

## LİMONLARDA GENETİK ÇEŞİTLİLİK, BAZI TURUNÇGİLLERLE AKRABALIK DERECELERİNİN DNA MARKIRLARININ KULLANILARAK BELİRLENMESİ<sup>1</sup>

Osman GÜLŞEN<sup>2</sup>

Mikeal L. ROOSE<sup>3</sup>

### ÖZET

Seksen-üç limon çeşidi, bazı akraba türler ve bazı ebeveyn olduğu söylenen şadok (*C. maxima*), ağaç kavunu (*C. medica*) ve mandarin (*C. reticulata*) arasındaki genetik çeşitlilik ve bunlar arasındaki genetik ilişkiler izoenzimler, ISSR (inter-simple sequence repeats) ve SSR (microsatellite) markırları kullanılarak analiz edilmiştir. İzoenzimler çalışılan limonlar arasında çok az varyasyon göstermiştir. Sekiz ISSR primeri toplam 103 polimorfik fragment üretmiştir. Benzerlik katsayıları hesaplanmış ve tartılmamış çift grup aritmetik ortalama metodu ve gruplandırma analiziyle (UPGMA) genetik ilişkileri gösteren filojenik ağaç oluşturulmuştur. Bütün limonlar, kaba limonlar, tatlı limonlar ve hibrit olduğu düşünülen bazı tipler ağaç kavunlarıyla aynı grupta yer almıştır. Altmış-iki limondan 48 tanesi genetik olarak aynı bulunmuştur. Bu nedenle 48 limonun çok fazla genetik değişiklikleri içermeyen klonal ebeveynlerden mutasyonlar sonucu olduğu önerilebilir. Ağaç kavunlarının limon, kaba limon, tatlı limon ve tatlı limonların çekirdek DNA'larının büyük bölümünü oluşturduğu, ISSR markırları kullanılarak tespit edilmiştir. Limonlarda bazı *C. reticulata* ve *C. maxima* spesifik ISSR markırları tespit edilmiştir. ISSR markırlarında olduğu gibi, çalışılan SSR markırları da limonlar arasında genetik varyasyon göstermemiştir, fakat taksonomik olarak nispeten birbirinden uzak gruplar arasında önemli varyasyon saptanmıştır.

### GİRİŞ

Limonlar yaygın olarak kabul edilen taksonomik sistemler tarafından turunçgiller (*Citrus* spp.) içinde bir tür olarak (*C. limon* L.) kabul edilmesine rağmen (13,14) bir çok çalışma limonun hibridizasyon sonucu meydana gelmiş olabileceğini belirtmiştir (2,10,16).

Bazı limonlar çok benzer morfolojik ve biyokimyasal karakterlere sahip olmasına rağmen, bazıları da bir hayli farklı karakterlere sahiptir. Moleküler markırlar ise çok fazla olmasa da bazı farklılıkları ortaya koymuştur (3,5).

Turunçgil sistematğinde karışıklıklara neden olan birkaç faktör vardır. Nusellar (aseksüel) fidanlar ana ağaçlara göre daha di-

<sup>1</sup>Yayın Kuruluna geliş tarihi: Temmuz 2001

<sup>2</sup>Zir. Yük. Müh. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü 33740, Erdemli/İÇEL

<sup>3</sup>Prof. Dr., Botany and Plant Sciences. University of California, Riverside, USA. 92521-0124

kenli ve daha uzun boylu olmakla farklılaşır. Genetik olarak farklı ebeveynler arasında bir hibrit oluşturulduğu zaman nusellar embriyo oluşturma özelliğine sahip bireyler kendi kendilerini çoğaltarak morfolojik ve genetik olarak farklıymış gibi görünen hayli büyük gruplar oluşturabilirler. Bu, nusellar bir fidanın bir çeşit veya nadirinde olsa turunçgil taksonomistleri tarafından farklı bir tür olarak adlandırılmasına yol açabilir. Turunçgil taksonomisinde karışıklığa yol açan diğer bir problem turunçgil ve onun yakın akrabaları arasında görülebilen cinslerarası hibridizasyonlardır (8).

Bu çalışmada 58 limon çeşiti arasındaki ağırlıklı olarak mutasyon sonucu oluşan limonların hibridizasyon sonucu meydana gelen limonlardan ayırdedebilmek için moleküler markır farklılıkları araştırılmıştır. Ayrıca limonların ağaç kavunlarıyla, şadok, mandarin ve seçilen bazı turunçgil türleriyle diğer üç cinse bağlı türler arasındaki akrabalık ilişkileri araştırılmıştır.

ISSR tekniği rasgele tekrarlanan DNA'ları kullanır ve primer kullanılarak yapılan DNA güçlendirmesi yakın akraba olan toplulukları kolayca birbirinden ayırır (19). Teknik 3' ve 5' DNA molekülü sonlarında 2 ile 4 DNA ile sabitlenen (TG)<sub>7</sub> gibi tekrarlanan DNA moleküllerinin karışımlarını içerir. Bu tekniğin avantajı genellikle bir tek PCR (polymorphic chain reaction) reaksiyonu ile bir çok polimorfik bant üretebilmesi, RAPD ve RFLP gibi tekniklere nazaran markır başına maliyetin düşük olmasıdır. ISSR markırları genellikle dominant markırlardır ve bu yüzden bireylerin heterozigot olup olmadığını tespit etmek güçtür. SSR'lar kodominant markırlardır (12) ve genel olarak bir çok allele sahiptir. Bu yüzden hibritlerin muhtemel orijini bulunabilir. PCR güçlendirmesi için hızlı olarak bireyleri ayırdedebilecek rasgele tekrarlanan DNA'ları çevreleyen primerler kullanılır. Allelik varyasyonlar tekrarlanan ünitelerin sayısından kaynaklanır.

## MATERYAL VE METOT

### *Bitki materyalleri*

Seksen-dokuz genotip izoenzimler kullanılarak, 72 genotipe SSR 83 genotipe ise ISSR tekniği kullanılmıştır. Örnekler 57 limon (*C. limon* (L.) Bur. f.), 6 ağaç kavunu (*C. medica* L.), 4

şadok (*C. maxima* (L) Osbeck), 9 kaba limon (*C. jambhiri* Lush.), 1 laym (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) ve 1 adet mandarin (*C. clementina* Hort. ex Tanaka or *C. reticulata* Blanco)'le 18 adet diğer turunçgil ve akraba cinslerden oluşmuştur (Çizelge 1). Çalışılan limonlar ekonomik ve genetik olarak önemli genotiplerle bazı hibrit olduğu belirtilen çeşitlerden oluşmuştur. Hem DNA hem de enzim ekstraksiyonu için bitkilerin genç yaprakları kullanılmıştır.

### *DNA Ekstraksiyonu*

ISSR ve SSR çalışmaları için toplam DNA genç yapraklardan Webb ve Knapp (17)'in protokolunun modifiye edilmiş şekli ile izole edilmiştir. DNA'yı çözmek için 250 ul TE ilave edilmiştir.

### *İzoenzim Analizi*

İzoenzimler Xiang ve Roose (18)'un metoduna göre analiz edilmiştir. Allellerin açıklanması Torres ve arkadaşları (15)'na göre yapılmıştır. Aşağıda adları verilen 4 enzim sistemi analiz edilmiştir; GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), IDH (isocitrate dehydrogenase), MDH (malate dehydrogenase), ve SkDH (shikimate dehydrogenase). İki lokusu analiz edilen MDH sistemi hariç, her sistemde yalnızca 1 lokus çalışılmıştır.

### *SSR Analizi*

Çekirdek genomik DNA'yı güçlendirmek için toplam 5 çift primer kullanılmıştır (9). Floresan olarak işaretlenen doğrusal primerler LiCor firmasından, işaretlenmemiş ters primerler ise Cruachem Inc. veya Genosys Inc. firmalarından satın alınmıştır. PCR güçlendirmeleri 5 ng genomik DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.2 ünite Taq polimeraz, 25 uM doğru ve ters primerler ve 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) içeren 10 ul'lik hacimler halinde yapılmıştır. Doksan-altı gözü olan PCR makinası RoboCycler Gradient 96 (STRATAGENE<sup>R</sup> Inc.) kullanılmıştır. PCR şartları Çizelge 2'de gösterilmiştir. LiCor durdurma çözeltisi her PCR tüpüne ilave edilmiştir. PCR ürünlerinin

Çizelge 1. İzoenzim, ISSR ve SSR çalışmasında kullanılan genotipler “X” ile gösterilir ve Tanaka sistemindeki adları, CRC (Citrus Research Center, University of California, Riverside, ABD) numaraları verilir.

**Table 1. Accessions used in isozyme, ISSR, and SSR studies are marked with X and are identified by Tanaka species name CRC identification number (Citrus Research Center, University of California, Riverside, USA)**

Tanaka sistemine göre tür adları-Latince	CRC No	Çeşit adı	İzoenzim	SSR	ISSR
<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	1710	Meksika laymı	X	X	
<i>C. aurantium</i> L.	0628	Standard turuncu	X	X	
<i>C. aurantium</i> L.	2438	Tunus turuncu	X	X	
<i>C. bergamia</i> Risso and Poit.	2881	Bergamot	X	X	
<i>C. clementina</i> Blanco	0279	Klemantin mandarini	X	X	X
<i>C. halimi</i> B. C. Stone	3900			X	X
<i>C. indica</i> Tan.	3163	Hindistan yabani portakalı	X	X	
<i>C. jambhiri</i> Lush.	1222	Mazoe kaba limonu	X		X
<i>C. jambhiri</i> Lush.	2325	Güney African kaba limonu			X
<i>C. jambhiri</i> Lush.	3385	Florida kaba limonu	X	X	X
<i>C. jambhiri</i> Lush.	3386	Estes kaba limonu	X		X
<i>C. jambhiri</i> Lush.	3060	Kaba limonu			X
<i>C. limetta</i> Risso	3492	Irak tatlı limonu	X	X	X
<i>C. limetta</i> Risso	2695	Faris tatlı limonu	X		X
<i>C. limetta</i> Risso	0569	Millsweet tatlı limonu	X	X	X
<i>C. limetta</i> Risso	3093	Tatlı limon	X	X	X
<i>C. limettioides</i> Tan	3051	Mitha-Tulia	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	3009	Messina limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	0280	Villafranca limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	3392	Monachello limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	0390	Villafranca limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	0565	Genoa limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	0599	Variegated Eureka limonu	X		X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	0710	Chinese limon	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	2317	Real limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	2323	India limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	2429	Amber limonu	X	X	X
<i>C. limon</i> (L.) Bur. f.	2899	İtalyan Pembe limonu	X		X

C. limon (L.) Bur. f.	3001	Çekirdeksiz Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3005	Frost Eureka limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3007	Allen Alacalı limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3010	Kaweah Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3013	Lupe nusellar limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3043	Corona old line Eureka	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3159	Lunario limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3176	Frost Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3200	Limui Sangui limonu		X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3300	Wild limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3387	Arancino limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3388	Femminello oval limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3389	Femminello Sfusato limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3491	Primofiore limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3496	Allen Newman Eureka	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3498	Cascade Eureka limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3499	Blanchard Eureka limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3500	Femminello Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3501	Limoneira 8A Lizbon	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3505	Prior Lizbon o. p. limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3506	Bergamot limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3590	Berna limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3591	Corpaci limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3593	Interdonato limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3835	Galligan Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3836	Foothill Lizbon limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3837	Cook Eureka limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3838	Ross Eureka limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3839	Monroe Lizbon limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3840	Rosenberger Lizbon	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3885	Yerli İran limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3893	Ricote limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3894	Santa Teresa limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	4005	Lapithiotiki limonu	X	X	
C. limon (L.) Bur. f.	4014	Taylor Eureka limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3194	Kusner limonu	X		X
C. limon (L.) Bur. f.	3045	Kulu (gombru) limonu	X	X	X

C. limon (L.) Bur. f.	3199	Soh Long limonu			X
C. limon (L.) Bur. f.	3261	Soh Synteng limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3265	Bitrouni o.p. limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3390	La Porto limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3841	Nicaraguan limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3892	Mesero Eureka limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3924	Peretta limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur. f.	3970	Limonero Fino limonu	X	X	X
C. limon (L.) Bur.f.	3737	Improved Meyer limonu	X	X	X
C. limonia Osbeck	3932	Hangleson Rangpur laymı	X	X	X
C. lumia Risso and Poit	3925	Lumia	X	X	X
C. maxima Burm. Merrill	2355	Kao Panne sadok	X	X	
C. maxima Burm. Merrill	1224	Şadok seedling	X	X	X
	1462	Küba şadoğu			X
C. maxima Burm. Merrill	2240	Siamese asitsiz	X	X	X
C. maxima Burm. Merrill	2346	Afrikan şadoğu	X	X	X
	3555	Cocktail altıntop			X
C. maxima Burm. Merrill	2340	İsimsiz şadok	X	X	X
C. medica L.	3819	Ağaç kavunu	X	X	X
C. medica L.	3527	Hiawassie ağaç kavunu	X	X	X
C. medica L.	3532	Papuan ağaç kavunu	X	X	X
C. medica L.	3768	Buddha's Hand	X	X	X
C. medica L.	3891	Ethrog ağaç kavunu	X	X	X
C. medica L.	3523	Diamante ağaç kavunu		X	X
C. micrantha Wester	3605	Samuyao papeda	X	X	
C. sinensis (L.) Osbeck	2750	Olinda Valencia portakalı	X	X	X
C. tengu Hort. ex Tan.	3464	İsimsiz şadok hibridi	X	X	X
Eremocitrus glauca (L.) Swing.	3463	Avusturalyan çöl laymı	X	X	
Fortunella polyandra (Ridl.) Tan.	3901	Malayan kamkat	X	X	
Microcitrus australis (Planch.)	3666	Australyan round laymı	X		

92°C'de 3 dakika denatürasyonundan sonra otomatik bir makine olan LiCor 4200LR Sequencer'de 18 cm'lik % 6 Long Ranger™ jelleri kullanarak ayrılmış ve fragment büyüklükleri RFLPSCAN™ (Scanalytics) bilgisayar programı ile saptanmıştır.

#### ISSR Analizi

Daha önceden çalışılan (5) toplam 8 primer PCR (Çizelge 2) güçlendirmeleri için kullanılmıştır. Primerler İngiliz Kolombiyası Üniversitesi ve Cruachem (Kaliforniya, USA) firmasından satın alınmıştır. Her 15 ul'lik PCR reaksiyonu 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0.2 mM, 1 mM primer, %0,01 gelatin, %2 formamide, 1 ünite Taq polimeraz (Promega, Wisconsin) ve 25 ng çekirdek DNA'sı içermiştir. PCR şartları bütün primerler için aynı olmuştur. PCR reaksiyonu süresince buharlaşmayla hacim kaybını önlemek için her PCR tüpüne 50 ul mineral yağ ilave edilmiştir. PCR reaksiyonları doksan hazneli Ericomp termal PCR makinası (Ericomp Inc., Kaliforniya, USA) kullanılarak aşağıdaki şartlarda yürütülmüştür: 1 defa 94°C'de 3 dakika ve daha sonra 27 defa 94°C'de 30 saniye, 52°C'de 45 saniye, 2°C'de 2 dakika ve son olarak 1 defa 72°C'de 7 dakika. Güçlendirilen DNA ürünleri 320mm X 380 mm X 0.40 mm (kalınlık) % 6 denature etmeyen, 3 M üre ve 1 X TBE çözeltisi içeren poliakrylamid jellerde ayrılmıştır (19). DNA'lar gümüş nitratla boyama yöntemiyle tespit edilmiştir.

#### Veri analizleri

Sonuçların etkinliğini ve toplam polimorfik bant sayısını arttırabilmek için izoenzim ve SSR'in allelik verileri birleştirilmiştir. Müşterek bantları kullanarak ISSR ve izoenzim-SSR verilerinin ayrı ayrı benzerlik matrisleri Dice (4)'ün metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Gruplandırma sayısal taksonomi ve multivaryasyon analizi yapabilen NTSYS-PC version 1.80 paket programı kullanılarak tartılmamış çift grup aritmetik ortalama (unweighted pair-group method yada UPGMA)'yla yürütülmüştür (11).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### İzoenzimler ve SSR

Beş lokusa ait 12 izoenzim alleli ve 5 primer çifti ile oluşturulmuş 36 polimorfik SSR fragmenti allelik karakterler olarak kaydedilmiştir. Toplam olarak ise 48 allel tespit edilmiştir. Yetmiş-iki genotip filojenik ağaç üzerinde gruplandırılmıştır. SSR çalışmasında, en fazla bant primer TAA41'dan (16 adet) elde edilmiştir. En az fragment ise primer CAC33'dan elde edilmiştir.

Çizelge 2. Limonlarda çeşitlilik ve filojeni çalışmak için kullanılan ISSR primerleri ile kaydedilen fragmentlerin sayısı.

Table 2. ISSR primers used to study diversity and phylogeny of lemon and the numbers of fragments observed and scored for each primer.

Primer*	Fragment sayısı	Kaydedilen polimorfik fragmentler
BDB(CA) <sub>7</sub> C	50	15
DBDA(CA) <sub>7</sub>	55	14
(GT) <sub>8</sub> YA	30	4
HVH(CA) <sub>7</sub> T	55	18
VHVG(TG) <sub>7</sub>	50	16
HVH(TCC) <sub>7</sub>	37	13
(GA) <sub>8</sub> YG	62	12
(TCC) <sub>5</sub> RY	35	11
Toplam	374	103

\*R= purin, Y= pirimidin, B= non-A, D= non-C, H= non-G, V= non-T

Her genotip için 10 izoenzim ve SSR lokusundaki fragment sayısı, heterozigotluk seviyesini tespit etmek için sayılmıştır (Çizelge verilmemiştir). Üç temel tür ve 3 akraba cinsin ortalama 12 yada 13 fragmente sahip olmasına rağmen limonlar 18 fragmentle en yüksek allel sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu, limonların oldukça heterozigot yapıda olduğunu göstermektedir.

Limon çeşitleri arasında çok az varyasyon bulunmuştur ki bu önceki çalışmalarla uyum içerisinde (1). Aşağıda da açıklandığı gibi çoğu limonun aynı izoenzim yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. İnterdonato limonunun hem IDH hem de SkDH için SS, Çin limonunun ise SkDH için SS, IDH için MM ve MDH-1 ile -2 için SS/FF olduğu tespit edilmiştir. Sweet, Irak ve Millsweet limonlarının IDH için II olduğu bulunmuştur. Diğer 48 limon çeşidinin ise test edilen 5 lokus için heterozigot olduğu bulunmuştur. Bunlar IDH için SI, MDH için FS/FF, GOT için FS ve SkDH için ise FS'dır. Homozigot lokus oranı ile turuncgil bitkilerinin evrimsel orijini arasında yakın bir ilişki vardır. Daha yüksek oranlarda fikse edilmiş homozigot lokus oranına sahip tipler primitif olmasına rağmen daha az oranlarda fikse edilmiş homozigot lokusa sahip olanlar ise hibrid orijine sahiptir (6).

İzoenzim ve SSR verileriyle oluşturulan filojeni ağacının ISSR verileriyle oluşturulan filojeni ağacına benzediği tespit edilmiştir (aşağıya bakınız). Bütün çalışılan limonların ağaç kavununa şadoklara nazaran daha benzer olduğu ve 1.0 benzerlik katsayısı ile çok küçük bir varyasyona sahip olduğu saptanmıştır. Limonlar, tatlı limonlar, kaba limonlar, Bergamot, Meksika laymı ve tatlı laymlar arasında 0.75 ile 0.80 arasında değişen oranlarda yüksek benzerlik katsayıları tespit edilmiştir. Örnekler arasındaki ilişkilerin detayları aşağıda tartışılmıştır.

### ISSR Markırları

DNA'ların 8 ISSR primeri ile güçlendirilmesi çoklu bant profilleri ortaya çıkarmıştır. Primer başına bant sayısının ise 30 ((GT)<sub>8</sub>YA) ile 55 bant (DBDA(CA)<sub>7</sub>) arasında değiştiği görülmüştür. Kaydedilen bantların sayısı ise 4 ((GT)<sub>8</sub>YA) ile 18 (HVH(CA)<sub>7</sub>) arasında değişmiştir (Çizelge 2).

Bazı önemli gruplar arasında müşterek olan polimorfik ISSR bantlarının sayısı tespit edilmiştir (Çizelge 3). Bu çizelge gruplar arasındaki akrabalık derecelerini tespit etmek için kullanılabilir.

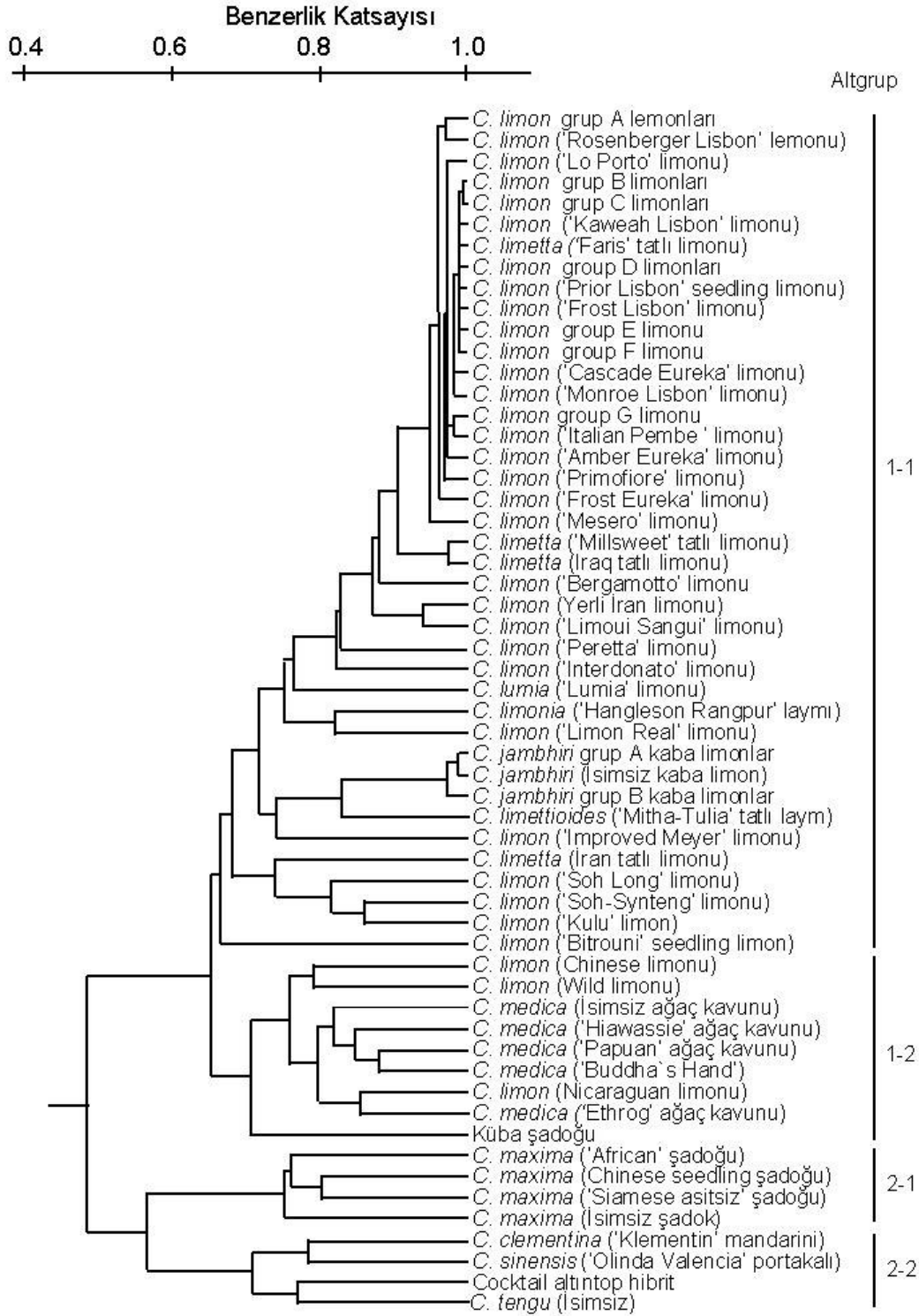
Yüz-üç polimorfik ISSR bandını kullanarak Dice (4) metoduna göre benzerlik matrisi yapılmıştır. Şekil 1, UPGMA gruplandırma metoduyla yapılan filojeni ağacını göstermektedir. Bu ağacı kullanarak bütün örnekler 0.47 benzerlik katsayısıyla iki gruba ayrılabilir.

Birinci grup bütün ağaç kavunu ve limonları içerir ve 0.65 benzerlik katsayısına sahip olan iki alt gruba sahiptir. Alt Grup 1 gerçek limonları, kaba limonları, limon hibritlerini, tatlı limonları ve bir adet tatlı laymı içermektedir. Yüz-üç adet polimorfik bant kaydedilmesine rağmen gerçek Eureka ve Lizbon limonlarını da içeren 18 limon arasında herhangi bir genetik farklılık görülmemiştir. Bu, bu gruba giren ve yetiştiriciliği yapılan 18 limon çeşidinin seksüel rekombinasyon ile değil de çok fazla DNA değişikliği içermeyen mutasyonlardan oluştuğunu

Çizelge 3. Çeşitli önemli gruplar arasında müşterek olan ISSR bantlarının sayısı. İkinci numara ise her çift için kaydedilen bantların sayısını gösterir. Bütün çalışılan örneklerde bu müşterek bantlara ilave olarak 6 monomorfik band tespit edilmiştir.

Table 3. Number of polymorphic ISSR bands shared by various pairs of groups. The second number shows the number of potentially scorable bands in that pair of taxa. Six additional bands were monomorphic in all taxa studied fragments.

	Kaba limon	Ağaç kavunu	Şadok	Mandarin	Olinda Valencia portakalı	Improved Meyer limon
Limón (Ana grup)	45/98	40/103	25/98	30/103	28/103	45/103
Kaba limon	-	37/96	19/96	25/96	22/96	40/98
Improved Meyer	40/98	34/103	15/101	26/103	24/103	-
Enterdonat	39/98	40/103	17/98	20/103	17/103	38/103
Tatlı limon ( <i>C. limetta</i> )	42/98	35/103	20/101	20/103	20/103	37/103
Hangleson ( <i>C. limonia</i> )	41/98	35/103	14/102	23/103	19/103	37/103
Olinda Valencia portakalı ( <i>C. sinensis</i> )	22/96	19/103	25/102	35/103	-	24/103



Şekil 1. ISSR verilerinden 83 turuncğil çeşidine ait UPGMA dendogramı.

Figure 1. UPGMA dendogram of 83 accessions of Citrus from ISSR data.



gösterir. Bu grup aşağıda “Grup A” olarak adlandırılır ve Femminello Lizbon, Foothill Lizbon, Villafranka Eureka, Cook Eureka, Allen Variegated, Messina, Femminello Sfusata, Femminello oval, Corona old line, Eureka, Arancino, Kusner, çekirdeksiz Lizbon, Genoa Eureka, Ross Eureka, Ricote Eureka, Blanchard Eureka, Lupe nusellar Lizbon ve Lunario limonlarını içermiştir. Aynı genotipe sahip olan diğer bir çift ise Taylor Eureka ve Limonero Fino limonlarıdır. Monachello, Villafranka Eureka (CRC, 280) ve Allen Newman %99 oranında ana grupta bulunan limonlara benzetilmektedir. RFLP çalışması (1) Monachello limonunun genetik olarak diğer limonlara benzediği için zigotik orijine sahip olmadığını göstermiştir ki bu, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyum içerisindeydi.

Ana gruba ait limonlar mandarin ve şadoklarda bulunmayan 18 ISSR bandını ağaç kavunlarıyla paylaşmıştır. Ayrıca bu 18 limon çeşidi mandarin ve şadoklarla diğer muhtemel ebeveynlerde bulunmayan, sırasıyla 6 ve 8 bandı paylaşmıştır. Bu yüzden limonların ağaç kavunu, mandarin ve şadok ebeveynlerine sahip olduğu söylenebilir. Fakat nusellar olduğu gözlenen limon genomunun en büyük bölümünün ağaç kavunu tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir.

Sadece birkaç tane farklı fragmente sahip olan Berna, Lapithioki, Rosenberger ve Lo Porto limonları 0.96 benzerlik katsayısı ile ana gruptaki limonlarla yakın akraba oldukları gözlenmiştir. Çalışılan 5 kaba limon çeşidi Altgrup 1 içerisinde yer almıştır. Onları ana gruptaki limonlardan ayıran birçok fragment tespit edilmesine rağmen kaba limonlar (*C. jambhiri*) arasında sadece birkaç polimorfik fragment bulunmuştur. Dört kaba limonun ise izoenzim paternleri ise tamamen aynı bulunmuştur. Bunlar: MDH-1 ve -2 için FS/FF, IDH için MI ve GOT için FS. Bu grup ise ana grup limonlarıyla birlikte yalnızca mutasyonla oluşan diğer gruplardır. Örneğin Mazoe ve Florida kaba limonları bütün 103 polimorfik bant için tamamen benzer ISSR paternlerine sahiptir.

İki Villafranca Eureka limonunun 280 no`lu olanı (GA)<sub>8</sub>YG primeri için bir adet ekstra bantta sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılık ya bu limonun mutasyon sonucu ekstra bir bant kazanmasıyla ya da diğer Villafranca limonunun

mutasyon sonucu bir bant kaybetmesiyle meydana gelmiş olabileceğiyle ifade edilebilir.

Yukarıda anlatılanlardan başka, diğer limonlar 0.8 benzerlik katsayısı ile birbirinden genetik olarak kolayca ayırt edilirler. Bu sonuçlar bütün limonların 1/3`ünün diğer gerçek limonlardan farklı bir orijine sahip olduğunu göstermektedir. Farklı orijine sahip olan limonlar şunlardır: Interdonato, Real limon, İran limonu, Limoui Sangui, Peretta, Lumia (*C. lumia* Risso ve Poit), Improved Meyer, Soh-Long, Soh Synteng, Kulu, Bergamot limonu ve Bitrouni. Bu sonuçlar limonlarda yapılan RAPD çalışmasıyla uyum içindedir (3). Hangleson Rangpur (*C. limonia* Osbeck) ve Mitha-Tulia (*C. limettioides* Tan.) limonlarla sırasıyla 0.76 ve 0.71 benzerlik katsayılarını vermiştir. Dört tatlı limon (*C. limetta*) çeşidinden üç tanesi, Faris, Irak ve Millsweet birbirlerine yakın olarak gruplandırılmıştır. Fakat bu 3 tatlı limon dördüncü tatlı limon (3093 CRC numaralı) u ile 0.64 gibi düşük benzerlik katsayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu, son *C. limetta* genotipinin muhtemelen diğer 3 tatlı limon çeşidinden farklı bir orijine sahip olduğunu göstermektedir. Bu RFLP çalışmasıyla uyum içindedir (7). Limonların 2/3`i ise muhtemelen bir veya birkaç aneştral limondan mutasyon veya nuseller gelişme sonucu meydana gelmiştir.

Altgrup 2, 4 ağaç kavunu türü ve birkaç muhtemel hibrit orijinli limonu içermektedir. Bu limonlar Çin limonu, Wild limon ve Nikaragua limonudur. Çin limonu üç lokustaki izoenzim açısından üç ağaç kavunu genotipiyle tamamen aynı fenotipi göstermiştir ki bunlar: MDH-1 ve -2 (SS/FF), IDH (MM) ve GOT (FF). Wild limon MDH-1 ve -2 lokusları için öteki ağaç kavunlarıyla aynı genotipe sahiptir. Bu üç genotip gerçek limonlara göre daha az toplam bant sayısına sahiptir ki bu, ağaç kavununda olduğu gibi düşük heterozigotluk seviyesini göstermektedir. Bunları limon hibritleri olarak sınıflandırmak yerine ağaç kavunu veya belkide ağaç kavunu hibridi olarak sınıflandırmak daha doğru olacaktır.

Grup 2, 0.55 benzerlik katsayısı ile iki alt gruba sahiptir. Alt Grup 1 dört şadok (*C. maxima*) içerir. Bunlar iki isimsiz şadok fidanı, Siamese asitsiz ve Güney Afrika şadoğudur. Şadoklarla ana gruba ait limonlar arasındaki müşterek bantların oranı 25/98`dir (Çizelge 3).

Bu açıkça şadokların ağaç kavunlarından daha az miktarda nükleer genomu limonlara seksual hibridizasyon sonucunda aktardığını göstermektedir.

Alt grup 2 bir şadok ile mandarin hibridi (Cocktail greyluft), Olinda Valencia portakalı, Klemantin mandarini (*C. clementina* Hort. ex Tanaka) ve şadok ile mandarin hibridi olduğu düşünülen bir genopiti (*C. tengu* Hort. ex Tanaka) içermiştir. Ana gruptan limonlarla mandarin ve Valencia portakalı ile arasındaki müşterek bantların oranı sırasıyla 30/103 ve 28/103 (Çizelge 3). Olinda Valencia portakalı mandarinle 103 bantın % 35'ini, ağaç kavunu ile % 20'sini, şadokla % 25'ini paylaşmıştır.

Üç aneştral ağaç kavunu içerisinde en yüksek eşsiz bantta sahip olan grubun ağaç kavunları grubu olduğu tespit edilmiştir ki bu sayı 103

banttandır (Çizelgede gösterilmemiştir). Diğer bir deyimle 24 bant şadok veya mandarinde değil yalnızca ağaç kavunlarında tespit edilmiştir. Şadok ve mandarinin 15 müşterek bantta sahip olduğu tespit edilmiştir. Ağaç kavunu ve mandarin 8 adet müşterek bantta sahiptir. Limonların ve üç aneştral tür hariç bütün genotiplerin toplam 26 adet bantta sahip oldukları tespit edilmiştir. Muhtemelen bu bantlar bazı öteki turuncu ve akraba cinsleri de içeren hibridizasyonlar sonucu birikmiş olmalıdır. Bu 26 banttandır sadece 6 tanesi ana gruptaki limonlarda bulunmaktadır. Test edilen 83 genotipin hepsinde de bulunan bant sayısı ise 6'dır. mandarinle 103 bantın %35'ini, ağaç kavunu ile %20'sini, şadokla %25'ini paylaşmıştır.

## SUMMARY

### DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC RELATIONS TO CITRUS ANCESTORS IN LEMONS BY DNA MARKERS

Isozymes, inter-simple sequence repeats (ISSR), and simple sequence repeats (SSR) or microsatellite markers were used to measure genetic diversity and phylogenetic relationships among 83 lemons, related taxa, and three proposed ancestral species, *C. maxima*, *C. medica*, and *C. reticulata*. The ancestry of lemons and several other suspected hybrids was also studied. Isozyme loci revealed relatively little variation among these lemons. Eight ISSR primers amplified a total of 103 polymorphic fragments among the 83 accessions. A similarity matrix was calculated and a phylogenetic tree was derived using UPGMA cluster analysis. All lemons, rough lemons, and sweet lemons, as well as some other suspected hybrids were clustered with citrons. Most lemons had nearly identical marker phenotypes, suggesting that they originated from a single clonal parent via a series of mutations. Citrons contributed the largest part of the lemon genome and a major part of the genomes of rough lemons, sweet lemons, and sweet limes. Bands that characterize *C. reticulata* and *C. maxima* were detected in lemons. Like the two other markers studied, the five SSR primers tested revealed almost no variation among lemons, but a high level of variation among the relatively distant citrus taxa.

### LİTERATÜR KAYNAKLARI

1. Albanese, G., M.Renis and R.G.Reforgiato, 1992. RFLP Analysis of Different Lemon Cultivars. *Proceedings of the International Society of Citriculture 1:208-209*.
2. Barrett, H.C. and A.M.Rhodes, 1976. A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. *Sys. Bot. 1:105-136*.
3. Deng, Z.N., A.Gentile, E.Nicolosi, A.Vardi and E.Tribulato, 1995. Identification of In Vivo and In Vitro Lemon Mutants by RAPD Markers. *J. Hort. Sci. 70:117-125*.
4. Dice, L.R., 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology 26:297-302*.
5. Fang, D.Q. and M.L.Roose, 1997. Identification of Closely Related *Citrus* Cultivars With Inter-Simple Sequence Repeat Markers. *Theor. Appl. Genet. 95: 408-417*.

6. Fang, D.Q., Z.Wen and X.Shun-Yuan, 1994. Isozymes and Classification of *Citrus* Species in China. *Acta Botanica Sinica* 36:124-138.
7. Federici, C.T., D.Q.Fang, R.W.Scora and M.L. Roose, 1998. Phylogenetic Relationships Within the Genus *Citrus* (Rutaceae) and Related Genera as Revealed by RFLP and RAPD Analysis. *Theor. App. Genet.* 96: 812-822.
8. Iwamasa, M., N.Nito and J.T.Ling, 1988. Intra- and Intergeneric Hybridization in the Orange Subfamily, Aurantioideae. (Editör; R. Goren ve Mendel). *Proc. Int Soc. Citricult., Vol. 1, Balaban, Rehovot, Israel and Margraf Publishers. Weikersheim. Germany. pp: 123-130.*
9. Kijas, J.M.H., M.R.Thomas, J.C.S.Fowler and M.L.Roose, 1997. Integration of Trinucleotide Microsatellites into a Linkage Map of *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 701-706.
10. Malik, M.N., R.W.Scora and R.K.Soost, 1974. Studies on the Origin of the Lemon. *Hilgardia* 42:361-382.
11. Rohlf, F.J., 1993. NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. *Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York.*
12. Staub, J.E. and F.C.Serquen, 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience* 31: 729-741.
13. Swingle, W.T. and P.C.Reece, 1967. The Botany of *Citrus* and Its Wild Relatives. (Editör; W. Reuther, H.J. Webber ve D.L Batchelor). *The Citrus Industry, Vol. 1. University of California, Berkeley. pp: 190-430.*
14. Tanaka, T., 1977. Fundamental Discussion of Citrus Classification. *Stud. Citrol.* 14:1-6.
15. Torres, A.M., R.K.Soost and T.Mau-Lastovicka, 1982. Citrus Isozymes; Genetics and Distinguishing Nucellar From Zygotic Seedlings. *J. Hered.* 73:335-339.
16. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and U. Diedenhofen, 1978. Leaf Isozymes as Genetic Markers in Citrus. *Amer. J. Bot.* 65:869-881.
17. Webb, D.M. and S.J.Knapp, 1990. DNA Extraction From A Previously Recalcitrant Plant Genus. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8:180-185.
18. Xiang, C. and M.L.Roose, 1988. Frequency and Characteristics of Nucellar and Zygotic Seedlings in 12 *Citrus* Rootstocks. *Sci. Horticulturae* 37:47-59.
19. Zietkiewicz, E., A.Rafalski and D.Labuda, 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20:176-183.