAC39, AC01, TAA33, CAC23, CCT01, CT19, CAG01, CAT01 ve ATC09 primerleri çalışmıştır. II. PCR protokolünde ise eşleşme (annealing) 45 °C'dir ve bu programda TAA52, TAA15 ve CAGG9 primerleri çalışmıştır. III. PCR protokolünde eşleşme 55 °C'dir ve bu programda CAC15 primeri çalışmıştır. PCR ürünleri, % 2.5 oranında, 50 baz çiftine kadar çok iyi ayırın sağlayabilen yüksek çözünürlükte jelde (Agarose SFR, AMBRESCO) ayrıştırıldıktan sonra 100 bazlık bantlar içeren bir DNA büyüklük belirteci (100 bp ladder DNA, NEW ENGLAND BioLabs) ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Jel etidium bromide ile boyanarak, Kodak GelLogic 200 sistemi ile görüntülenmiştir.

2.4. Verilerin analizi

Jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilen görüntüler, bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek skor edilmiştir. Kümelendirme, sayısal taksonomi ve multivaryasyon analizi yapabilen NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1 Exeter Software, Setauket, N.Y., USA) genetik analiz programı kullanılarak tartılmamış çift grup aritmetik ortalamayla (unweighted pair-group method,UPGMA) analiz edilmiştir (Rohlf 1993). Benzerlik indeksleri Dice (1945)'e göre hesaplanmıştır. Ayrıca temel koordinat analizi (PCO) aynı program kullanılarak yapılmıştır. PIC (Polymorphism

information content) değerleri Smith ve ark. (1997)'nin belirttiği gibi, $PIC = 1 - \sum f_i^2$ formülüne göre hesaplanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızda 45, 50 ve 55 °C olmak üzere üç farklı annealing sıcaklığı kullanılarak primelerin en uygun çalışma sıcaklığı tespit edilmiştir. Annealing derecesi gerek polimorfizm oluşumunda gerekse spesifik bant eldesinde önemlidir. Çalışma sonucunda, 26 SSR primerinin 18 tanesinden polimorfizm sağlanırken, 2 tanesinden (CT19 ve CAC15) monomorfik bant elde edilmiştir. Bununla birlikte, 6 primerden (TAA41, GT03, CT02, AG14, CTT01 ve TC26) başarılı bir amplifikasyon elde edilememiştir. Polimorfik, monomorfik bant elde edilen primerler ve elde edilen bantların baz büyüklükleri Çizelge 2'de verilmiştir. Amplifikasyon sağlayan 20 SSR primerinden toplam 57 bant elde edilmiş ve bunun 41 tanesi polimorfizm oluşturmuştur. Polimorfizm oranı % 0-100 arasında değişim

göstermiştir. CAC33, TAA27, AC01, CAT01, ATC09, TAA52, TAA15 ve CAGG9 polimorfizm oranı en yüksek olan primerleri oluşturmaktadır.

Primerlerin PIC değerleri ise 0.00 ile 0.99 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 2). Monomorfik primerlerin (CT19 ve CAC15) PIC değerleri 0.00'dır. Bununla birlikte, polimorfizm sağlayan primerlerin PIC değerleri 0.26 (TAA27) ile 0.99 (TAA3, CAG01 ve CT21) arasında değişim göstermiştir. PIC değerleri, genellikle moleküler çalışmalarda markır lokusunun polimorfizmini ölçmek amacıyla kullanılır (Smith ve ark. 1997). PIC değeri 0 ile 1 arasında değişim gösterir. PIC değeri 0.7 ve üzerinde olursa markır oldukça yüksek bilgilendirici özelliktedir (Hildebrand ve ark. 1992). Çalışmamızda kullandığımız TAA45, TAA52, TAA15, CAC23, CAGG9, TAA3, CAC33, CAC39, TAA33, CCT01, CAG01 ve CT21 primerleri oldukça yüksek bilgilendiricidir. CAC39 primerine ait bant deseni Şekil 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Denemede kullanılan akraba grubu turuncgillerin isim listesi, alt familyası ve soyu.

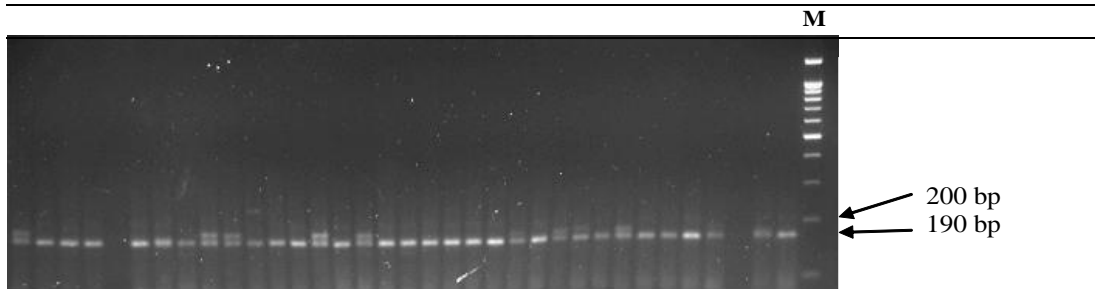
Table 1. The name, subfamily and tribe of the 81 accessions of Citrus and related genera.

Turuncgilin Adı	Alt familya	Soy	Turuncgilin Adı	Alt familya	Soy
<i>Citrus moi</i> - SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus limetta</i> 02 (Zerrifin İst.-İsrail)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus celebica</i> -CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus davaoensis</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus assamensis</i> (Adajamir) - CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus rugulosa</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus tachibana</i> - CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus hirosima</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus webberii</i> SRA(Kalpi papeda)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus tengu</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus pectinifera</i> (B6 X 29)SRA	Aurantioidae	Citreae	Del Bresil 5-4	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus maderaspatana</i> (Kalif.)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citropsis gilletiana</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus megalaxycarpa</i> cv. Hukma Tenga- CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus micrantha</i> var. <i>microcarpa</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citropsis articulata</i> M- 17738 (Florida)	Aurantioidae	Citreae	<i>Glycosmia pentaphylla</i>	Aurantioidae	Clauseneae
<i>Citropsis gabunensis</i> (CRC)	Aurantioidae	Citreae	<i>Murraya paniculata</i>	Aurantioidae	Clauseneae
<i>Casimiroa tetrameria</i> (Florida)	Toddalioideae	Toddalieae	<i>Clausena excavata</i>	Aurantioidae	Clauseneae
<i>Severina buxifolia</i> - SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Clausena lansium</i>	Aurantioidae	Clauseneae
<i>Citrus pennivesiculata</i> (Gajanimma) CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Pamburus missionis</i>	Aurantioidae	Citreae
Milam F/ 14.7	Aurantioidae	Citreae	Nasnanan SRA	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus sunki</i> SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus excelsa</i> SRA	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus khatta</i> SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Hesperethusa crenulata</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus natsudaïdai</i> (A.37)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus benikoji</i> (CRC 3149)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus borneo</i> B6 FF 20-SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus canaliculata</i> (CRC 3565)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus keraji</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus miaray</i> (CRC 3574)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus depressa</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus honaju</i> (CRC 3469)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus yatsushira</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	Microcitrus australasica CRC	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus ampullacea</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus tardiva</i> (CRC 3297)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus obovoidea</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus ujukitsu</i> (CRC 3467)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus sulcata</i> - Antalya	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus succosa</i> (CRC 3280)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus intermedia</i>	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus tamurana</i> (Hyuganatsu) (CRC 3092)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus latipes</i> J.W.C CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus rokugatsu</i> (CRC 3473)	Aurantioidae	Citreae
İchangensis lemon (<i>C. grandis</i> x <i>C. ichangensis</i>)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus shunkokan</i> (CRC 3476)	Aurantioidae	Citreae
<i>Severinia buxifolia</i> CRC	Aurantioidae	Citreae	<i>Pleiopermium alatum</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus ichangensis</i> (California)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus leiocarpa</i> CRC 3147	Aurantioidae	Citreae
İchangensis limonu B6 - SRA	Aurantioidae	Citreae	<i>Atalantia ceylanica</i> CRC 3287	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus amblycarpa</i> (Newcomb)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus sinograndis</i> CRC 3148	Aurantioidae	Citreae
Siameo (SRA)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus hystrix</i>	Aurantioidae	Citreae
Poire du Commandeur (<i>Citrus lumia</i>) (SRA)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus nextour</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Eremocitrus glauca</i> (California)	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus yuko</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Microcitrus australasica</i> CRC 02	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus montana</i> (Wester)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus tamurana</i>	Aurantioidae	Citreae	<i>Aeglopsis chevalieri</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Atalantia ceylanica</i> CRC 02	Aurantioidae	Citreae	Konejime (<i>C. aurantium</i>) (CRC 3611)	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus limetta</i> 01	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus tosu</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Citrus sudachi</i>	Aurantioidae	Citreae	<i>Citrus wintersii</i>	Aurantioidae	Citreae
<i>Aegle marmelos</i> L. Corrèa	Aurantioidae	Citreae	<i>Balsamocitrus davea</i>	Aurantioidae	Citreae
Mixinca (Tam adı bilinmiyor)	Aurantioidae	Citreae			

Çizelge 2. Kullanılan 26 primere ait baz dizilimleri, elde edilen toplam fragment, polimorfik fragment ve polimorfizm oranları.

Table 2. Forward and reverse primer sequences for 18 SSR markers, total fragment, polymorphic fragment and polymorphism rate.

Primerler	İleri ve Geri Baz dizilimi	Toplam Fragment (bp)	Polimorfik Fragment (bp)	Polimorfizm Oran (%)	PIC
TAA1	F-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC R-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	200, 190	200	50	0.69
TAA45	F-GCACCTTTTATACCTGACTCGG R-TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG	250, 200, 150, 100	250, 200	66	0.70
TAA52	F-GATCTTGACTGAACCTAAAG R-ATGTATTGTGTTGATAACG	200, 110, 100, 90	200, 110, 100, 90	100	0.91
CAC19	F-ACAACCTTCAACAAAACCTAGG R-AAGACTTGGTGCGACAGG	230, 200, 150, 120	230, 200	50	0.67
TAA15	F-GAAAGGGTACTTGACCAGGC R-CTTCCAGCTGCACAAGC	200, 190, 180, 150	200, 190, 180, 150	100	0.84
TAA27	F-GGATGAAAAATGCTCAAATG R-TAGTACCCACAGGAAGAGAGC	200, 190	200, 190	100	0.26
TAA41	F-AGGTCTACATTGGCATTGTC R-ACATGCAGTGCTATAATGAATG	-	-	-	-
CAC23	F-ATCACAATTACTAGCAGCGCC R-TTGCCATTGTAGCATGTTGG	260, 150	150	50	0.94
cAGG9	F-AATGCTGAAGATAATCCGCG R-TGCCTTGCTCTCCACTCC	400, 390, 220, 200, 110	400, 390, 220, 200, 110	100	0.72
TAA3	F-AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC R-GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	250, 150, 100	250	33	0.99
CAC15	F-TAAATCTCCACTCTGCAAAAAGC R-GATAGGAAGCGCTAGACCC	150	-	0	0.00
CAC33	F-GGTGATGCTGCTACTGATGC R-CAATTGTGAATTTGTGATTCCG	350, 240, 200, 150	350, 240, 200, 150	100	0.73
CAC39	F-AGAAGCCATCTCTCTGCTGC R-AATTCACTCCATTCCATTCC	200, 190	200	50	0.96
TAA33	F-GGTACTGATAGTACTGCGGCG R-GCTAATCGCTACGTCTTCGC	180, 140, 90	180	33	0.94
CCT01	F-TCAACACCTCGAACAGAAGG R-CCCACATGCTAGCACAAGA	490, 210, 160	490, 210	66	0.94
GT03	F-GCCTTCTTGATTTACCGGAC R-TGCTCCGAACCTCATCATTG	-	-	-	-
CT02	F-ACGGTGCCTTTTGAGGTAAG R-TGACTGTGGATTTGGGATG	-	-	-	-
AC01	F-TTGACATCAACATAAAAACAAGAAA R-TTTTAAAATCCCTGACCAGA	160, 150	160, 150	100	0.61
CAG01	F-AACACTCGCACCAAATCCTC R-TAAATGGCAACCCAGCTTTG	350, 170, 150	350, 170	66	0.99
CAT01	F-GCTTTCGATCCCTCCACATA R-GATCCCTACAATCCTTGGTCC	190, 180, 170, 120	190, 180, 170, 120	100	0.62
ATC09	F-TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG R-TGTGAGTGTGTTGTCGCTGTG	210, 190	210, 190	100	0.51
AG14	F-AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA R-CTTCTCTTGGCGAGTGTTC	-	-	-	-
CTT01	F-TCAGACATTGAGTTGCTCG R-TAACCCTTAGGCTTCGGCA	-	-	-	-
CT21	F-CGAACTATTAAGCCGAAAC R-CAACAACCACCTCTCACG	160, 150	160	50	0.99
TC26	F-CTTCTCTTGGCGAGTGTTC R-GAGGGAAAGCCCTAATCTCA	-	-	-	-
CT19	F-CGCCAAGCTTACCCTCACTAC R-GCCACGATTGTAGGGGATAG	150	-	0	0.00



Şekil 1. CAC39 primerinin göstermiş olduğu bant deseni. M: 100 bp DNA Ladder.

Figure 1. PCR profile amplified from DNA using CAC39 SSR primer. M: 100 bp DNA Ladder.

Barkley ve ark. (2006), koleksiyon bahçesinde yer alan 370 turunçgilde, populasyon yapısını ve genetik ilişkiyi belirlemek amacıyla 24 adet SSR primer kullanmıştır. Bu primerlerden CAC23, TAA41, CAC39, TAA3, CAC15, TAA33, GT03,

CT19, CCT01, CT21, CT02, AG14, CTT01, CAG 01, CAC33, TAA27, AC01, CAT01, ATC09, TAA15 ve CAGG9 çalışmamızda da kullanılmıştır. TAA41 primeri çalışmamızda amplifikasyon oluşturmazken, Barkley ve ark. (2006)

çalışmalarında en fazla polimorfizm sağlayan primer olarak tespit etmişlerdir. TAA41 primerinin PIC değeri 0.916 ile 24 primer içerisinde en yüksek rakamı oluşturmuştur. Çalışmamızda da kullanılan 26 primer, limon ve bazı akrabaların (Uzun ve ark. 2011), mandarin genotiplerinin (Kacar ve ark. 2013), turunc ve akrabalarının (Polat ve ark. 2012) genetik farklılıklarını belirlenmesinde kullanılmıştır. Uzun ve ark. (2011), 12 primerden polimorfik, 1 primerden (TAA27) ise monomorfik bant elde etmiştir. En yüksek PIC değeri 0.97 ile CCT01 primerinden, en düşük PIC değeri 0.47 ile ATC09, CAC23 ve TAA45 primerlerinden sağlanmıştır. Kacar ve ark. (2013) ise, 14 primerden polimorfizm elde etmiş, primerlerin PIC değerleri 0.15 (CAC19) ile 1.00 (CCT01) arasında değişim göstermiştir. Yine, Polat ve ark. (2012) 15 primerden polimorfik, 2 primerden monomorfik (TAA27 ve CAGG9) bant elde etmiş ve polimorfik primerlerin PIC değerleri 0.02 (TAA52) ile 0.99 (CAC39) arasında değişim göstermiştir.

Şekil 2’de UPGMA yöntemiyle elde edilen dendrogram verilmiştir. Dendrogramdan da görüldüğü gibi, bireyler arasında yakınlık 0.33 ile 0.90 arasında değişim göstermiştir. Genetik benzerlik oranı en yüksek 0.90 ile *Citrus montana* ve *Citrus winter* arasında olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir genetik yakınlık ise, 0.86 benzerlik oranıyla *Citrus pectinifera* (B6 X 29) SRA ve *Citrus keraji* - Antalya arasında tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Casimiroa tetrameria* (Florida) 0.33 benzerlik oranıyla 81 adet *Citrus* ve akrabaları içerisinde en uzak bireyi oluşturmaktadır.

Casimiroa tetrameria, çalışmamızda kullanılan *Aurantioideae* familyası dışında yer alan tek türdür. Bu tür, *Toddaliaceae* soyu, *Toddaliinae*, alt soyu *Toddaliodeae* alt familyası içerisinde yer almaktadır (Swingle ve Reece 1967). Uzun ve ark. (2009a), genetik tanımlama yapmak amacıyla *Aurantioideae* alt familyasına ait 86 adet citrus ve akrabalarını ele alarak, yirmi bir SRAP primer kombinasyonu kullanmıştır. *Casimiroa tetrameria*’yı *Aurantioideae* alt familyasından uzak bulmamıştır. Swingle ve Reece (1967), *Aurantioideae*’ı *Clauseneae* ve *Citreae* olmak üzere 2 soya ayırmıştır. *Micromelinae*, *Clauseninae* ve *Merrillinae*, *Clauseneae* içerisinde olan alt soyları, *Triphasiinae*, *Citrinae* ve *Balsamocitrinae* ise *Citreae* içerisinde yer alan alt soyları oluşturmaktadır. *Glycosmis pentaphylla*, *Murraya paniculata*, *Clausena excavata* ve *Clausena lansium*, *Clauseneae* soyunda yer almakla birlikte, çalışmamızda ayrı ayrı kümelemelerde *Citreae* soyundan olan genotiplerin içerisinde yer almıştır.

Clausena excavata, *Pamburus missionis*, *Citrus benikoji* ve *Hesperethusa crenulata* dendrogramdaki diğer uzak bireyleri oluşturmuştur. Şekil 3’te verilen PCO analizi sonucunda da bu durum görülmektedir. *Pamburus*, monotipik bir cinstir. Hindistan’ın güneyi ve Sri Lanka’da doğal olarak yetişir. *Hesperethusa crenulata* da monotipik cinstendir, Hindistan ve Hindistan-Çin tarafında doğal olarak yetişir. *Clausena excavata*, *Clausena* cinsi içerisinde yer alan bir türdür. *Citrus benikoji* ise *Citrus* cinsinin *Papeda* alt cinsi içerisinde yer alır (Krueger ve Navaro 2007). *Citrus* cinsine ait bireyler ayrı bir grup oluştururken *C.benikoji* bunlardan farklı bir yerde bulunmuştur. Bu durum Uzun (2009c)’nun SRAP markırlarını kullanarak yaptığı çalışmasında da görülmüş ve 0.51 benzerlik oranıyla diğer *Citrus* cinsi üyelerinden ayrılmıştır. Benzer durum Açar (2007)’in SSR markırlarını kullanarak yaptığı çalışmada da belirtilmiştir.

Uzun ve ark. (2009a), *Aegle marmelos*, *Balsamocitrus dawei* ve *Aeglopsis chevalieri*’yi 0.28 benzerlik değeriyle en

uzak bireyler olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da bu üç grup yine aynı kümeleme içerisinde yer almış, fakat benzerlik indeksi 0.70’lerde olmuştur. Benzer şekilde *Aegle marmelo* ve *Balsamocitrus dawei* Morton ve ark. (2003)’nin çalışmalarında yer almış ve aynı kümeleme içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Bu üç tür, *Balsamocitrinae* alt soy, *Citreae* soy, *Aurantioideae* alt familyasına aittir (Swingle ve Reece 1967).

Severinia buxifolia CRC, *Severina buxifolia*- SRA, *Atalantia ceylanica* CRC 02 ve *Atalantia ceylanica* CRC 3287 çalışmamızda 0.53 benzerlik oranlarıyla birbirlerinden oldukça farklı olmakla beraber aynı kümeleme içerisinde yer almıştır. Bu durum, Morton ve ark. (2003) tarafından da tespit edilmiş ve *Citreae* soyundan olduğu bildirilmiştir. Swingle ve Reece (1967) bu iki türü de *Citreae* soyu içerisinde sınıflandırmıştır. *Severinia*, ilkel turuncgiller (primitive citrus fruit trees) içerisinde yer alır ve en çok tanınan tür *Severinia buxifolia*’dır. *Severinia*, Swingle’in tanımlamasına kadar *Atalantia* içerisinde yer almıştır. 19. yüzyılda Swingle’in tanımlamasından sonra *Severinia*, *Atalantia*’dan ayrılmıştır. *Atalantia*, yakın turuncgiller (near citrus fruit trees) içerisinde yer almaktadır. *Aurantioideae*’da birçok familyada olduğu gibi *Atalantia*’nın taksonimik geçmişi de oldukça karışıktır. Her iki tür birbirine çok benzemekle birlikte petiollerden ayırım göstermektedir (Krueger ve Navaro 2007).

Citrus, *Microcitrus* ve *Eremocitrus* içerisinde yer alan türler diğer turuncgil tür ve akrabalarına göre daha yakın grublar oluşturmuştur. Taksonomi çalışmalarında *Microcitrus* ve *Eremocitrus*’un *Citrus* cinsine en yakın akrabalar olduğu bildirilmiştir. *Eremocitrus* ve *Microcitrus*, *Citrus* ile kolayca melezlenebilir ve “gerçek turuncgiller” arasında yer alır (Krueger ve Navaro 2007; Morton ve ark. 2003; Swingle ve Reece 1967).

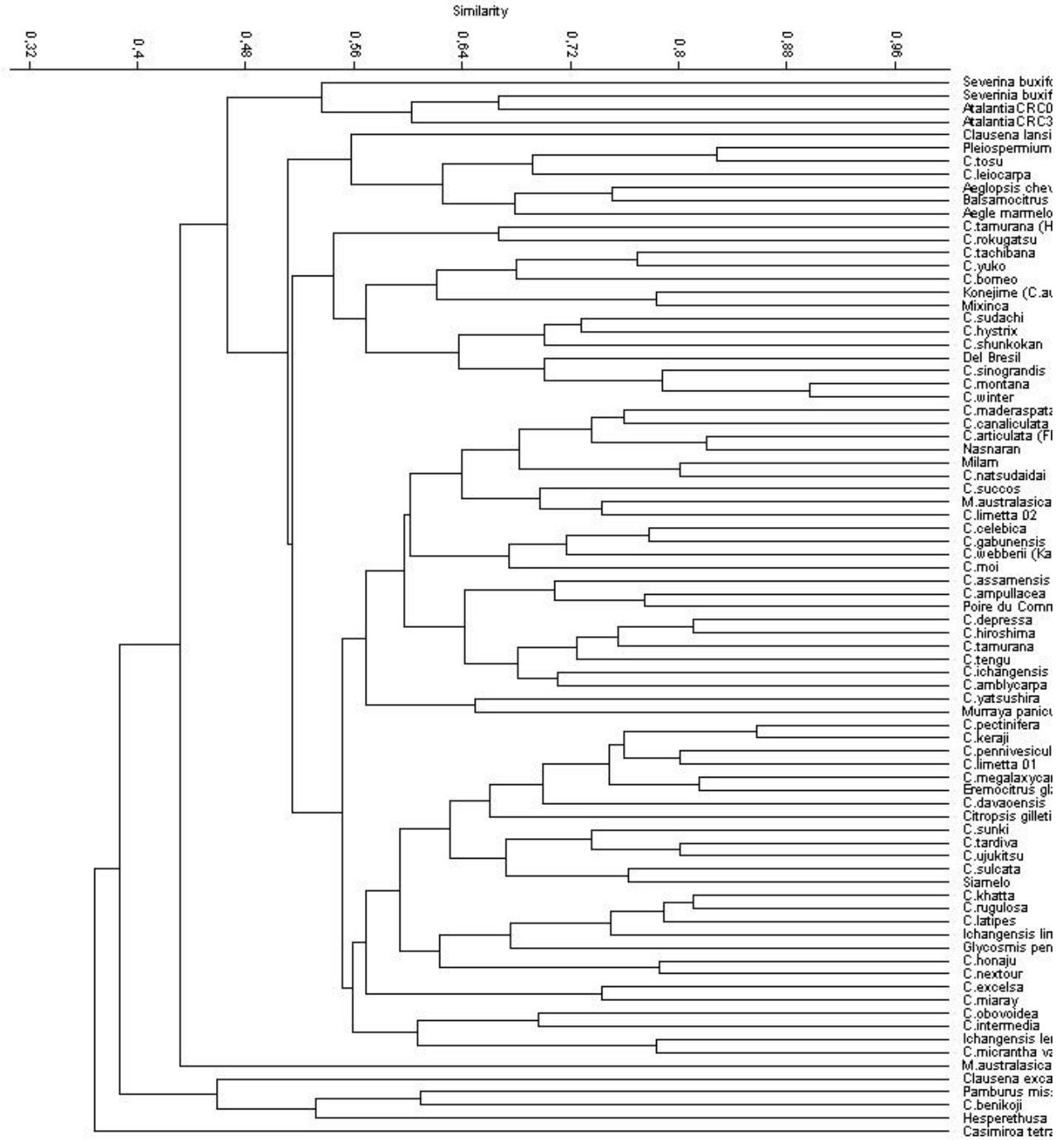
Citrus montana (Wester) ve *Citrus wintersii* Mabb. birbirine en yakın bireyler olarak tespit edilmiştir. *Citrus montana* (Wester) Tanaka tarafından sınıflandırılmıştır (Tanaka 1954). *Citrus wintersii* Mabb.’ın sinonimi *Microcitrus papuana* Winters olup, papua yabani laymı (Papuan wild lime) veya kahverengi parmak laymı (Brown river finger lime) olarak da bilinir. Her iki tür de *Rutaceae* familyasının *Citrus* cinsine aittir (Swingle ve Reece 1967). *Citrus celebica*, *Citropsis gabunensis*, *Citrus webberii* ve *Citrus moi* aynı kümeleme içerisinde görülmektedir. Bu durum Uzun ve ark. (2009a)’nın yapmış oldukları çalışmada da görülmüştür. Celebes papeda olarak da bilinen *Citrus celebica*, *Citrus* cinsine ait türdür. *Citrus webberii*, “Kalpi papeda” olarak da bilinir, mandarin benzeri bir turuncgildir. Her iki tür de *Papeda* alt cinsi içerisinde yer alır. “Gabon cherry orange” olarak bilinen *Citropsis gabunensis*, *Citropsis* içerisinde yer alan ve çalışmamızda kullandığımız başka türlerdir. Fakat bu iki tür farklı grublar içerisinde yer almıştır (Swingle ve Reece 1967).

Çalışma sonucunda, genel olarak türler ve cinsler ayrılmakla beraber, *Aurantioideae* alt familyasının karmaşık olduğu bir kez daha tespit edilmiştir. Morton ve ark. (2003), *Glycosmis* ile *Clausena*’yı aynı kümelemeye ve *Clauseneae* soyundan olduğunu tespit etmişlerdir. Yine, Uzun ve ark. (2009a), aynı kümeleme içerisinde Swingle’in taksonomisinde (Swingle ve Reece 1967) belirttiği gibi *Clauseninae* alt soyu, *Clauseneae* soyundan olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Uzun ve ark. (2009a), *Clauseninae* alt takımı *Citreae* takımının alt takımından ayrı olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, *Aurantioideae* alt familyasının

oldukça karmaşık olduğu belirtilmiştir. Taksonomik çalışmalarda, Swingle ve Reece (1967) *Aurantioideae* alt familyasında çok farklı cinsler ve türlerin bulunduğunu ve bu durumun *Aurantioideae* alt familyasının karmaşık ve tartışmalı olmasına neden olduğunu bildirmiştir. Yıllar boyunca *Citrus* ve birçok ilgili cinsler birbirleriyle kolaylıkla mezlelenebilmiş ve sonuçta yeni cins ve türler oluşmuştur.

Çalışmamızda, SSR'lar birçok *Citrus* ve akrabalarının ayırt edilmesinde uygun moleküler belirteç olarak bulunmuştur.

Benzer sonuçlar, çeşitli araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir. SSR belirteçler, bazı akraba türler, limon, şadok, ağaç kavunu, mandarin (Gülşen ve Roose 2001; Polat ve Turgutoğlu 2012), portakal (Novelli ve ark. 2006; Jiang ve ark. 2006), üç yapraklılarda (Jiang ve ark. 2006; Polat 2009) genetik tanımlama yapmak amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Barkley ve ark. (2006), turuncgil gen bankasının oluşturduğu koleksiyon bahçesinde mevcut bulunan, 370



Şekil 2. 18 SSR belirteciyle 81 turuncgil genotipinin oluşturduğu kümeleme analizi.

Figure 2. Dendrogram of the 81 accessions of Citrus genotypes based on the 18 SSR markers.

- Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Adana.
- Amar MH, Biswas MK, Zhang Z, Guo WW (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). *Theor Appl Genet* 112: 1519–1531.
- 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.
- Campos ET, Espinosa MAG, Warburton ML, Varela AS, Monter AV (2005) Characterization of mandarin (*Citrus ssp*) using morphological and AFLP markers. *Interciencia* 30:687–693.
- Chen C, Bowman KD, Choi YA, Dang PM, Rao MN, Huang S, Soneji JR, McCollum TG, Gmitter FG (2008) EST-SSR genetic maps for Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. *Tree Genetics & Genomes* 4:1–10.
- 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.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297–302.
- Fang DQ, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (1997) Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genetic* 95:211–219.
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genetic* 94:812–822.
- Ferrante SP, Lucretti S, Reale S, De Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano MT (2010) Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n\ 5\ 4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173:223–233.
- Gmitter FG, Grosser JW, Moore AG (1992) Citrus. In: Hammerschlag, F. and R. Litz (eds.), *Biotechnology of perennial fruit crops*. Pp: 335–69. CAB Int. Wallingford, UK.
- Gulsen O, Uzun A, Canan I, Seday U, Canihos E (2010) A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica* 173:265–277.
- Gülşen O, Roose ML (2001) Limonlarda genetik çeşitlilik, bazı turuncgillerle akrabalık derecelerinin DNA markirlarının kullanılarak belirlenmesi. *Bahçe* 30 (1-2): 53 – 63.
- Hildebrand CE, Torney DC, Wagner RP (1992) Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science* 20:100–102.
- Jiang D, Zhong GY, Hong QB (2006) Analysis of microsatellites in Citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica* 33 (4): 345–353.
- Kacar Y, Uzun A, Polat I, Yesiloglu T, Yilmaz B, Gulsen O, Tuzcu O, Kamiloglu M, Kurt S ve Seday U (2013) Molecular characterization and genetic diversity analysis of mandarin genotypes by SSR and SRAP markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.11 (1): 516 - 521.
- Krueger RR, Navaro L (2007) Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. Edit: I.Khan. Chapter: “Citrus Germplasm Resources” 45–140.
- Morton CM, Grant M, Blackmore S (2003) Phylogenetic relationships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 90: 1463–1469.
- 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. *Theor. Appl. Genetic* 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: (1): 90–96.
- Polat İ (2009) Üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) ve üç yapraklı melezleri grubu turuncgillerin genetik akrabalık ve farklılıklarının SSR moleküler markirlarla tanımlanması. *Derim* 26 (2): 30–41.
- Polat İ, Turgutoglu E (2012) Bazı altıntop (*Citrus paradisi*) ve şadoklarda (*C. maxima*) genetik akrabalık ve farklılıklarının SSR markirlarlarıyla tanımlanması. *Akdeniz Ün. Zir. Fak. Derg.* 25 (1):1–7.
- Polat I, Aka-Kacar Y, Yesiloglu T, Uzun A, Tuzcu O, Gulsen O, Incesu M, Kafa G, Turgutoglu E, Anil S (2012) Molecular Characterization of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.) Accessions and Their Relatives Using SSR and SRAP Markers. *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 3267–3276.
- Rahman MM, Nito N (1994) Use Of Glutamate-Oxaloacetate Transaminase Isozymes For Detection Of Hybrids Among Genera Of The True Citrus-Fruit Trees. *Scientia Horticulturae* 58 (3): 197–206.
- 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>.
- Scarano MT, Abbate L, Ferrante S, Lucretti S, Reale S, Tusa N (2006) Molecular characterization of new citrus tetraploid hybrids by means of SSR markers. *Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Potenza, Italy – 12/15 September*. C. 51.
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchel SE, Kresovich S, Tiegle J (1997) An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163–173.
- Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber, H J, Batchelor L D. (Eds.), *The Citrus Industry*, vol: 1. University of California Press, Berkeley, CA, USA, pp. 389–390.
- 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.
- Tanaka T (1954) Species problem in *Citrus*: a critical study of wild and cultivated units of *Citrus*, based upon field studies in their native homes. P. 9:111 in: Tanaka, T., *Revisio Aurantiacearum*.
- Uzun A, Yesiloglu 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 selections. *Scientia Horticulturae* 120: 473–478.
- Uzun A (2009c) Tutunçgillerde Genetik Çeşitliliğin SRAP Markirları ile Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Adana.
- Uzun A, Yesiloglu T, Polat I, Aka-Kacar Y, Gulsen O, Yıldırım B, Tuzcu O, Tepe S, Canan I, Anil S (2011) Evaluation of Genetic Diversity in Lemons and Some of Their Relatives Based on SRAP and SSR Markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29: 693–701.