

Kaba Limon (*Citrus jambhiri* Lush.) Genotiplerinde Genetik Çeşitliliğin SRAP Markırları İle Belirlenmesi

Aydın UZUN¹ Turgut YEŞİLOĞLU² Yıldız AKA-KACAR²
Önder TUZCU² Osman GÜLŞEN³ Übeyit SEDAY¹ İhsan CANAN¹

¹Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Erdemli-Mersin

²Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

³Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Kayseri

Öz

Bu çalışmada, Türkiye’de turuncgil koleksiyonlarında yer alan kaba limon genotiplerinde SRAP markırları ile genetik çeşitlilik incelenmiştir. Ayrıca bunların muhtemel ebeveynleri olarak bilinen mandarin ve ağaç kavunu ile ilişkileri araştırılmıştır. Çalışma 21 adet primer kobinasyonu ile yapılmış ve veriler NTSYS paket programında analiz edilmiştir. Çalışmada, 182 adet bant elde edilmiş ve bunların 143 adedi polimorfik bulunmuştur. Dendrogramda materyaller arasındaki benzerlik düzeyi 0.65 ile 1.00 arasında saptanmıştır. Kaba limonlar ağaç kavunu ve mandarine sırasıyla 0.65 ve 0.69 düzeyinde benzer bulunmuştur. Genel olarak kaba limonlar içerisinde düşük düzeyde bir varyasyon olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Turuncgil, kaba limon, *Citrus jambhiri*, SRAP.

Determination of Genetic Diversity in Rough Lemon Genotypes by SRAP Markers

Abstract

In this study, genetic diversity of rough lemon genotypes in citrus collections of Turkey was examined by SRAP markers. Besides, relationships between rough lemon and its parents mandarin and citron was investigated. This study was carried out with 21 SRAP primer pairs and data were analysed using NTSYS. We obtained 183 fragment and 143 of them were polymorphic. In dendrogram similarity value of materials varied between 0.65 and 1.00. Similarity level of rough lemon genotypes with citron and mandarin was 0.65 and 0.69 respectively. As a result, narrow genetic variation was determined in rough lemons.

Key Words: *Citrus*, rough lemon, *Citrus jambhiri*, SRAP.

Sorumlu Yazar/Correspondence to: A. Uzun, uzun38@yahoo.com
Geliş Tarihi: 19.01.2009 Kabul Tarihi: 02.04.2009

Makalenin Türü: Araştırma
Category: Research

Giriş

Güneydoğu Asya orijinli olan turuncgiller günümüzde dünyada geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiştir. Bu anlamda turuncgiller içerisinde hızlı bir çeşit dinamiğinin var olması, farklı ıslah yöntemleriyle değişik iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilen anaç ve çeşitlerin elde edilmesi önemli bir etken olmuştur.

Turuncgil taksonomisi, *Citrus* ve akrabaları arasında melezlemelerin olması, yaygın bir şekilde göz mutasyonlarının meydana gelmesi, poliembriyoni, turuncgillerin evrimin başlangıç aşamalarında olması, uzun yıllardır yetiştiricilik yapılması nedenleriyle karmaşık ve tartışma oluşturan bir yapı göstermektedir (Nicolosi ve ark., 2000; Novelli ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda (Scora, 1975; Barrett ve Rhodes, 1976) yetiştiriciliği yapılan turuncgiller içerisinde, ağaç kavunu (*C. medica* L.), mandarin (*C. reticulata* Blanco) ve şadok [*C. grandis* (L.) Osb.] olmak üzere üç adet gerçek türün olduğu ve diğer türlerin bu üç tür arasındaki melezlemelerden meydana geldiği belirtilmiştir. Bu görüş daha sonraki çalışmalarda da destek bulmuştur (Nicolosi ve ark., 2000; Abkenar ve ark., 2004; Pang ve ark., 2007).

Genetik koleksiyonlarda, genetik çeşitliliğin analiz edilmesi, genotiplerin güvenilir bir şekilde sınıflandırılmasını ve özel ıslah amaçlı kullanılmak üzere temel genotiplerin tanımlanmalarını kolaylaştırmaktadır. Genetik çeşitlilik çalışmaları, bireyler ile gruplar arasında veya bireyler ile

populasyonlar arasındaki varyasyonların özel bir metotla veya farklı metotların kombinasyonlarıyla analiz edildiği bir süreçtir (Mohammadi ve Prasanna, 2003). Genetik kaynakların yönetiminde genotiplerin tanımlanması ve fenotipik olarak benzer olanların birbirlerinden ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Bu anlamda moleküler markırların kullanılması hız ve kolaylık sağlamaktadır (Roose, 1988). Moleküler markırlar, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ebeveynlerin ortaya konulması, farklı turuncgil türleri arasındaki filogenetik ilişkilerin saptanması çalışmaları için kuvvetli bir araçtır (Barkley ve ark., 2006).

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) markırları Li ve Quiros (2001), tarafından geliştirilmiş yeni bir moleküler markır sistemidir. PCR temelli bir sistem olan SRAP, iki primerden oluşan bir kombinasyonla çalışmaktadır. SRAP markır sistemi kolay uygulanabilen, tekrarlanabilen, ucuz ve etkili bir sistem olarak değerlendirilmiş (Li ve Quiros, 2001; Wang ve ark., 2008), genetik çeşitliliğin, genetik ilişkilerin araştırılması ve parmak izi çalışmalarında kullanılabilecek etkili ve ucuz bir sistem olarak kabul edilmiştir (Budak ve ark., 2004; Esposito ve ark., 2007).

Kaba limon dünyanın değişik yerlerinde turuncgil yetiştiriciliğinde anaç olarak kullanılan önemli bir türdür. Yapılan farklı çalışmalarda bu tür, mandarin ile ağaç kavunu melezi olarak bildirilmiştir (Scora, 1975; Torres ve ark., 1978; Barkley ve ark., 2006). Bu çalışmada, ülkemizdeki Üniversite ve Araştırma kuruluşlarının koleksiyonlarında bulunan kaba limon genotiplerinde SRAP markırları kullanılarak moleküler karakterizasyonlar yapılmıştır. Çalışmalarda genotiplerin kendi aralarında ve ebeveynleri olarak bilinen türlerle olan benzerlik durumları tespit edilmiştir. Çalışma ile edilen bilgiler koleksiyonların daha planlı olarak korunması ve bu konuda planlamalara yardımcı olması bakımından önem taşımaktadır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada bitki materyali olarak Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi ‘Tuzcu Turuncgiller Koleksiyonu’ içerisinde yer alan 11 adet kaba limon genotipi ile bu türün ebeveynleri olarak bilinen mandarin ve ağaç kavunundan ikişer adet çeşit ve 1 adet limon çeşidi yer almıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan tür, çeşit ve genotipler

1	UCLA-1 kaba limonu	9	WN Red kaba limon (Newcomb)
2	CRC-1 kaba limonu	10	Mazoe kaba limonu
3	Florida kaba limonu	11	Rhobs El Arsa SRA kaba limonu
4	Schaub kaba limonu	12	Kütdiken 79 limonu
5	Soh Johlia kaba limonu	13	Ağaç kavunu (ZiraatOkulu)
6	UCLA kaba limon (Newcomb)	14	Ağaç kavunu (T.Paksoy)
7	Soh Johlia kaba limonu (Newcomb)	15	Frost Dancy mandarin
8	Schaub kaba limonu (Newcomb)	16	Klemantin mandarini SRA 90

Metot

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için bitkilerin sürgün ucundaki genç yapraklar kullanılmıştır. Alınan bu yapraklar taze olarak laboratuara getirilmiş ve ‘roller pres’ aleti (Dayton Electric Co. Illinois, USA) ile ezilerek DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonları Doyle ve Doyle (1990)’un yönteminden modifiye edilmiş CTAB protokolüne göre yapılmıştır.

PCR Bileşenleri ve PCR Döngüsü

PCR bileşenleri ve PCR cihazının çalışma koşulları Gülşen ve ark. (2005), kullandığı yöntemden modifiye edilerek aşağıdaki şekilde optimize edilmiştir.

PCR bileşenleri toplam hacim 15 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

1.5 µl 10X PCR buffer (Biorun, Nantes, Fransa), 1.33 mM ileri ve geri primer (İontek, İstanbul, Türkiye), 200 µM her bir dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) (Biorun, Nantes, Fransa), 2.5 mM MgCl₂ (Biorun, Nantes, Fransa), 0.2 µg/µl BSA (Bovine serum albumin, Biological Industries, Beit Haemek, İsrail), 1 ünite taq DNA polimeraz enzimi (Biorun, Nantes, Fransa), 20 ng DNA, 4.3 µl ddH₂O. Karışım 15 µl'ye tamamlandıktan sonra son olarak buharlaşmayı engellemek amacıyla PCR tüplerinin üzerine bir damla mineral yağ ilave edilmiştir. PCR döngüsü aşağıda belirtildiği gibi düzenlenmiştir.

94 °C	2 dk	
94 °C	1 dk	} 5 döngü
35 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
94 °C	1 dk	
50 °C	1 dk	} 35 döngü
72 °C	1 dk	
4 °C	∞	

Çalışmalarda 13 adet ileri ve 16 adet geri olmak üzere 29 adet SRAP primeri kullanılmıştır. PCR çalışmalarında bir ileri ve bir geri primer çifti birlikte kullanıldığından öncelikle toplam 208 adet primer kombinasyonu test edilmiştir. Bu çalışmalarda iyi sonuç veren 21 adet primer kombinasyonu bütün örneklerin PCR çalışmalarında kullanılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Materyallerin çalışıldığı primer kombinasyonları

1- Em1 Me4	8- Em5 Me10	15- Em10 Me11
2- Em2 Me3	9- Em5 Me12	16- Em11 Me1
3- Em2 Me5	10- Em6 Me6	17- Em13 Me4
4- Em2 Me8	11- Em7 Me8	18- Em14 Me1
5- Em3 Me3	12- Em7 Me9	19- Em15 Me6
6- Em4 Me5	13- Em9 Me3	20- Em15 Me10
7- Em4 Me6	14- Em9 Me11	21- Em16 Me12

Bulgular ve Tartışma

Çalışmada kullanılan materyallerde, 21 primer çifti ile elde edilen bant uzunlukları 80–1600 bp arasında değişmiştir. En düşük bant uzunluğu 80 bp ile em2/me3, em9/me3 ve em16/me12 kombinasyonlarında, en yüksek bant uzunluğu ise 1600 bp ile em13/me4 kombinasyonunda elde edilmiştir. Toplam 182 adet bant elde edilmiş, bunlardan 143 tanesi polimorfik bulunmuş ve polimorfizm oranı %77.6 olarak tespit edilmiştir. Primer başına ortalama bant sayısı 8.7, ortalama polimorfik bant sayısı ise 6.8 olarak belirlenmiştir. En fazla bant em2/me3 (17 adet), en az bant ise em11/me1 kombinasyonlarında (4 adet) elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı en çok em2/me3 kombinasyonunda (15 adet), en az ise em11/me1 kombinasyonunda (2 adet) belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı em5/me10 (%100) kombinasyonunda tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Elde edilen veriler Rohlf (1993) tarafından belirtilen NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1, Exeter Software, Setauket, N.Y., USA) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle bireyler arasındaki benzerlik indeksleri

(Dice, 1945) hesaplanmıştır. Benzerlik indeksinden yararlanılarak, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Average) metodu ile dendrogram oluşturulmuştur.

Benzerlik indeksleri ile dendrogram arasındaki korelasyonu ortaya koyan kofenetik korelasyon katsayısı, $r = 0.975$ olarak bulunmuştur. Bu katsayının 0.9 değerinden büyük olması durumunda benzerlik indeksleri ile elde edilen dendrogram arasında çok iyi bir ilişki olduğu, 0.8 ile 0.9 arasında olması durumunda iyi bir ilişki olduğu, 0.7 ile 0.8 arasında olması durumunda zayıf bir ilişki olduğu ve bu değer 0.7'den küçük olması durumunda ise çok zayıf bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Mohammadi ve Prasanna, 2003). Buradan hareketle, benzerlik indeksleri ile elde edilen dendrogram arasında çok yüksek düzeyde bir korelasyonun olduğu, dendrogramın benzerlik indekslerini çok yüksek bir oranda temsil ettiği görülmektedir.

Toplam 182 adet bantla elde edilen dendrograma göre çalışmada kullanılan 11 adet kaba limon, 2 adet mandarin, 2 adet ağaç kavunu ve 1 adet limon çeşit ve tipinde benzerlik oranları 0.65 ile 1.00 arasında değişmiştir. Dendrogram 0.65 benzerlik düzeyinde iki ana gruba ayrılmış, bir tarafta ağaç kavunları (B grubu), diğer tarafta ise (A grubu), kaba limonlar, mandarinler ve limon yer almıştır.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan materyallere ait, her primer çifti için bant uzunluk aralıkları (bp), toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS), polimorfizm oranı (PO) değerleri

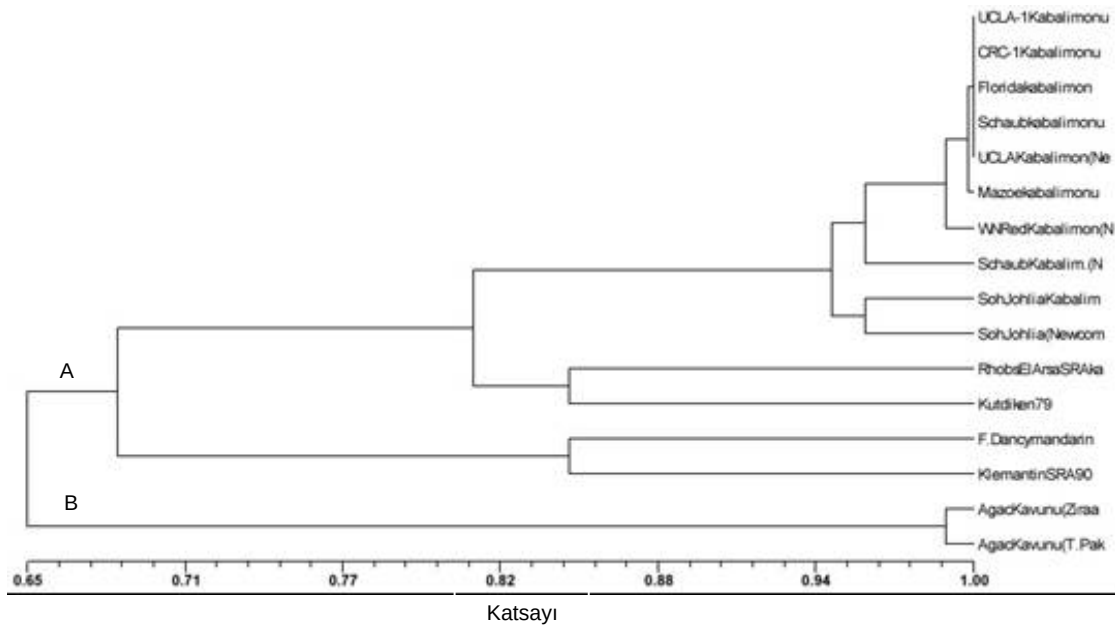
Primer Çifti	Bant Uzunluk Aralıkları (bp)	TBS	PBS	PO (%)
em1 me4	100/1270	12	10	83
em2 me3	80/1000	17	15	88
em2 me5	1207/1350	10	7	70
em2 me8	260/850	7	6	86
em3 me3	130/780	9	7	78
em4 me5	280/850	7	6	86
em4 me6	200/650	9	7	78
em5 me10	380/780	7	7	100
em5 me12	300/620	7	6	86
em6 me6	180/600	10	8	80
em7 me8	200/1380	11	7	64
em7 me9	280/820	11	8	73
em9 me3	80/600	8	7	88
em9 me11	140/880	9	7	78
em11 me1	390/640	4	2	50
em10 me11	150/900	11	8	73
em13 me4	100/1600	6	3	50
em14 me1	220/820	5	4	80
em15 me6	100/900	9	8	89
em15 me10	220/850	6	4	67
em16 me12	80/860	7	6	86
TOPLAM		182	143	-
ORTALAMA		8.7	6.8	77.6

İki adet ağaç kavunu arasında 0.99 düzeyinde benzerlik saptanmıştır. Nicolosi ve ark. (2000), ağaç kavunları arasındaki genetik benzerlikleri RAPD markırları kullanarak araştırmışlar ve çalışmada kullanılan 12 adet ağaç kavunu arasında 0.94 ile 0.99 arasında benzerlik saptamışlardır. Çalışmamızda elde edilen ağaç kavunları arasındaki benzerlik düzeylerinin

yukarıda açıklanan farklı markır sistemleri ile elde edilen değerlerle benzer olduğu görülmektedir. Ağaç kavunları grubun geri kalan bireyleri ile 0.65 düzeyinde benzer bulunmuştur. Gülşen ve Roose (2001), ISSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda ağaç kavunları ile limonlar ve kaba limonların oluşturduğu grubun benzerlik düzeyini 0.65 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda SRAP markırlarıyla bu grup için elde edilen benzerlik düzeyi bu değerle uyum içerisinde bulunmuştur.

A grubu içerisinde, Dancy ve Klemantin mandarinleri ile kaba limonlar ve limon arasında 0.69 düzeyinde benzerlik olduğu belirlenmiştir. İki mandarin arasındaki benzerlik ise 0.84 düzeyinde olmuştur. Kaba limonlar ile limonun bulunduğu alt grup 0.81 düzeyinde iki kola ayrılmış, bir kolda Kütdiken limonu ile Rhobs El Arsa SRA kaba limonu yer alırken diğer kolda geri kalan 10 adet kaba limon yer almıştır. Diğer kaba limonlara genetik olarak daha uzak olarak saptanan Rhobs El Arsa kaba limonu, yaprak uçucu yağ bileşenleri ile yapılan çalışmalarda diğer kaba limonlardan farklı sonuçlar vermiş ve bu çeşidin melez orijinli bir çeşit olabileceği bildirilmiştir (Scora ve ark., 1969).

Dendrograma göre, Rhobs El Arsa dışında kalan 10 adet kaba limon arasındaki benzerlik düzeyi 0.94 ve üzeri düzeyde olarak bulunmuştur. İki adet Soh Johlia kaba limonu arasında 0.95 düzeyinde benzerlik tespit edilmiş ve bu iki kaba limon diğerleri ile 0.94 düzeyinde benzer bulunmuştur. Schaub kaba limonu (Newcomb) aynı şekilde diğer kaba limonlarla 0.95 düzeyinde benzerlik göstermiştir. Geri kalan, UCLA, UCLA 1, CRC 1, Florida, Schaub, UCLA (Newcomb), Mazoe ve WN Red kaba limonları 0.99-1.00 düzeyinde benzer olarak saptanmışlardır (Şekil 1).



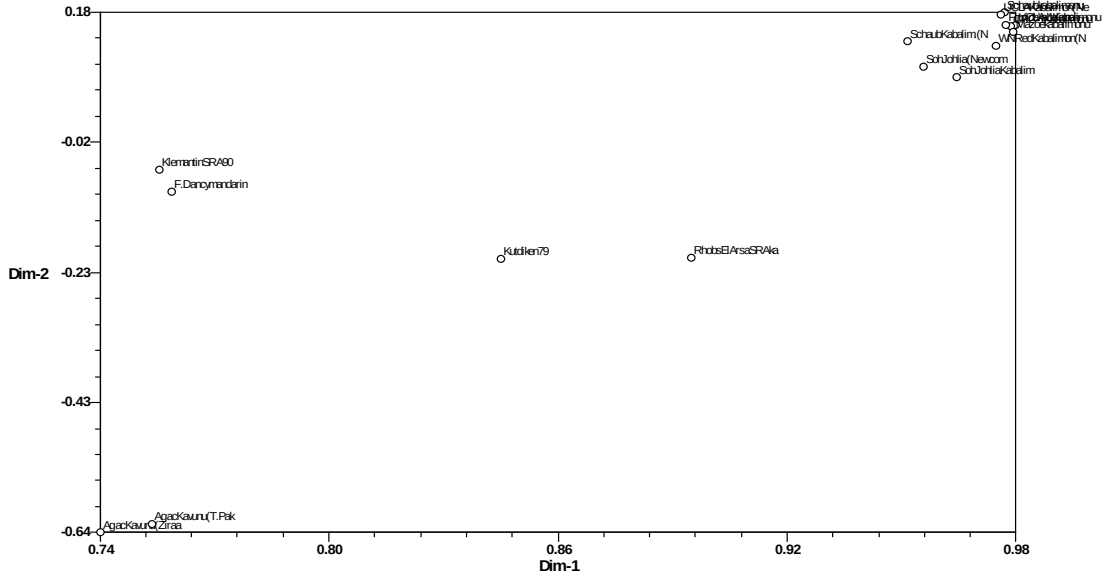
Şekil 1. Çalışmada SRAP markırları ile elde edilen ve kaba limon, ağaç kavunu, mandarin ve limon arasındaki benzerlikleri gösteren dendrogram.

Gülşen ve Roose (2001), ISSR markırları ile yaptıkları çalışmalarda dört adet kaba limon arasında çok düşük düzeyde bir polimorfizm tespit etmişler ve kaba limonların büyük oranda aynı genetik yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Scora (1975) ve Torres ve ark. (1978), kaba limonun mandarin ile ağaç kavunu melezi olduğunu belirtmişlerdir. Nicolosi ve ark. (2000), kaba limonda tespit ettikleri toplam 79 adet markırın, 42 tanesinin ağaç kavununda, 32 tanesinin mandarinde ortak olduğunu, kaba limonun orijininin ağaç kavunu ve mandarine dayandığını

ancak direk ebeveylelerin bunlar olmayabileceği üzerinde durmuşlardır. Barkley ve ark. (2006), kaba limonun, mandarin ile ağaç kavunu melezi olduğunu bildirmişlerdir.

Elde edilen veriler kullanılarak çalışmada kullanılan materyaller içerisinde ‘Temel Bileşenler Analizi’ (Principal Component Analysis-PCA) yapılmış ve tür, çeşit ve genotiplerin iki boyutlu düzlem üzerinde dağılımı ortaya konulmuştur (Şekil 2). Temel bileşenler analizi, iki veya daha fazla karakter arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için veri azaltma metodu ve toplam varyansın sınırlı sayıda yeni değişkende gösterilmesi olarak açıklanmaktadır. İlk iki veya üç temel bileşenin ‘eigen’ değerlerinin kümülatif toplam olarak varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığı durumlarda temel bileşenler analizi, düzlem üzerinde dağılım şeklinde bireylerin gruplanmasında uygun bir teknik olarak kabul edilmektedir. (Mohammadi ve Prasanna, 2003). Çalışmamızda yapılan temel bileşenler analizleri sonucuna göre ilk üç ‘eigen’ değeri toplam varyasyonun % 94.88’lik kısmını açıklamıştır. Bu durum yapılan temel bileşenler analizi ile varyasyonun çok iyi bir şekilde açıklandığını ve bu analizle elde edilen iki boyutlu dağılımla çalışmada kullanılan materyaller arasındaki benzerlik/farklılıkların iyi bir şekilde ifade edildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, ülkemiz turuncgil koleksiyonlarında yer alan kaba limon genotiplerinde dar bir genetik çeşitliliğin olduğu söylenebilir. Rhobs El Arsa kaba limonu diğer kaba limonlardan genetik olarak daha uzakta tespit edilmiştir. Bu sonuç, daha önce yapılan çalışmada (Scora ve ark., 1969) ortaya konulan bu çeşidin melez orijinli olabileceği görüşünü desteklemektedir.



Şekil 2. Çalışmada temel bileşenler analizi (PCA) ile elde edilen iki boyutlu düzlem dağılımı.

Teşekkür

Bu çalışmaya desteklerinden dolayı TÜBİTAK (1007–105 G 072) ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (ZF2006D3) teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

Abkenar, A.A., Isshiki, S., Matsumoto, R., 2007. Comparative Analysis of Organelle DNAs Acid Citrus Grown in Japan Using PCR-RFLP Method. Genetic Resources and Crop Evolution, DOI 10.1007/s10722-007-9253-2.

- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112:1519-1531.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M. 1976. A Numerical Taxonomic Study of the Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. *Syst. Bot.* 1:105-136.
- Dice, L.R.. 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 26:297-302.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus.* 12: 13-15.
- Esposito, M.A., Martin, E.A., Cravero, V.P., Cointy, E., 2007. Characterization of Pea Accessions by SRAP's Markers. *Scientia Horticulturae*, 113: 329-335.
- 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, 309-317.
- Gulsen, O., Shearman, R.C., Vogel, K.P., Lee, D.J., Baenziger, P.S., Heng-Moss, T.M., Budak, H., 2005. Nuclear Genome Diversity and Relationships Among Naturally Occurring Buffalograss Genotypes Determined by SRAP Markers. *Hortscience*, 40:3 537-541
- Li, G., Quiros, C.F., 2001. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on A Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants-Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Sci.* 43:1235-1248.
- 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.* 100:1155-1166.
- Novelli, V.M., Takita, M.A., Machado, M.A., 2004. Identification and Analysis of Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) in *Citrus*. *Euphytica*, 138: 227-237.
- 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* 54:429-436.
- Rohlf, F.J., 1993. NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York.
- Scora, R.W., England, A.B., Chang, D., 1969. Taxonomic Affinities Within the Rough Lemon Group (*Citrus jambhiri* Lush.) as Aided by Gaschromatography of Their Essential Leaf Oils. *Proc. First Int. Citrus Symp.* Vol 1: 441-450.
- Scora, R.W. 1975. On the History and Origin of Citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102:369-375.
- Scora, R.W. 1988. Biochemistry, Taxonomy and Evolution of Modern Cultivated Citrus. In: Goren RK, Mendel K (eds.) *Proc 6th Int. Citrus Cong.*, Vol. 1 Margraf Publishers, Weikersheim, Germany, 277-289.
- Swingle, W.T., Reece, P.C. 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, Berkeley, 190-430.
- Torres, A.M., Soost, R.K., Diedenhofen, U., 1978. Leaf Isozymes As Genetic Markers in Citrus. *American Journal of Botany*, 65:8 869-881.
- Wang, L.L., Ping, Z.L., Qin, G.Y., Xia, W.M., Ming, C.L., Lan, Y.J., Yan, W., Min, Y.F., Zhi, W.L., 2008. DNA Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Late-Bolting Radish Cultivars with RAPD, ISSR and SRAP Markers. *Scientia Horticulturae*, 116: 240-247.