

Bazı Turunçgil Anaçlarının SSR Markırları ile Moleküler Tanımlanması

Yıldız AKA KAÇAR¹
Özhan ŞİMŞEK¹

Turgut YEŞİLOĞLU¹
Meral İNCESU¹
Önder TUZCU¹

Bilge YILDIRIM¹
Müge KAMILOĞLU¹

¹Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

²Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana

Öz

Bu araştırmada, turunçgillerde anaç olma özelliği olan yirmi üç genotipin genetik yapıları SSR (Simple Sequence Repeat) markırları ile belirlenmiştir. Genotiplerin genetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla toplam on SSR primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan primerlerden Ci03C08 primeri istenilen amplifikasyonu vermediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Değerlendirmeye alınan 9 mikrosatellit primer çifti her genotip için 1 ile 3 arasında değişen bantlar vermiştir. CI03D12a primer çifti, proje kapsamında çalışılan genotiplerle toplam 10 bant vererek en yüksek polimorfizm oranını sergilemiştir. Bu primer için elde edilen bantlar 238bp-258bp aralığında dağılmışlardır. Elde edilen genetik veriler ile genetik benzerlikler hesaplanmış ve genetik benzerliklere dayalı dendrogram elde edilmiştir. Araştırma kapsamında kullanılan genotipler arasındaki genetik benzerlikler tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Citrus*, DNA parmakizi, genetik karakterizasyon, SSR.

Genetic Characterization of Some Citrus Rootstocks by Using SSR Markers

Abstract

In this study genetic characterization of twenty-three Citrus rootstocks has been conducted by using SSR markers. The ten SSR primer pairs were used to fingerprint the rootstock collection. Primer pair Ci03C08 did not give clear amplification and reproducible fragments with all genotypes. The number of fragments amplified from individual citrus genotypes with each primer pair ranged from one to three. Primer pair CI03D12a was the most informative and polymorphic that produced ten fragment with the genotypes studied ranged from 238 bp to 258 bp.

The data were analyzed to calculate genetic similarity values and UPGMA Cluster Analysis was performed to generate a dendrogram. The genetic relationships between genotypes are discussed.

Key Words: *Citrus*, DNA fingerprinting, genetic characterization, SSR.

Sorumlu Yazar/Correspondence to: Y.Aka Kaçar, ykacar@cu.edu.tr
Geliş Tarihi: 07.10.2009 Kabul Tarihi: 07.11.2009

Makalenin Türü: Araştırma Makalesi
Category: Research Report

Giriş

Turunçgiller dünyada ve Türkiye’de yetiştirilen en önemli meyve grubudur. Turunçgil yetiştiriciliğinde hastalık, zararlı, uygun olmayan iklim ve toprak koşulları gibi pek çok sorunla karşılaşıldığı için anaç kullanılmak zorundadır. Turunçgil genetik kaynakları, hızlı gelişen turunçgil endüstrisi içerisinde bu tür sorunların çözümünde çok önemli bir yer almaktadır.

Bitkisel gen kaynaklarının korunmasında ve ıslah programlarında daha etkin biçimde kullanılmasında son yıllarda yeni teknoloji adı verilen, moleküler genetik, doku kültürü ve rekombinant DNA teknolojisi gibi konuları kapsayan teknikler ile yeni olanaklar sağlanmıştır (Özgen ve ark., 2000). Bu tekniklerden özellikle DNA markırları turunçgillerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu güne kadar RFLP (Federici ve ark., 1998; Abkenar ve ark., 2004; Abkenar ve ark., 2007), RAPD (Coletta-Filho ve ark., 1998; Corazza-Nunes ve ark., 2002; Aka-Kaçar ve ark., 2005), ISSR (Fang ve Roose, 1997; Fang ve ark., 1998), SSR (Barkley ve ark., 2006, Gülşen ve Roose, 2000), cp DNA (Gulsen ve Roose, 2001; Nicolosi ve ark., 2000) ve SRAP (Uzun ve ark., 2009) markırları kullanılarak turunçgil taksonomisini araştırmak, genetik kaynakları tanımlamak ve doğrulamak amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu markır sistemlerinden SSR markırları 1-4 arasında tekrarlanan nükleotid motifleri içerirler, bu bölgeler “mikrosatellit” olarak adlandırılır ve PCR da bireysel olarak amplifiye olurlar. Güvenilir,

codominant, polimorfizm oranı yüksek nispeten kolay ve ucuz bir şekilde uygulanabilen markırlardır. Bu tip markırlar türlerin bireysel olarak genotiplerini ortaya koyarlar (Powell ve ark.,1996). Bu nedenle moleküler tanımlamada önemli bir yere sahiptir.

Bu araştırmada, turunçgillerde anaç olma özelliği olan 23 genotipin SSR (simple sequence repeat; mikrosatellit) markırları ile genetik karakterizasyonu yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait turunçgiller gen kaynakları koleksiyonu içerisinde yer alan ve anaç özelliği taşıyan 23 adet genotip çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmaktadır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan anaçlar

Kod No	Genotip	Latince İsmi
TCC - 076	Alanya Dilimli portakalı	<i>Citrus sinensis</i> Osb.
TCC - 161	Carrizo sitranjı	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 566	Gou Tou turuncu (SRA 506)	<i>Citrus aurantium</i> L.
TCC -567	Gou Tou Cheng turuncu (CRC- 3929)	<i>Citrus aurantium</i> L.
TCC - 574	Smooth Seville turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.
TCC - 597	Tuzcu 31 31 turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.
TCC - 614	Tuzcu 891 turuncu	<i>Citrus aurantium</i> L.
TCC - 643	Rubidoux üç yapraklı (08A 30.15)	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 645	Beneke üç yapraklı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 658	Pomeroş üç yapraklı (SRA)	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 664	Yerli üç yapraklı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 687	Troyer sitranjı	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 689	Tuzcu M 02 sitranjı	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 692	Sitrumelo 4475 (Swingle), (SRA)	<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 693	Swingle sitrumelo (AREC)	<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 694	Sitrumelo 1452 (CRC)	<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 697	Sitrumelo 4475 (Swingle) (CRC)	<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 700	Sitremon (1449, SHRS)	<i>Citrus limon</i> (L) Burm x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
TCC - 711	Kalamondin (CRC)	<i>Citrus madurensis</i> Lour
TCC - 713	C-35 sitranjı	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf
TCC - 754	01 Volkameriana (CRC)	<i>Citrus volkameriana</i> Tan.& Pasg.
TCC - 755	02 Volkameriana (CRC)	<i>Citrus volkameriana</i> Tan.& Pasg.
TCC - 770	Volkameriana	<i>Citrus volkameriana</i> Tan.& Pasg.

Yöntem

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Çizelge 1’de belirtilen genotiplere ait henüz yeni sürmüş sürgünlerdeki genç yapraklar kullanılmıştır. Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A.) ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA kalite ve miktarlarının saptanması amacıyla spektrofotometre ve agaroz jel elektroforez kullanılmıştır.

Mikrosatellit Analizlerinde Kullanılan Primerler

Mikrosatellit analizlerinde toplam 10 adet primer çifti kullanılmış, kullanılan primerlerden 7 tanesi turuncgil genomik (Ci03C08, CI02D09, CI02D04B, CI02G12, CI02A09, Ci03D12a, Ci03G05) kütüphanesinden, 3 primer çifti ise EST kütüphanesinden (MEST458, MEST121, MEST431) elde edilmiştir (Çizelge 2).

Mikrosatellit PCR Koşulları

Bitkisel materyallerden izole edilen DNA'lar seyreltilerek sentetik olarak hazırlanmış SSR primerleri ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek "Thermal cyclers" içerisine yerleştirilmiştir. PCR reaksiyonu toplam 20 µl (25 ng DNA, 1X PCR tampon çözelti, 2.5 mM MgCl₂, 0.02 mM dNTP karışımı, 2.5 µmol primer (ileri+geri), 0.8 ünite of *Taq* DNA polymeraz, 5µl dd H₂O) olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR amplifikasyonu; ilk denatürasyon aşaması 4 dk. 94 °C, daha sonra 1 dk 94 °C, 1 dk 50–58 °C, 1 dk. 72 °C (30 döngü) ve 5 dk. 72 °C son polimerizasyon olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. Araştırmada kullanılan SSR primer çifti dizinleri

Primer	Baz Dizilimi (ileri) (5'-->3')	Baz Dizilimi (geri) (5'-->3')
Ci03C08	CAGAGACAGCCAAGAGA	GCTTCTTACATTCTCAAA
CI02D09	AATGATGAGGGTAAAGATG	ACCCATCACAAAACAGA
CI02D04B	CTCTCTTTCCCCATTAGA	AGCAAACCCCAAC
CI02G12	AAACCGAAATACAAGAGTG	TCCACAAACAATACAACG
CI02A09	ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG	TTGTTTGGATGGGAAG
CI03D12a	GCCATAAGCCCTTTCT	CCCACAACCATCACC
Ci03G05	CCACACAGGCAGACA	CCTTGGAGGAGCTTTAC
MEST458	CCCCCTCTTTTCTCTTCCA	TTCTGGGCTGGTAGGTTTCA
MEST121	TCCCTATCATCGGCAACTTC	CAATAATGTTAGGCTGGATGGA
MEST431	GAGCTCAAACAATAGCCGC	CATACCTCCCGTCCATCTA

Poliakrilamid Jel Elektrophorez (PAGE)

Amplifiye olan DNA ürünlerinin PAGE'de koşulması için %6.5 konsantrasyonunda poliakrilamid jel hazırlanmıştır. PCR reaksiyon ürünlerini yüklemeye önce 500 ml 1XTBE buffer elektroforeze eklenerek 1500 V, (40 mA) 40 W'da, 25dk, 45 °C'de ön ısıtma yapılmıştır. 4 µl PCR reaksiyonu için 2 µl yükleme tampon çözeltisi (%98 formamide, 10 mM EDTA, bromofenol blue, Xylene Cyanol) eklenerek 95 °C sıcaklıkta denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra her bir örnek için 1 µl yükleme yapılarak ve 1500 V (40 mA), 40 W'da, 1.5 sa (45 °C) elektroforezde koşulmuştur. Elektrophorez aleti olarak, LiCor 4300 DNA Sequencer (LiCor Biosciences, Bad Homburg, Almanya) kullanılmıştır.

Veri Analizleri

SSR analizleri sonucunda elde edilen jel görüntülerinde bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek elde edilen değerler Rohlf (1993) tarafından geliştirilen NTSYS (Numerical Taksonomy and Multivariarte Analysis System, Version 2.0) adlı bilgisayar paket programında analiz edilmiş, aynı programda benzerlik indeksleri ve bu benzerlik indekslerine dayalı dendrogram oluşturulmuştur.

Bulgular ve Tartışma

SSR analizlerinde toplam on primer kullanılmış bu primerlerden Ci03C08 primer çifti istenilen amplifikasyonu vermediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Değerlendirmeye alınan 9 mikrosatellit primer çifti her genotip için 1 ile 3 arasında değişen bantlar vermiştir. Mikrosatellitler ko-dominant markır sistemleri olduğu için diploid türlerde beklenen bant sayısı allelin heterozigot olması durumunda 2, homozigot olması durumunda 1 iken triploid türlerde bu sayı üçtür. Bu çalışma kapsamında amplifiye edilen bazı primerlerden elde edilen 3 bant triploid Tuzcu M02 sitranjına aittir. Araştırma kapsamında kullanılan primerlerin 23 turunçgil anacı ile amplifikasyonu sonucunda elde edilen bant büyüklükleri ve toplam bant miktarları Çizelge 3' de sunulmuştur. Çizelge'den de izleneceği üzere turunçgil genomik kütüphanesinden izole edilen Ci03D12a primeri proje kapsamında çalışılan genotiplerin amplifikasyonunda toplam 10 bant oluşturarak en yüksek polimorfizm içeriğine sahip olmuştur (Çizelge 3). Bunun yanı sıra EST kütüphanelerinden elde edilen mest431 no.'lu primer çifti tüm genotiplerle 5 bant oluşturarak en düşük polimorfizm oranı sergilemiştir.

Amplifiye olan 9 SSR primerinden toplam 67 allel elde edilmiş ve lokus başına düşen allel sayısı 7.44 allel (7.44 allel/lokus) bulunmuştur. SSR literatürleri incelendiğinde her lokus için tanımlanan allel sayısı kendine tozlanan ve/veya tek yıllık bitkilerde düşük bulunmaktadır. Smulders ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, diploid bir tür olan domatesten (*Lycopersicon* Mill sp.) 3.1 allel/lokus elde etmişlerdir. Yine domateste yapılan diğer bir çalışmada lokus başına elde edilen allel sayısı 1.5 allel bulunmuştur (Broun ve Tanksley, 1996). Kabak ve kavunlarda (*Cucurbitaceae* sp.) yapılan bir çalışmada 2.6 ve 2.9 (Katzir ve ark., 1996), karpuzlarda yapılan mikrosatellit analizlerinde ise bu değer 2.0 allel/lokus (Jarret ve ark., 1997) ve tek yıllık bir bitki olan sorgum (*Sorghum bicolor* L.) da 2.3 olarak bulunmuştur (Brown ve ark., 1996). Bu rakamlar bizim çok yıllık, diploid bir tür olan turunçgillerden elde ettiğimiz rakamdan daha düşüktür (7.44 allel/lokus).

Çizelge 3. Araştırmada kullanılan primerler ve elde edilen DNA bant büyüklükleri ile toplam DNA bant sayıları

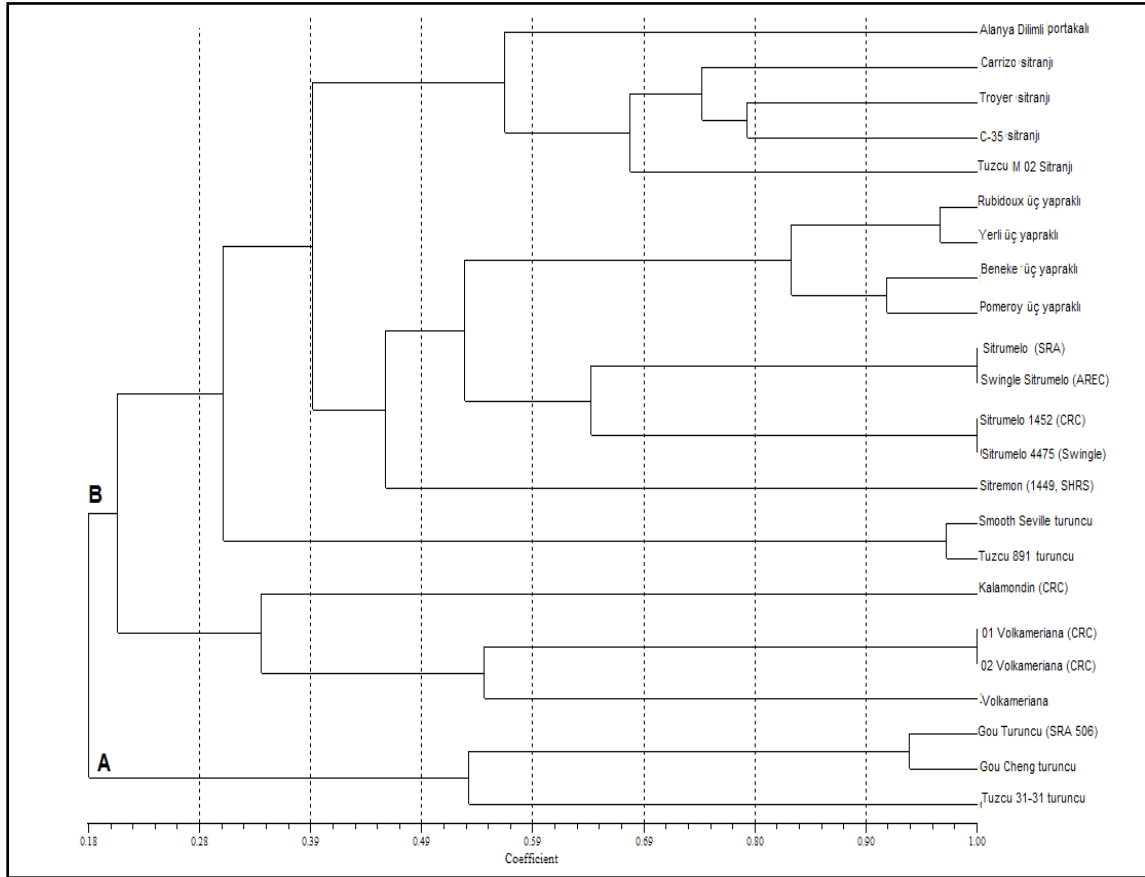
Primer	Bant Uzunluğu (bp)	Polimorfik Bant	Toplam Bant
CI02D09	223, 229, 235, 237, 239, 248	6	6
CI02D04B	194, 196, 198, 200, 206, 208	6	6
CI02G12	224, 240, 242, 246, 250, 252, 256, 258	8	8
CI02A09	152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 180	9	9
CI03D12a	238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 254, 256, 258	10	10
CI03505	200, 208, 212, 220, 222, 224, 226, 228, 230	9	9
MEST458	204, 210, 212, 214, 216, 220, 222, 230	8	8
MEST121	119, 177, 180, 183, 187, 199	6	6
MEST431	322, 330, 336, 338, 340	5	5
Toplam			67

Bunun yanı sıra hexaploid bir tür olan buğdayda (*Triticum aestivum* L.) yapılan çalışmalarda, lokus başına düşen allel sayıları 3.8 ile 7.4 arasında değişmiştir (3.8, 4.6, 6.2, 7.4 allel/lokus; sırasıyla Devos ve ark., 1995; Röder ve ark., 1995; Plaschke ve ark., 1995; Prasad ve ark., 2000). Bu değerler bitki türlerinin tarihsel gelişimleri ve yabancı tozlanma durumları ile bağlantılı olup, çok yıllık odunsu bitkilerde daha yüksek bulunmaktadır. Örneğin; tropikal bitkilerde 6.4 (Chase ve ark., 1996), *Pinaceae*, 6.0, 5.4, 8.2 ve 13.0 (Smith ve Devey, 1994; Echt ve ark., 1996; van de Ven ve McNicol, 1996; Pfeiffer ve ark., 1997); meşede 14.3 (Dow ve ark., 1995); ve turunçgillerde 5.5 (Kijas ve ark., 1995); limon çeşit ve tiplerinde 7.3 (Aka-Kaçar

ve ark., 2005) bulunmuştur. Her lokus için tanımlanan allel sayıları bakımından diğer türler incelendiğinde; elmalarda [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] (12.1; Hokanson ve ark., 1998), avokadolarda (*Persea americana* Mill.) (9.5; Lavi ve ark., 1994), 26 üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidi için (8.4; Thomas ve Scott, 1993) ve *Vitis* türleri için (27.6; Lamboy ve Alpha, 1998), vişne çeşitlerinde (12,6; Aka-Kaçar ve ark., 2006) elde edilen değerler bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz değerden yüksek bulunmuştur.

SSR Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendrogram ve Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan turuncgil anaçlarının 9 mikrosatellit primeri ile amplifikasyonu sonucunda elde edilen veriler Rohlf (1993) tarafından geliştirilen NTSYS paket programı kullanılarak analiz edilmiş, benzerlik indeksleri ve benzerlik indekslerine dayalı dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 1). Dendrogram iki ana kola ayrılmış; Gou Tou turuncu (SRA), Gou Tou Cheng turuncu ile Tuzcu 31-31 turuncu B kolunda yer alırken, çalışmada yer alan diğer genotipler A kolunda yer almışlardır. Alanya Dilimli portakalı, Carrizo sitranjı, Troyer sitranjı, C-35 sitranjı ve Tuzcu M02 sitranjı dendrogramda aynı grupta yer almışlardır. Sitranjlar, portakal ve üç yapraklı melezleridir. Portakallar arasında genetik anlamda çok büyük bir varyasyon olmaması nedeniyle sitranjların Alanya dilimli portakalı ile aynı kolda yer alması beklenen bir sonuçtur. Aynı şekilde Tuzcu M02 sitranjı, Alanya Dilimli portakalı ve üç yapraklı melezidir. C-35 sitranjı Ruby portakalı ile üç yapraklı melezi, turuncgil yetiştiriciliğinde önemli bir yeri olan Troyer ve Carrizo sitranjları ise portakal ile üç yapraklı melezleridir (Hodgson, 1967). Bu sitranjların genetik yapılarının da çok büyük oranda benzer olduğu daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Fang ve ark., 1997; Uzun, 2009).



Şekil 1. Turuncgil anaçlarının SSR markırları ile moleküler tanımlanması sonucu elde edilen dendrogram

Dendrogramda üç yapraklılar (*Rubidoux trifoliata*), Yerli üç yapraklı, *Poncirus pomey*, Beneke üç yapraklı, Pomey üç yapraklı 0.81 benzerlik düzeyiyle bir grup içerisinde toplanmıştır. SSR analizleri sonucunda, Rubidoux üç yapraklı ve Yerli üç yapraklı genetik olarak %95 oranından fazla bir düzeyde benzer bulunurken Beneke üç yapraklı ile Pomey üç yapraklı, %90'nın üzerinde benzer bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, üç yapraklılar arasında düşük bir varyasyon olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Komatsu ve ark., 1993; Fang ve ark., 1997; . Schafer ve ark., 2004; Pang ve ark., 2007; Uzun, 2009).

Araştırmada yer alan tüm sitrumelo genotipleri dendrogram içerisinde aynı grupta toplanırken, farklı gen kaynaklarından genetik koleksiyona eklenen Swingle sitrumelo (4475, SRA) ile Swingle sitrumelo (AREC) arasında SSR analizlerine dayalı olarak genetiksel farklılık bulunmamıştır. Aynı şekilde Sitrumelo 1452 (CRC) ile Sitrumelo 4475 (CRC) tamamen aynı DNA bant profilleri oluşturarak genetik olarak benzer bulunmuşlardır.

Sitremon 1449 (SHRS), üç yapraklılarla aynı kolda yer almış, fakat alt grup olarak tek başına diğerlerinden ayrılmıştır. Sitremonun üç yapraklı x limon melezi olması nedeniyle üç yapraklılarla aynı kolda olma olasılığı yüksektir. Bu genotipin farklı genetik kaynaklardan gelen sitrumelolardan ayrılmasının nedeni ise her ikisinin baba ebeveyninin ortak (üç yapraklı olması), fakat ana ebeveynlerinin farklı (birinin limon diğerinin ise altıntop) olmasından kaynaklanmaktadır. Smooth Seville Turuncu ve Tuzcu 891 Turuncu %96 düzeyinde birbirlerine benzer bulunmuştur. Smooth Seville turuncu eski Avustralya kökenli bir türdür. Florida'da Avustralyan turuncu olarak bilinmekte olup, muhtemelen turuncu ya da bir altıntop melezidir (Saunt, 2000). Tuzcu 891 turuncu ise, Avustralya'n turuncundan aşı gözü seleksiyonu yoluyla elde edilmiş uçkurutan hastalığına dayanıklı bir turuncudur. Bu nedenle genetik olarak benzer olması beklenen bir sonuçtur. Aynı genetik koleksiyonun farklı bireylerinden olan CRC 01 Volkameriana ve CRC 02 Volkameriana genotipleri beklenildiği gibi genetik olarak bir farklılık göstermemiştir.

Dendrogramın B kolunda yer alan üç genotipten birbirine genetik olarak en yakın bulunan iki genotip SRA 506 Gou Tou turuncu ve Gou Tou Cheng CRC-9329 turuncu olmuştur. Farklı kaynaklardan gelen SRA 506 Gou Tou turuncu ve Gou Tou Cheng CRC-3929 benzer oldukları bu çalışma ile belirlenmiştir. Bu grupta yer alan Tuzcu 31 31 Turuncu ise morfolojik olarak daha fazla benzerlik gösterdikleri turuncu grubu ile aynı grupta yer almıştır.

Yaptığımız çalışmaya benzer nitelikte diğer bir çalışma Pasquale ve ark. (2006) tarafından yapılmış ve araştırmada beş turuncu anacının moleküler karakterizasyonu ISSR ve RAPD markırları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kullanılan her iki teknik benzer sonuçlar vermiş ve diğer karakterizasyon çalışmaları ile uyumlu veriler elde edilmiştir.

Nükleik asit temeline dayalı genetik markırlar; genom analizlerinde, genetik varyasyonun belirlenmesinde, birbirlerine yakın akraba çeşitlerin tanımlanmasında, taksonomik ve filogenetik sınıflamalarda, pedigre analizleri ve bağlantı haritalarının oluşturulmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Moleküler markırların genetik çeşitlilik çalışmalarında en sık kullanılanlarından biri genomik DNA' da sık bulunması, çokluğu, PCR' a dayalı olması ve nispeten basitliği nedeniyle mikrosatellit markırlarıdır (Aka-Kaçar, 2001).

Bu çalışma ile turuncu genetik koleksiyonunda bulunan ve anaç özelliği taşıyan genotiplerin genetik ilişkileri SSR markırları ile belirlenmiştir. Yapılan analizler ile kullanılan genotiplerin birbirleri ile olan yakınlıkları sayısal verilere dönüştürülmüştür. Bu şekilde koleksiyondaki gen potansiyelinin genetik düzeyde tanımlanması açısından önemli bir uygulama gerçekleştirilmiştir. Bitkisel gen kaynaklarını modern teknolojiler kullanarak korumak, moleküler düzeyde tanımlamak, hedef genler açısından taranıp, klonlamak, patentlemek ve tüm bu faaliyetleri bir şemsiye (ulusal bir enstitü) altında toplamak gerekmektedir. Sürdürülebilir

kalkınmada en önemli konu kaynakların korunması, iyi yönetimi ve izlenmesidir. Bu nedenle ileriki aşamalarda bu verilerin yer alacağı ulusal gen kaynakları merkezleri ve bilgi bankaları oluşturulması önerilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ZF2006BAP6 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abkenar, A.A., Isshiki, S., Tashiro, Y., 2004. Phylogenetic relationships in the “true citrus fruit trees” revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. *Sci. Hortic.* 102(2): 233–242.
- Abkenar, A.A., Isshiki, S., Matsumoto, R., 2008. Comparative analysis of organelle DNAs acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. *Genet. Res. Crop. Evol.* 55(4): 487–492.
- Aka-Kacar, Y., Demirel, A., Tuzcu, O., Yesiloglu, T., Ulas, M., Yildirim, B., 2005. Preliminary results on Fingerprinting Lemon genotypes tolerant to Mal Secco (*Phoma tracheipfila*) Disease by RAPD Markers. *Biologia, Bratislava* 60(3): 295–300.
- Aka-Kacar, Y., Cetiner, S., Cantini, C. Iezzoni, A.F., 2006. Simple sequence repeat (SSR) markers differentiate Turkish sour cherry germplasm. *Journal of American Pomological Society*, 60(3): 136-143.
- Barkley, N.A., Roose, M.L. Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112(8):1519–1531.
- Broun, P., Tanksley, S.D., 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol. Gen Genet.* 250(1): 39–49.
- Brown, S.K., Iezzoni, A.F., Fogle, H.W., 1996. Cherries. In: *Fruit Breeding, Vol 1: Tree and Tropical Fruits*, ed: J. Janick and J.N. Moore p.212.
- Chase, M., Kesseli, R., Bawa, K., 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Amer. Jour. Bot.* 83(1):51-57.
- Coletta-Filho, H.D., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G., Pompeu, J., 1998. Analysis of the Genetic Diversity among Mandarins (*Citrus* spp.) Using RAPD Markers. *Euphytica*, 102(1):133–139.
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M., Targon, M.L.P.N., 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* Burm. Merr.) using RAPD and SSR markers, *Euphytica* 126(2): 169–176.
- De Pasquale, F., Siragusa, M., Abbate, L., Tusa, N., De Pasquale, C., Alonzo, G. 2006. Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential oils analysis. *Sci. Hort.* 109(1):54-59.
- Devos, K.M., Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Gale, M.D., 1995. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 90 (2): 247-252.
- Dow, B.D., Asley, M.V., Howe, H.F., 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, (*Quercus macrocarpa*). *Theor Appl Genet* 91(1): 137–141.
- Echt, C.S., May-Marquardt, P., Hsieh, M., Zahorochak, R., 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39(6): 1102–1108.
- Fang, D.Q., Roose, M.L. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95(3): 408–41.
- Fang, D.Q., Krueger, R.R., Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort.* 123(4): 612–617.

- Federici C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L., 1998. Phyllogenetic Relationship within the Genus *Citrus* by RFLP Analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96 (6-7):812-822.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2000. The origin of Interdonato lemon inferred from cpRFLP, SSR, isozyme and ISSR markers, *Proc. Int. Soc. Citricult. IX Congr.* 158-159.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2001. Lemons: diversity and relationships with selected citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126(3): 309-317.
- Hokanson, S.C., Szewc-MCFadden, A.K., Lamboy, W.F., McFerson, J.R., 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97(5-6):671-683.
- Hodgson, R.W., 1967. Horticultural varieties of citrus. In: Reuther W., Webber H.J., Batchelor, L.D. (eds). *The citrus industry*. University of California Press, Berkeley. 431-591.
- Jarret, R.L., Merrick, L.C., Holms, T., Evans, J., Aradhya, M.K., 1997. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome* 40(4):433-441.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., Cregan, P.B., 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 93(8): 1282-1290.
- Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S., Thomas, M.R., 1995. An evaluation of sequence-tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38(2): 349-355.
- Komatsu, A., Akihama, T., Hidaka, T., Omura, M., 1993. Identification of Poncirus strains by DNA fingerprinting. In: Hayashi T, Omura M, Scott NS (eds) *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees*. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan, 88-95.
- Lamboy, W.F., Alpha, C.G., 1998. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(2):182-188.
- Lavi, U., Akkaya, M., Bhagwat, A., Lahav, E., Cregan, P.B., 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* Mill.). *Euphytica* 80(3):171-177.
- Nicolosi E., Deng Z.N., 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. Genet.* 100 (8): 1155-1166.
- Özgen, M., Adak, M.S., Söylemezoğlu, G., Ulukan, H., 2000. Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma Ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar: Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi.
- Pang, X.M., Hu, C.G., Deng, X.X., 2007. Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54(2): 429-436.
- Pfeiffer, A., Oliveri, A.M., Morgante, M., 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 40(4): 411-419.
- Plaschke, J., Ganai, M.W., Roder, M.S., 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91(6-7): 1001-1007.
- Powell W., Macharay G.C., Provan. J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Genet.* 1(7):215-222.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Roy, J.K., Balyan, H.S., Gupta, P.K., 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100(3-4):584-592.

- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246(3): 327-333.
- Rohlf, F.J., 1993. NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York.
- Saunt, J., 2000. Citrus Varieties of the World. Sinclair Int. Limited, Norwich, England, 156 p.
- Schafer, G., Bastianel, M., Dornelles, A.L.C., 2004. Genetic diversity of citrus rootstocks based on RAPD marker analysis. *Ciência Rural*, Santa Maria. 34: 1437-1442.
- Smith, D.N., Devey, M.E., 1994. Occurance and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37(6): 977-983.
- Smulders, M.J.M., Bredmeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., Vosman, B., 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 94(2): 264-272.
- Thomas, M.R., Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86(8):985-990.
- Uzun, A., Yesiloglu, T., Aka-Kacar, Y., Gulsen, O., 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs) *Sci. Hort.* 121(3): 306-312.
- Ven, W.T.G. van de, McNicol, R.J., 1996. Microsatellites as DNA markers in *Sitka spruce*. *Theor. Appl. Genet.* 93(4): 613-617.