

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aslıhan AĞAR**

***AURANTIOIDEAE* ALT FAMILİYASINDAKİ CİNSLERDE YER ALAN  
BAZİ TÜRLEİN SSR MARKIRLARIYLA MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2007**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AURANTIOIDEAE ALT FAMILİYASINDAKİ CİNSLERDE YER  
ALAN BAZI TÜRLERİN SSR MARKIRLARIYLA MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Aslıhan AĞAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 18/06/ 2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından **Oybirliği /**  
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....

**Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**  
DANIŞMAN

İmza.....

**Doç. Dr. Yeşim Y.MENDİ**  
ÜYE

İmza.....

**Prof. Dr.Turgut YEŞİLOĞLU**  
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ**  
Enstitü Müdürü  
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK Tarafından  
Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2002YL29

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların  
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ***AURANTIOIDAE* ALT FAMILİYASINDAKİ CİNSLERDE YER ALAN BAZI TÜRLERİN SSR MARKIRLARIYLA MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ashhan AĞAR**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman : Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR**

**Yıl : 2007, Sayfa: 104**

**Jüri : Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR**

**Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ**

**Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU**

Bu çalışmada, SSR markırları kullanılarak Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tuzcu Turunçgil Koleksiyonunda bulunan *Citrus* tür ve akrabalarına ait 88 adet genotip arasındaki moleküler farklılıklar incelenmiştir.

Kullanılan toplam 15 adet mikrosatellit primerlerinden AC01 ve CT19 primerleri ile istenilen amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Amplifiye olan 13 adet primerden toplam 95 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Kullanılan primerlerden 84 no'lu primer 14 allel/lokus ile polimorfizm oranı en yüksek primer olarak belirlenmiştir. SSR analizleri sonucunda elde edilen veriler ile *Citrus* tür ve akrabaları arasındaki genetik benzerlikler ve buna dayalı olarak dendogram oluşturulmuştur.

Tez çalışması kapsamında kullanılan mandarin, portakal, turunç, altıntop türleri aynı alt grublarda toplanmışlar, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Fortunella* cinslerine ait genotiplerin *Citrus* cinsi ile genetik ilişkileri tartışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, Mikrosatellit (SSR=Simple Sequence Repeat).

**ABSTRACT  
MSc THESIS**

**SOME SPECIES of *AURANTIOIDEAE* SUBFAMILY GENUS by USING SSR  
MARKER MOLECULAR CHARACTERIZATION**

**Ashhan AĞAR**

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

**Supervisor : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**

**Year : 2007, Pages: 104**

**Jury : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**

**Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ**

**Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU**

In this research, fifteen Simple Sequence Repeat (SSR) markers were used molecular polymorphism among 88 *Citrus* accessions from The Tuzcu *Citrus* Variety Collection located at The University of Çukurova. Genetic diversity statistics were calculated for each individual SSR marker , the entire population, and for individual *Citrus* groups. The proportion of shared alleles was utilized as a statistical measure for determining genetic distance between all pairwise comparison. Phylogenetic relationships among the *Citrus* accessions were determined by constructing a neighbor-joining tree by utilizing the genetic data.

**Key Words:** *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, Microsatellite (SSR=Simple Sequence Repeat).

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve çalışmam boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi sırasında beni sabırla dinleyen, dostça eleştiren ve sevgi ile teşvik eden danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmanın başlangıç aşamasında materyallerimin belirlenmesinde yardımcı olan ve kendilerinden edindiğim bilgilerden ilham alarak hareket ettiğim Sayın Hocalarım **Prof. Dr. Önder TUZCU** ve **Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU**'na müteşekkirim.

Biyoteknoloji ile beni tanıştıran bugüne kadar gelmeme yardımcı olan Sayın Hocam **Doç. Dr. Yeşim YALÇIN-MENDİ**'nin gayret verici fikirleri ve yararlı önerileri için teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca materyallerimin sağlanmasında yardımcı olan Sayın Hocam **Yard. Doç. Dr. Bilge YILDIRIM**'a teşekkür ederim.

Bu çalışmamın her aşamasında yardımlarını gördüğüm çok değerli arkadaşlarım **Arş. Gör. Muharrem YILMAZ**, **Sera Teknikeri Semra GÖNÜL** ve **Biyolog Özhan ŞİMŞEK**'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her konuda yardımcı olan sevgili dostlarım **Biyolog Sonay KOYUNCU**, **Biyolog Ebru ÖKSÜN**, **Biyolog Sinem SERBEST-KOBANER**, **Yüksek Ziraat Mühendisi İsmail VAROL**' teşekkür ederim.

Verilerimin istatistiksel analizleri sırasında yardımlarından ve değerli önerileri için hocam **Doç.Dr. Sedat SERÇE**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu kuruluşunun sayın yetkililerine ayrıca teşekkür ederim.

Son olarakta yaşamım boyunca bana gösterdikleri maddi ve manevi fedakarlıkları için **Sevgili Aileme** ...

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZ.....                                                                              | I    |
| ABSTRACT.....                                                                        | II   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                        | III  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                     | IV   |
| KISALTMALAR.....                                                                     | VI   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                               | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                 | IX   |
| 1.GİRİŞ.....                                                                         | 1    |
| 1.1. Turunçgillerin Dünya ve Türkiye Üretimi.....                                    | 4    |
| 1.2. <i>Aurantioideae</i> Altfamilyası Hakkında Genel Bilgiler.....                  | 6    |
| 1.3. <i>Citrus</i> Cinsi ve Akrabalarının Genel Özellikleri.....                     | 10   |
| 1.3.1. Uzak ve Yakın Turunçgil Akrabaları.....                                       | 10   |
| 1.3.2. Gerçek Turunçgiller.....                                                      | 11   |
| 1.3.3. <i>Citrus</i> Cinsi Dışında Kalan Diğer Cinsler.....                          | 11   |
| 1.3.4. <i>Citrus</i> Cinsi.....                                                      | 13   |
| 2.ÖNCEKİÇALIŞMALAR.....                                                              | 14   |
| 2.1. DNA Parmakizi Nedir?.....                                                       | 14   |
| 2.1.1 Bitkisel Materyalin Sağlanması ve DNA izolasyonu.....                          | 15   |
| 2.1.2. PCR (Polmerase Chain Reaction=Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....               | 17   |
| 2.1.3 Markır Tipleri.....                                                            | 19   |
| 2.1.3.1. Morfolojik Markırlar.....                                                   | 19   |
| 2.1.3.2. Biyokimyasal Markırlar.....                                                 | 19   |
| 2.1.3.3. DNA Markırları.....                                                         | 19   |
| 2.2. <i>Aurantioideae</i> Altfamilyası ile İlgili Yapılan Taksonomik Çalışmalar..... | 27   |
| 2.3.Turunçgillerde Yapılan Moleküler Çalışmalar.....                                 | 35   |

|                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. MATERYAL VE METOD.....                                                      | 42  |
| 3.1.Bitkisel Materyal.....                                                     | 42  |
| 3.2. Metod.....                                                                | 54  |
| 3.2.1.Mikroatellit(SSR)Analizleri .....                                        | 54  |
| 3.2.1.1 DNA İzolasyonu.....                                                    | 54  |
| 3.2.1.2.Mikroatellit (SSR) Analizleri PCR koşulları.....                       | 57  |
| 3.2.1.3.Mikrosatellit Elektroforez Koşulları.....                              | 61  |
| 3.2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi.....                                       | 66  |
| 3.2.2.1. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi.....                        | 66  |
| 3.2.2.2. Benzerlik İndeksleri ve Dendogramların<br>Oluşturulması.....          | 67  |
| 3.2.3.3 Locus Başına Düşen Allel Sayısı.....                                   | 68  |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....                                        | 69  |
| 4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                                  | 69  |
| 4.1.1. Mikrosatellite (SSR) Analizi Sonuçları.....                             | 69  |
| 4.1.2. SSR Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendogramın<br>Değerlendirilmesi..... | 82  |
| 4.2. TARTIŞMA.....                                                             | 88  |
| 5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                       | 95  |
| KAYNAKLAR.....                                                                 | 96  |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                  | 104 |

## KISALTMALAR

|             |   |                                                         |
|-------------|---|---------------------------------------------------------|
| <b>AFLP</b> | : | Amplified Fragment Length Polymorphism                  |
| <b>bp</b>   | : | base pair                                               |
| <b>cDNA</b> | : | Complementary deoxyribonucleic acid                     |
| <b>CTAB</b> | : | Cetyltrimethylammoniumbromide                           |
| <b>cm</b>   | : | santi metre                                             |
| <b>dATP</b> | : | deoxy adenosine trifosfat                               |
| <b>dCTP</b> | : | deoxy cytidine trifosfat                                |
| <b>dGTP</b> | : | deoxy guanosine trifosfat                               |
| <b>dTTP</b> | : | deoxy thymidine trifosfat                               |
| <b>dk</b>   | : | dakika                                                  |
| <b>DNA</b>  | : | Deoxyribonucleic acid                                   |
| <b>EDTA</b> | : | Ethilenediaminetetraacetic acid                         |
| <b>g</b>    | : | gram                                                    |
| <b>ISSR</b> | : | inter-simple sequence repeat                            |
| <b>kb</b>   | : | kilobaz                                                 |
| <b>mg</b>   | : | miligram                                                |
| <b>ml</b>   | : | mililitre                                               |
| <b>mm</b>   | : | milimetre                                               |
| <b>mM</b>   | : | milimolar                                               |
| <b>ng</b>   | : | nanogram                                                |
| <b>PCR</b>  | : | Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu) |
| <b>PAGE</b> | : | Polyacrilamide Gel Electrophoresis                      |
| <b>RAPD</b> | : | Randomly Amplified Polymorphic DNA                      |
| <b>RFLP</b> | : | Restriction Fragment Length Polymorphism                |
| <b>RNA</b>  | : | Ribonucleic Acid                                        |
| <b>rpm</b>  | : | revolution per minute                                   |
| <b>SDS</b>  | : | Sodiumdodecylsulfate                                    |
| <b>SSR</b>  | : | Simple Sequence Repeat                                  |



|              |   |                                       |
|--------------|---|---------------------------------------|
| <b>Taq</b>   | : | <i>Thermus aquaticus</i>              |
| <b>TAE</b>   | : | Tris/acetate/EDTA (Buffer)            |
| <b>TBE</b>   | : | Tris/borate/EDTA (Buffer)             |
| <b>TE</b>    | : | Tris EDTA (Buffer)                    |
| <b>Tris</b>  | : | tris(hydroxymethyl) aminomethane      |
| <b>USDA</b>  | : | The U.S. Department of Agriculture    |
| <b>UPGMA</b> | : | Unweighted pair-group method analysis |
| <b>UV</b>    | : | Ultra Violet                          |
| <b>°C</b>    | : | santigrad derece                      |
| <b>μM</b>    | : | mikromolar                            |
| <b>μl</b>    | : | mikrolitre                            |

|                     |                                                                           |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1</b>  | Dünyadaki Önemli Turunçgil Üreticisi Ülkeler ve Üretim Değerleri.....     | 5  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> | <i>Aurantioideae</i> Altfamilyasının Sistemattteki Yeri.....              | 7  |
| <b>Çizelge 1.3.</b> | <i>Aurantioideae</i> Altfamilyası İçindeYer Alan soy, Altsoy Cinsler..... | 9  |
| <b>Çizelge 2.1.</b> | Swingle ve Hodgson Tarafından Kabul Edilen Turunçgil Sistematiği.....     | 29 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> | Tanaka Tarafından Kabul Edilen Turunçgil Sistematiği.....                 | 30 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> | Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal.....                               | 42 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> | Mikrosatellit Analiz Aşamalarında Kullanılan Forward Primerler.....       | 59 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> | Mikrosatellit Analiz Aşamalarında Kullanılan Reverse Primerler.....       | 60 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> | Floresan Etiketli Forward Primerlerin Baz Dizinleri.....                  | 60 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> | Floresan Etiketli Reverse Primerlerin Baz Dizinleri.....                  | 61 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> | Turunçgil Yetiştiriciliği Yapılan Bölgeler.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 3  |
| <b>Şekil 2.1.</b> | DNA Parmakizi Analiz Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| <b>Şekil 2.2.</b> | PCR Reaksiyonu ve Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 18 |
| <b>Şekil 2.3.</b> | RFLP Analiz Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 22 |
| <b>Şekil 2.4.</b> | RAPD Analiz Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| <b>Şekil 2.5.</b> | AFLP Analiz Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 25 |
| <b>Şekil 2.6.</b> | SSR Analiz Aşamaları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 27 |
| <b>Şekil 3.1.</b> | <i>Severinia buxifolia</i> SRA, <i>Citrus natsudaïdai</i> , <i>Aegle marmelos</i> ,<br><i>Balsamocitrus dawei</i> , <i>Citrus sunki</i> , <i>Citrus amblycarpa</i> , <i>Citrus</i><br><i>aurantium</i> , <i>Citrus benikoji</i> , <i>Citrus bergamia</i> .....                                                                                   | 51 |
| <b>Şekil 3.2.</b> | <i>Citrus canaliculata</i> , <i>Citrus depressa</i> , <i>Citrus excelsa</i> , <i>Citrus</i><br><i>hanaju</i> , <i>Citrus hassaku</i> , <i>Citrus hiroshima</i> , <i>Citrus intermedia</i> ,<br><i>Citrus iyo</i> , <i>Citrus keraji</i> .....                                                                                                    | 51 |
| <b>Şekil 3.3.</b> | <i>Citrus lumia</i> , <i>Citrus macrophylla</i> , <i>Citrus moi</i> , <i>Citrus</i><br><i>myrtifolia</i> , <i>Citrus natsudaïdai</i> , <i>Citrus sudachi</i> , <i>Citrus sulcata</i> ,<br><i>Citrus tachibana</i> , <i>Citrus tamurana</i> .....                                                                                                 | 52 |
| <b>Şekil 3.4.</b> | <i>Citrus winter</i> , <i>Citrus leiocarpa</i> , <i>Citrus meyer</i> , <i>Clausena</i><br><i>lansium</i> , <i>Clausena excavata</i> , <i>Citrus clementina</i> , <i>Eremocitrus</i><br><i>glauca</i> , <i>Citrus junos</i> .....                                                                                                                 | 52 |
| <b>Şekil 3.5.</b> | <i>Fortunella margarita</i> , <i>Fortunella obovata</i> , <i>Citrus reticulata</i><br><i>var. Fremont</i> , <i>Glycosmis pentaphylla</i> , <i>Citrus sinensis var.</i><br><i>Hamlin</i> , <i>Hesperethusa crenulata</i> , <i>Citrus limon var. Kütdiken</i> ,<br><i>Microcitrus australasica</i> , <i>Citrus paradisi var. Marsh seedless</i> .. | 53 |
| <b>Şekil 3.6.</b> | <i>Murayya paniculata</i> , <i>Citrus sinensis var. Navelina</i> , <i>Citrus</i><br><i>tericulata var. Ortanique</i> , <i>Poncirus trifoliata var. Beneke</i> ,<br><i>Roug lemon</i> , <i>Citrus sudachi</i> , <i>Citrus</i><br><i>taiwanica</i> .....                                                                                           | 53 |
| <b>Şekil 3.7.</b> | DNA İzolasyonu Yapılan Yaprak Örnekleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 54 |

|                    |                                                                             |    |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.8.</b>  | DNA İzolasyonunda Yaprakların Öğütülmesi.....                               | 56 |
| <b>Şekil 3.9.</b>  | Thermal cyclers.....                                                        | 58 |
| <b>Şekil 3.10</b>  | Agarose Jel Elektroforez.....                                               | 61 |
| <b>Şekil 3.11</b>  | Polyacrlyamide Jelin Enjektör Yardımıyla Dökülmesi.....                     | 63 |
| <b>Şekil 3.12</b>  | Polyacrlyamide Jelin Bekletilmesi.....                                      | 64 |
| <b>Şekil 3.13</b>  | Polyacrlyamide Jelde Ön ısıtma Yapılması.....                               | 65 |
| <b>Şekil 3.14</b>  | PCR Ürünlerinin Jelde İlerlemesi.....                                       | 65 |
| <b>Şekil 3.15</b>  | DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Spektrofotometre..... | 66 |
| <b>Şekil 3.16</b>  | % 6'lık PAGE'de Koşularak Elde Edilmiş 25 bp Büyüklüğünde DNA Markırı.....  | 67 |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | 54. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....    | 75 |
| <b>Şekil 4.2.</b>  | 54. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....    | 75 |
| <b>Şekil 4.3.</b>  | 84. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....    | 76 |
| <b>Şekil 4.4.</b>  | 84. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....    | 76 |
| <b>Şekil 4.5.</b>  | 415 Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....        | 77 |
| <b>Şekil 4.6.</b>  | 415 Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....        | 77 |
| <b>Şekil 4.7.</b>  | 432. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....   | 78 |
| <b>Şekil 4.8.</b>  | 432. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....   | 78 |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | 559. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....   | 79 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | 559. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....   | 79 |

|                    |                                                                                                                            |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.11.</b> | 173. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant<br>Profilleri.....                                               | 80 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | 173. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant<br>Profilleri.....                                               | 80 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | 178. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant<br>Profilleri.....                                               | 81 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | 83. SSR Primeri ileAmplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant<br>Profilleri.....                                                | 81 |
| <b>Şekil 4.15.</b> | Turunçgil akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerin<br>mikrosatellit analizi sonucu elde edilen dendogram.....         | 86 |
| <b>Şekil 4.16.</b> | Turunçgil akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerin yapılan<br>mikrosatellit sonucu elde edilen benzerlik indeksi..... | 87 |
| <b>Şekil 4.17.</b> | Önemli Turunçgil Türleri.....                                                                                              | 92 |

## **1.GİRİŞ**

1960'lı yıllardan sonra DNA'nın yapı ve işleyişinin ortaya çıkarılmasıyla hızla gelişmeye başlayan moleküler biyoloji ve moleküler markır teknolojileri ile bitkilerin genetik yapılarının aydınlatılması, moleküler karakterizasyon, filogenetik çalışmalar, gen haritalamaları ve markır destekli seleksiyon teknikleriyle, diğer alanlarda olduğu gibi tarımda da yeni bir dönem başlatmıştır. Ayrıca canlıların genetik yapısında, geleneksel ıslah metodlarıyla ve doğal üreme-çoğalma süreçleriyle elde edilemeyen değişiklikler yapılması da mümkün hale gelmiştir.

Moleküler biyoloji tekniklerinin sahip olduğu avantajlar, birçok DNA markırının ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır. Morfolojik markırlar, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Morfolojik markırlar, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımlarının mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve bitkilerde aranan bazı fenotipik özelliklerin ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçıların daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markır sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir.

Turunçgillerin ilk defa M.Ö 500'lü yıllarda kültüre alındığı sanılmaktadır (**Anonim, 1975**). Bugüne kadar geçen binlerce yıllık süre içerisinde turuncgil türlerinde seleksiyon, doğal hibritleme ve spontan mutasyonlar aracılığı ile yeni turuncgil tür ve çeşitler ortaya çıkmıştır. Bu durum turuncgillerde geniş bir tat, asitlik, renk, şekil, ve irilik çeşitliliği sağlamıştır (**Göksel, 1999**).

Turunçgillerin yayılımı ise toplumsal, ticari ve kültürel gelişmelerle olmuştur. M.Ö. 400-500 yıllarında Ortadoğu'ya geldiği, sonra Fenikeliler ve Yunanlılar vasıtasıyla Akdeniz'e ulaştığı bildirilmiştir. Daha sonra coğrafi keşiflerle Amerika'ya (Florida) geçmiştir. Portekizliler vasıtasıyla Brezilya; İngilizler vasıtasıyla Avustralya'ya götürülmüştür. Bildiğimiz anlamda turuncgil yetiştiriciliğine 19. yy'da başlanmıştır. Anadolu'ya M.Ö. 3. yy'da geldiği sanılmaktadır. Turuncgillere ait ilk yazılı eser 17. yy'a aittir. Ülkemize mandarin Rusya üzerinden gelerek Karadeniz'e

geçmiştir. Bu çeşit Satsuma mandarinidir (Rize mandarini). Portakal ve limon İtalya'dan; Altıntop ise Amerika'dan ülkemize giriş yapmıştır (**Tuzcu, 2002**).

Turunçgillerin anavatanı Arap yarımadasının doğusundan, Filipinlerin doğusuna kadar ve Himalayalar ile Hindistan'dan Avustralya'ya kadar olan bölgeyi içine alan geniş bir coğrafya olmasına rağmen, asıl anavatanı Güneydoğu Asya'dır (**Davies ve Albrigo , 1994**).

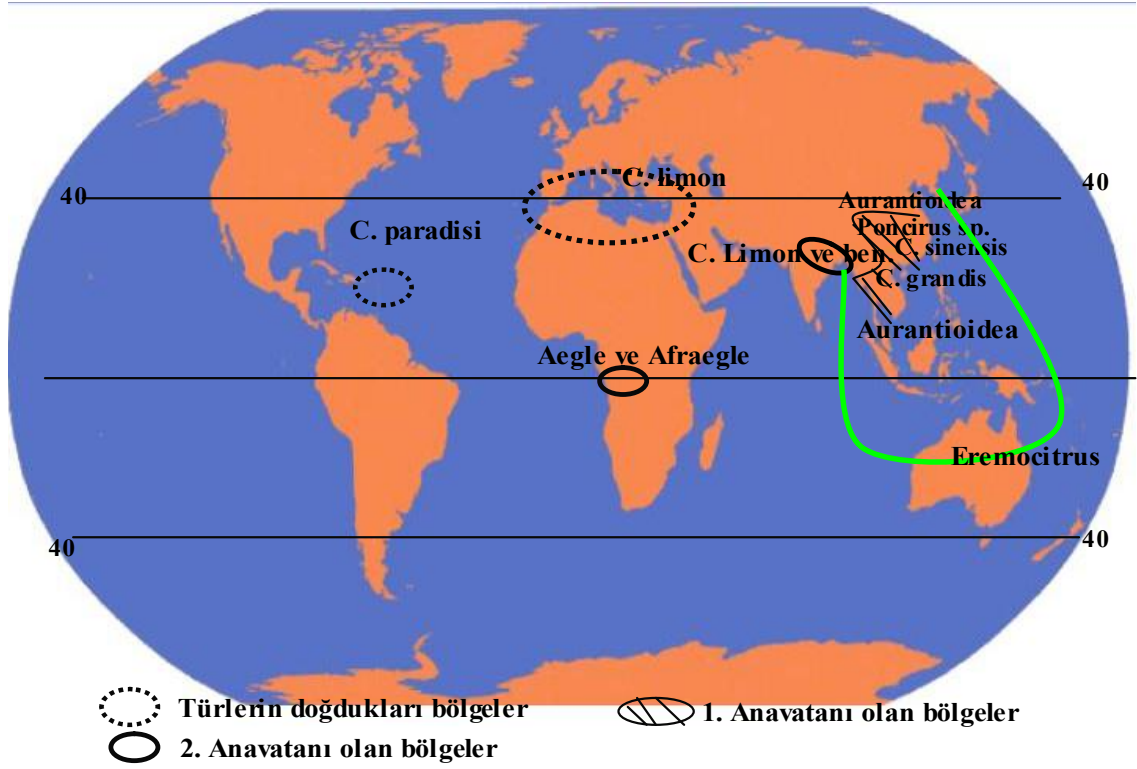
Turunçgillerin birinci derecede anavatanı Çin kıyıları, Güneydoğu Çin ile Çin'in güney kıyıları ve Sarı ırmak vadisi içleridir. İkinci derecede anavatanı ise özellikle Himalayaların güney etekleri, Endonezya, Avustralya'nın kuzeyi, Yeni Gine, Timor Adası, Filipinler, Japonya ve Tayvan' dır (**Tuzcu, 2002**).

Turunçgil yetiştiriciliği dünyada 40° kuzey enlemleri ile 40° güney enlemi arasında yapılmaktadır. Bu anlamda üç ana bölge vardır (**Şekil 1.1.**) ;

**Tropik Bölge:** 23° kuzey enlemi ile 23° güney enlemi arasında kalan alanları kapsamaktadır.

**Semitropik Bölge:** 23° – 30° kuzey enlemi ile 23° – 30° güney enlemi arasında kalan kısımları kapsamaktadır.

**Subtropik Bölgeler:** 30° – 40° kuzey enlemi ile 30° – 40° güney enlemi arasında kalan alanları içermektedir.



**Şekil 1.1.** Turunçgil Yetiştiriciliği Yapılan Bölgeler

Ancak turunçgil üretiminin çok büyük bir bölümü subtropik kuşak içerisinde kalan bölgelerde yapılmaktadır. Bu bölgeler taze tüketime yönelik ürün yetiştiriciliği için yoğunlaşmıştır. Kalite düşük olduğu için semitropik ve tropik bölgelerde ağırlıklı olarak sanayiye yönelik üretim yapılmaktadır. Semitropik ve tropik bölgelerde yetiştirilen meyvelerde iç ve dış renklenme yeterli olmaz, aroma zenginliği-koku azdır, şeker miktarı yüksek değildir. Bu durumda lezzetsiz ve aromasız meyveler oluşur (Tuzcu, 2002).

Turunçgil yetiştiriciliğinde; hastalık, zararlı, yabancı otlar, iklim ve toprak koşulları ve pazarlama gibi pek çok sorunla karşılaşmaktadır. Turunçgil genetik kaynakları, hızlı gelişen endüstri için bu tür sorunların çözümünde çok önemli bir yer almaktadır.

Dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan meyve türlerinin başında gelen turuğgillerde biyolojik çeşitliliğin bilinmesi, izlenmesi ve korunması gerekmektedir.



Özellikle moleküler tekniklerin geliştirilmesi, turunçgil akraba türlerinin doğal yayılış alanlarının ve genetiksel ilişkisinin belirlenmesi çalışmalarında büyük kolaylıklar sağlamıştır.

Turunçgil çeşitleri arasındaki farklılığı tespit etmek için DNA markırları yaygın olarak kullanılmaktadır. Değişik ıslah yöntemleri ve doğal olarak bugüne kadar elde edilmiş tür, çeşit ve tiplerin ebeveynleri ile ilgili bilgiler elde edilmektedir.

### **1.1. Turunçgillerin Dünya ve Türkiye Üretimi**

Turunçgiller dünyada ticari hacmi en fazla olan meyve türüdür. En çok üretilen, en çok alınıp-satılan meyve türleridir.

Türkiye’de oldukça eski bir geçmişe sahip olan turunçgil yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren ise üretimde önemli artışlar olmuştur. Ülkemizde turunçgil yetiştiriciliği, ekolojik koşullar açısından son derece uygundur. Turunçgil alanları Ege Bölgesinde marjinal üretim sınırına ulaşılmış olmakla beraber, Akdeniz Bölgesinde turunçgil yetiştirilebilecek alanlar turizme açılmıştır. Bunun sonucunda da üreticiler tarla bitkileri yetiştiriciliği yaptıkları alanlarda turunçgil yetiştirmeye başlamışlardır (**DPT, 2001**).

Dünya turunçgil üretiminin % 22’si Akdeniz Havzasında gerçekleştirilmektedir. Türkiye’nin toplam dünya turunçgil üretimindeki payı % 2.3’dür. Dünyadaki en fazla turunçgil üretici ülke 20,142,600.00 milyon ton ile Brezilya olup bunu Çin takip etmektedir (**Çizelge 1.1.**). Türkiye bu sıralamada 2,587,650.00 milyon ton ile 12. sırada yer almaktadır (**Anonim, 2005**).

**Çizelge 1.1.** Dünyadaki Önemli Turunçgil Üreticisi Ülkeler ve Üretim Değerleri  
(Anonim, 2005)

|                    | PORTAKAL      | MANDARİN      | LİMON<br>ve<br>LAYM | ŞADOK ve<br>ALTINTOP | TOPLAM         |
|--------------------|---------------|---------------|---------------------|----------------------|----------------|
| <b>DÜNYA</b>       | 60,188,121.20 | 23,593,194.00 | 12,749,167.00       | 4,000,388.00         | 107,145,186.20 |
| 1. Brezilya        | 17,804,600.00 | 1,270,000.00  | 1,000,000.00        | 68,000.00            | 20,142,600.00  |
| 2. Çin             | 2,412,000.00  | 11,395,000.00 | 634,500.00          | 443,000.00           | 14,884,500.00  |
| 3. ABD             | 8,393,276.00  | 303,907.00    | 789,251.00          | 923,514.00           | 10,436,251.00  |
| 4. Meksika         | 4,112,711.00  | 402,537.00    | 1,806,784.00        | 350,199.00           | 6,735,231.00   |
| 5. İspanya         | 2,294,600.00  | 2,125,500.00  | 896,500.00          | 30,000.00            | 5,360,100.00   |
| 6. Hindistan       | 3,100,000.00  | —             | 1,420,000.00        | 142,000.00           | 4,750,000.00   |
| 7. İran            | 1,900,000.00  | 720,000.00    | 1,100,000.00        | 37,000.00            | 3,825,000.00   |
| 8. Mısır           | 1,789,000.00  | 665,000.00    | 338,000.00          | 3,100.00             | 2,797,600.00   |
| <b>12. TÜRKİYE</b> | 1,250,000.00  | 585,000.00    | 600,000.00          | 150,000.00           | 2,587,650.00   |

Türkiye’de turunçgil üretiminin %99’dan fazlasının sağlandığı Ege ve Akdeniz kıyıları üç ana bölgeye ayrılmaktadır. Bu bölgelerde bazı turunçgil türleri daha yoğun olarak yetiştirilebilmektedir. Çukurova Bölgesinde Türkiye toplam turunçgil üretiminin %76’si yapılmaktadır. Altıntop ve limon’un %95’i, portakal %65’i ve mandarin’in %61’i bu bölgede üretilir. Mersin, limon üretiminde ilk sırada iken Adana ve Hatay’da portakal en fazla üretilen üründür. Ayrıca Adana, altıntop ve mandarin üretiminde de ilk sırada yer almaktadır. Batı Akdeniz Bölgeleri, ikinci büyük turunçgil üretim yöresidir. Türkiye’nin toplam turunçgil üretiminin %15’i bu bölgede yapılmaktadır. Batı Akdeniz Bölgesinde en fazla üretilen turunçgil çeşidi portakaldır ve portakal üretiminin %30’nu bu yöre sağlamaktadır. Turunçgil üretimi yapılan üçüncü bölge ise Ege bölgesidir ve diğer iki bölgeden daha küçük bir alanı kapsar. Toplam turunçgil üretiminin yaklaşık %9’u buradan karşılanmaktadır. Ege

bölgesinde en fazla üretilen turunçgil çeşidi mandarindir. Toplam mandarin üretiminin %32'si bu yöreden karşılanmaktadır (DİE, 2001).

Turunçgil üretimi yapılan Ege ve Akdeniz kıyılarının iklim özellikleri hasat zamanının uzamasına yol açmaktadır. İlk hasat Mersin'de Eylül ayında enterdonat limon ile başlayıp, batıya İzmir'e kadar kıyı boyunca devam etmektedir (Tuzcu, 2002).

### **1.2. *Aurantioideae* Altfamilyası Hakkında Genel Bilgiler**

*Aurantioideae* alt familyası bitkiler alemi ve özellikle meyve türleri içerisinde önemli bir yeri olan portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), limon (*Citrus limon*), altıntop (*Citrus paradisi*) gibi ekonomik yönden büyük öneme sahip türlerle, bunların akraba cins ve türlerini içine alan geniş bir taksonomik gruptur. Ancak, genetiksel özellikleri nedeniyle botanik bakımdan karmaşık bir yapıya sahiptir (Şeker, 1999).

*Aurantioideae* altfamilyası *Rutaceae* (Sedefotugiller) familyası içinde yer alan yedi alt familyadan biridir.

Çizelge 1.2. *Aurantioideae* Altfamilyasının Sistematikteki Yeri

|                 |                                                                                                                                                                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BÖLÜM</b>    | <i>Embryophyta</i>                                                                                                                                                          |
| <b>ALTBÖLÜM</b> | <i>Angiospermae</i>                                                                                                                                                         |
| <b>SINIF</b>    | <i>Dicotyledoneae</i>                                                                                                                                                       |
| <b>ALTSINIF</b> | <i>Archichlamydae</i>                                                                                                                                                       |
| <b>TAKIM</b>    | <i>Geraniales</i>                                                                                                                                                           |
| <b>ALTTAKIM</b> | <i>Geraniineae</i>                                                                                                                                                          |
| <b>FAMİLYA</b>  | <i>Rutaceae(Sedefotugiller)</i>                                                                                                                                             |
|                 | <i>Rutoideae</i><br><i>Dictyolomatoideae</i><br><i>Flindersioideae</i><br><i>Spathelioideae</i><br><i>Toddalioideae</i><br><i>Aurantioideae</i><br><i>Rhabdodendroideae</i> |

Bu alt familya Amerikalı turuncgil taksonomisti W.T. Swingle tarafından 33 cins ve 203 tür içeren *Clauseneae* ve *Citreae* olarak iki soya ayrılmış ve bunların içerisinde yer alan altsoylar ile bunlar içerisinde yer alan cinsler **Çizelge 1.3.**'de verilmiştir. Altfamilyanın ana özellikleri meyvelerinin derimsi veya sıkı bir kabuk ile kaplı olması, hesperidium adı verilen üzüksü meyveler yapısına sahip olması ve özellikle *Citrineae* altsoyundaki türlerde usare tulumcuklarının bulunmasıdır. Tohumları endospermsiz ve bazen de iki yada daha fazla apomiktik olarak oluşmuş nuseller embriyo içermektedirler. Yapraklarında ve kabukta yağ kesecikleri bulunmaktadır. Ağaçları küçük ya da büyük hacimlidirler. Altfamilya içerisindeki cins ve türlerden *Poncirus*, *Aegle* ve *Feronia* cinsleri ile *Clausena* cinsinden 3 ve *Murraya* cinsinden 1 tür dışında diğerleri herdemyeşil özelliğe sahiptir. Birçok cins eterik yağ kesecikleri ile bezenmiş, yeşil, sarı ya da turuncu renkli meyve kabuğuna sahiptir. *Citrus* cinsi ve diğer çok az sayıdaki cinsin meyveleri usare

tulumcuklarından oluşmuştur. *Balsamocitrinae* altsoyu içerisindeki türlere ait meyveler portakal büyüklüğünde meyveler oluştururlar ancak, meyve kabukları sert ve odunsu yapıdadır. Yapılan son taksonomik çalışmalar tür sayısının 220'nin üzerinde olduğunu bildirmektedir. Altfamilya içinde yer alan cinsler üzerinde yapılan taksonomik çalışmalar genelde karşılaştırmalı morfolojik yapı dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Morfolojik yapıya dayalı sonuçlar daha sonra melezleme ve aşılama yapılarak uyuma durumları ile desteklenmektedir (**Davies ve Albrigo, 1994**).

**Çizelge 1.3.** *Aurantioideae* Altfamilyası İçinde Yer Alan Soy, Altsoy ve Cinsler (Swingle, 1967; Davies ve Albrigo, 1994).

| SOY               | ALTSOY                                | CİNS                  | TÜR SAYISI     |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------|
| <i>Clauseneae</i> | <i>Micromelinae</i>                   | <i>Micromelum</i>     | 9              |
|                   | <i>Clauseninae</i>                    | <i>Glycosmis</i>      | 35             |
|                   |                                       | <i>Clausena</i>       | 23             |
|                   |                                       | <i>Murraya</i>        | 11             |
|                   | <i>Merrillinae</i>                    | <i>Merrillia</i>      | 1              |
| <i>Citreae</i>    | <i>Triphasiinae</i>                   | <i>Wenzelia</i>       | 9              |
|                   |                                       | <i>Monanthocitrus</i> | 1              |
|                   |                                       | <i>Oxanthera</i>      | 4              |
|                   |                                       | <i>Merope</i>         | 1              |
|                   |                                       | <i>Triphasia</i>      | 3              |
|                   |                                       | <i>Pamburus</i>       | 1              |
|                   |                                       | <i>Luvunga</i>        | 12             |
|                   |                                       | <i>Paramignya</i>     | 15             |
|                   | <i>Balsamocitrinae</i>                | <i>Swinglea</i>       | 1              |
|                   |                                       | <i>Aegle</i>          | 1              |
|                   |                                       | <i>Afraegle</i>       | 4              |
|                   |                                       | <i>Aeglopsis</i>      | 2              |
|                   |                                       | <i>Balsamocitrus</i>  | 1              |
|                   |                                       | <i>Feronia</i>        | 1              |
|                   |                                       | <i>Feroniella</i>     | 3              |
|                   | <i>Citrinae</i> (İlkel Turunçgiller)  | <i>Severinia</i>      | 6              |
|                   |                                       | <i>Pleiospermium</i>  | 5              |
|                   |                                       | <i>Burkillanthus</i>  | 1              |
|                   |                                       | <i>Limnocitrus</i>    | 1              |
|                   |                                       | <i>Hesperethusa</i>   | 1              |
|                   | <i>Citrinae</i> (Yakın Turunçgiller)  | <i>Citropsis</i>      | 11             |
|                   |                                       | <i>Atalantia</i>      | 11             |
|                   | <i>Citrinae</i> (Gerçek Turunçgiller) | <i>Fortunella</i>     | 4              |
|                   |                                       | <i>Eremocitrus</i>    | 1              |
|                   |                                       | <i>Poncirus</i>       | 1              |
|                   |                                       | <i>Clymenia</i>       | 1              |
|                   |                                       | <i>Microcitrus</i>    | 6              |
|                   |                                       | <i>Citrus</i>         | 36             |
| <b>2 SOY</b>      | <b>6 ALTSOY</b>                       | <b>33 CİNS</b>        | <b>223 TÜR</b> |

**1.3. *Citrus* Cinsi ve Akrabalarının Genel Özellikleri****1.3.1. Uzak ve Yakın Turunçgil Akrabaları**

*Aurantioideae* altfamilyasının içinde bulunan turunçgil akraba cins ve türlerine son 10 yıl içerisinde artan bir ilgi vardır. Biyolojik yöntemlerin özellikle bitki ıslahına getirdiği yenilikler, akraba türlerinin üstün özelliklerinin değerlendirmeye çalışılmasını sağlamıştır. Akraba cins ve türlerin üstün özellikleri özellikle hastalık ve zararlılara dayanıklılık ile iklim ve toprak koşullarına adaptasyon yeteneklerinin geliştirilmesi konusunda önem taşımaktadır.

Turunçgil akrabalarının çoğu çok küçük meyveler oluşturmaktadırlar. Akraba cinslerin birçoğu *Citrus* cinsi ile aşı uyumsuzluğu göstermektedir. *Aurantioideae* altfamilyası içinde yer alan 33 cinsten 28'i Pakistan'ın batısı, orta-kuzey Çin, Hindistan'nın doğusu ve Avustralya orjinlidir. Diğer 5 cins ise tropikal Afrika orjinlidir. Sadece *Clausena* cinsi hem Güneydoğu Asya hemde Afrika orjinlidir. Turunçgil akraba cinslerinin bazıları da süs bitkisi olarak öneme sahiptirler (Seker, 1999).

Bazı akraba cinslerin genel özellikleri kısaca verilmiştir (Swingle, 1967):

**a) *Micromelum*:**

- Sert ve kuru kabuklu meyvelere sahiptir.
- 9-10 tür içermekle birlikte türlerinin ayırt edilmesi son derece zordur.
- Parçalı yapraklara sahiptir ve genelde *Clausena* ve *Murayya* cinslerinin yapraklarına çok benzer. Ancak çiçekleri, yumurtalık ve tohumları birbirlerinden çok farklıdır.

**b) *Glycosmis*:**

- Englerin (1931), çalışmalarında 21 tür belirtilmesine karşın, Tanaka bu cins içerisinde 35 tür olduğunu bildirmiştir.
- Ağaçları küçük ya da çalı formunda olup dikensizdirler.
- Türlerin birleşik yapraklarında bulunan yaprakçık sayısı 2, 3 ya da 5 olabilmektedir.
- Meyveleri küçük, etli ancak tohumları iridir.

**c) Clausena:**

- 23 tür bulunmaktadır.
- Clausena excavata* ve *Clausena anisata* yaygın olarak bulunan türleridir.
- Orta büyüklükte ağaçlar oluşturur.
- Yaprakları bileşiktir ve genellikle 3-7 bazen ise 19-32 yaprakçıktan oluşur.
- Çiçekleri salkım şeklinde ve küçüktür.
- Meyveleri küçük, 2-5 karpelli ve bazen 1 adet olgun tohum içerir.
- *Clausena lansium* Çin’de ticari olarak yetiştirilmekte ve tüketilmektedir.

Bununla birlikte yine aynı tür *Citrus* cinsi ile aşılatabilmektedir.

**d) Murayya :**

- 11 tür içermektedir.
- *Citrus* cinsi ile birçok farklılık taşımasına karşın, *Murayya paniculata* üzerine *Citrus* cinsinin aşılatabildiği, *Citrus* cinsi ile yapılan melezlemelerde ise bodur özelliklere sahip melezler elde edildiği bildirilmiştir.

**e) Merillia:**

- Tipik özelliği 55 – 60 mm’ye ulaşan iri çiçeklere sahip olmasıdır.

**1.3.2 Gerçek Turunçgiller**

Bu grup içerisinde altı cins yer almaktadır. Bunlar *Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia*, *Microcitrus* ve *Citrus* cinsleridir. Bu altı cinsin yaprakları *poncirus* dışında basit yaprak özelliğine sahiptir. *Citrus*, *Fortunella* ve *Poncirus* cinsleri ticari yetiştiricilik bakımından büyük önem önem taşımaktadırlar.

**1.3.3. Citrus Cinsi Dışında Kalan Diğer Cinsler**

*Clymenia* üzerindeki araştırmalar çok kısıtlıdır ancak diğer cinsler üzerinde yapılan araştırmalar bu cinsler arasında yapılan aşı ve melezlemelerin başarı ile sonuçlandığını göstermiştir, ancak bu genelleme doğru değildir. *Microcitrus* ve *Poncirus* melez tohumlarının çimlenme gücüne sahip olmadıklarını; *Fortunella X*



*Poncirus* melez tohumlarının çimlendiğini ancak yaşama gücünün çok zayıf olduğunu belirtilmektedir (Moore, 2001).

Bu altı cinsin anavatanı kuzeydoğu Hindistan, Orta-Kuzey Çin, Orta-Doğu Avustralya, Yeni Kaledonya, Java adaları ve Filipinlerdir. Bazı cinsler doğal olarak Güney Japonya’da da bulunmaktadır. *Citrus* cinsinin doğal yayılım alanının Orta-Doğu Avustralya bölgesi dışında kalan diğer yerler olduğu sanılmaktadır. *Microcitrus* ve *Eremocitrus*’un doğal yayılım alanı ise Orta-Doğu Avustralya’dır. *Poncirus* cinsi Kuzey Çinde, *Fortunella* ise *Citrus* cinsi ile birlikte Güney Çinde doğal olarak bulunmuştur. *Cylemenia* cinsi *Citrus* cinsinin bazı türleri ile birlikte Bismark takım adaları boyunca yayılmıştır. *Clymenia* cinsinin en ilkel turuncgil olduğu düşünülmektedir ve bazı önemli taksonomik özellikler bakımından *Citrus* cinsi ile önemli farklılıklar sergilemektedir (Seker, 1999).

*Fortunella* cinsi *Citrus* türleri dışında ekonomik olarak öneme sahip olan tek cinstir. Çekici dış görünüşü meyvelerinin yenilebilir olması nedeniyle *Fortunella margarita* ve *Fortunella japonica* türleri başta Çin ve Japonya olmak üzere birçok subtropik bölgede sınırlı da olsa yetiştirilmektedir. Meyveleri genellikle küçük olmakla birlikte kabuğu ile yenilebilmektedir. *Fortunella polyandra* diğer türler gibi önemli bir tür değildir. *Fortunella hindsii* çok küçük meyvelere sahiptir ve doğal olarak tetraploittir. *Fortunella* melezleri de yine belli ölçülerde öneme sahip olmuşlardır, bunlar içerisinde kalamondin (*Citrus madurensis*) ve *Citrus mitis* mandarin X kamkat melezleri olarak düşünülmektedirler. Kalamondin’in meyvesi Filipinler’de yoğun olarak tüketilmektedir (Moore, 2001).

*Eromocitrus* cinsi meyve özellikleri bakımından *Fortunella* cinsi ile benzerlikler taşımaktadır. Bu cins içerisinde tek tür bulunmakta (*Eromocitrus galuca*) ve bu tür kserofit yani kurak koşullara önemli ölçülerde dayanıklılık göstermektedir. Bu özellikleri nedeni ile yaprakları küçük ve rengi gri-yeşildir. Avustralya’da yapılan çalışmalarla bu cinsin soğuk ve kurak koşullar ile tuz ve borun fazla bulunduğu ortamlarda dayanıklılık gösterdiği saptanmıştır (Swingle, 1967).

*Microcitrus* cinsi semi-kserofit bitki özellikleri göstermekle birlikte stres koşullarına yüksek toleranslıdır. Bu cins içerisinde 6 tür bulunmaktadır. *Citrus* cinsi ile yapılan aşılamalarda aşı noktasının zayıf kaldığı bildirilmiştir. *Phytophthora* fungal

hastalık etmenlerine ve oyucu nematod (*Rodophulus simili*) ile değişik stres koşullarına yüksek derecede dayanım gösterir. Öte yandan bu cins içerisinde yer alan türlerin gençlik kısırlığı dönemleri son derece kısa olup, yeni turunçgil çeşitlerinin ıslahı çalışmaları için değerlidir.

*Poncirus* cinsi soğuklara dayanıklılık bakımından en önemli cinstir. Kış aylarında – 26°C 'ye dayanım gösterdiği belirlenmiştir. Yaprakları 3 parçalıdır ve subtropik koşullarda kışın yapraklarını dökmektedir. *Citrus* cinsi için anaç olarak kullanılan en eski türdür ve günümüzde de Japonya'daki en önemli turunçgil anacı durumundadır. Bununla birlikte anaç özelliklerinin üstün olması nedeniyle yoğun olarak *Citrus* türleri ile melezlemeleri yapılmış ve üstün anaçlar elde edilmiştir. Anaç özellikleri arasında *Tristeza* virüsüne, *Phytophthora* etmenlerine, nematodlara ve soğuklara dayanıklılık özellikleri en önemlileridir. Ayrıca büyüme gücü düşük *Citrus* bitkilerinin elde edilmesi amacıyla *Flying Dragon* üç yapraklısı da önemli bulunmuştur (Tuzcu, 2002).

*Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus* ve *Microcitrus* cinsleri önemli özellikleri nedeniyle ıslahçılar bakımından değerlendirilmeye çalışılmaktadır.

#### **1.3.4. *Citrus* Cinsi**

*Citrus* cinsi; yaprak, çiçek ve meyve özellikleri yönüyle kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilen *Eucitrus* ve *Papeda* adlı çok belirgin 2 alt cinse ayrılmaktadır. *Eucitrus* altcinsi yetiştiricilik bakımından önem taşıyan portakal, mandarin, limon, laym, altıntop, turunç gibi tüm önemli türleri içermekte olup bunların hepsinin usare kesecikleri asidik, ekşi ya da tatlı meyve suyu ile doludur. Buna karşın, *Papeda* altcinsinin türlerinde hiçbirisi yenilebilir meyvelere sahip değildir ve usare tulumcukları eterik yağ damlacıkları içerdiğinden tatları çok ekşi ve acımsıdır (Tuzcu, 2002).

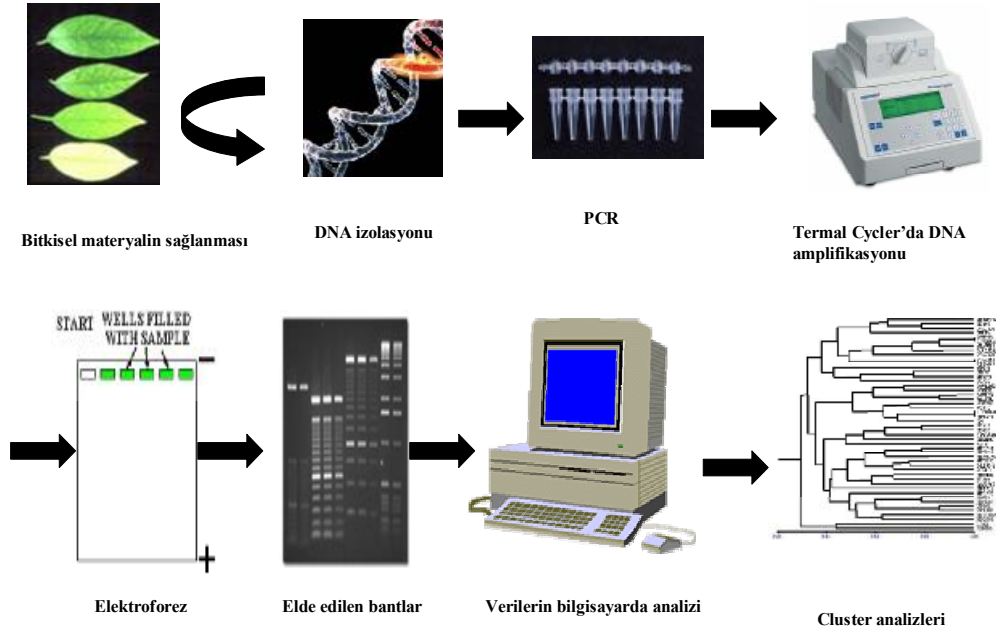
## **2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

### **2.1. DNA Parmakizi Nedir?**

Tüm yüksek yapılı organizmaların genomlarındaki bir veya daha fazla özelliğin karakterizasyonu DNA bantlarının ortaya koyulması ile olur. Farklı büyüklükteki ve farklı sayıdaki DNA bantlarının ortaya koyulması ile her birey için DNA parmakizi elde edilmiş olur.

DNA profilinin çıkarılması ve spesifik DNA parmakizlerinin elde edilmesinde izlenen yollar aşağıdaki gibidir (**Şekil 2.1**).

- ◆ Bitkisel materyalin sağlanması,
- ◆ Bitkisel materyallerden DNA izolasyonu,
- ◆ Kullanılacak yönteme göre, genetik materyalin çoğaltılması ve ortaya koyulması (PCR),
- ◆ Bireyler arasındaki polimorfizimin farklı moleküler markır teknikleri ile belirlenmesi (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR),
- ◆ DNA profillerinin spesifik bir programda analiz edilmesi.



Şekil 2.1. DNA Parmakizi Analiz Aşamaları

### 2.1.1 Bitkisel Materyalin Sağlanması ve DNA izolasyonu

Bitki dokularından saf DNA izolasyonu oldukça zordur. Turunçgil bitki dokuları polisakkaritler, polifenoller ve karbonhidratlarca zengindir ve bu maddeler DNA izolasyonunu güçleştirirler. DNA yeterince saf değilse PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmez (Luro, 1992).

Bu sorunun üstesinden gelmek için alternatif ekstraksiyon bufferı kullanılmaktadır. Ekstraksiyon bufferı'nın pH'sı ve spesifik koruyucu maddeler veya deterjanlar belirli türler için optimize edilmelidir. Özellikle DNA'yı parçalayan enzimler için optimum olan pH düzeyinden kaçınılmalıdır. Örneğin DNazlar pH 7.0 civarında bulunurlar (Dunham ve Bryant, 1983). Bu durumda bitki ekstraksiyon bufferı pH 8.0 hatta pH 9.0 civarında olmalıdır.

Fenolik bileşiklerden tamamen temizlenmemiş DNA'da kahverengileşme meydana gelmektedir. Bunu önlemek için 5-10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) kullanılmaktadır (**Deng ve ark., 1995**).

Orjinal dokunun toplanması ve ekstraksiyondan önce korunması DNA'nın kalite ve kantitesini çok etkiler (**Pyle ve Adams, 1989**). Genel olarak en iyi doku taze olan dokudur. Taze olarak toplanan dokular soğuk ve nemli bir ortamda saklanmalıdır. Bitkisel materyalin en iyi şekilde saklanması dondurularak ya da kurutularak olur (**Liston ve ark., 1990**).

Bitkilerden DNA izolasyonunda başarıda DNA'nın miktarı, kalitesi ve kullanışlılığı önemlidir. Bitki dokularından DNA izole etmek için çok farklı izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Her yöntemde kullanılan kimyasallar birbirinden farklıdır (**Luro, 1992**).

Turuncgillerde saf DNA izolasyonu için farklı yöntemler kullanılabilir. Özellikle **Doyle ve Doyle (1987)**, **Dellaporta ve ark (1983)**, **Murray ve Thompson (1980)**'ın yöntemlerinde yapılan küçük modifikasyonlarla DNA izolasyonu kolaylıkla yapılabilir.

DNA hücrede serbest bir molekül halinde değildir. Bazı proteinler (histonlar, histon olmayan proteinler, HMG proteinleri) ve RNA ile bir kompleks halinde bulunur. DNA izolasyonu değişik organizma gruplarında farklılık gösterse de temelde hepsinde aynı aşamalarda meydana gelir (**Göksel, 1999**).

Başarılı bir DNA izolasyonu için aşağıdaki koşulların gerçekleşmesi gerekmektedir (**Aka-Kaçar, 2001**)

- ◆ Hücresel organellerin açığa çıkması için hücre duvarı kırılmalıdır. Bu genellikle dokunun sıvı azot, kuru buz yada sıcak ekstraksiyon bufferi içerisinde öğütülmesi ile olur.
- ◆ Hücre membranı parçalanmalıdır, böylece DNA ekstraksiyon buffer içinde serbest kalır. Bu genelde SDS gibi deterjanların kullanılmasıyla olur.
- ◆ DNA nükleaz'lerden korunmalıdır. EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) gibi deterjanlar bu nedenle kullanılırlar. EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) pek çok nükleaz için kofaktör olarak gerekli olan

Mg<sup>+2</sup> iyonlarına bağlanarak şelat oluşturur. Ayrıca buffer/doku karışımına kloroform ve/veya fenol karışımı eklenerek DNA'dan proteinlerin ayrılması sağlanır.

- ◆ DNA'nın kırılması en aza indirgenmelidir. Solusyon içerisindeki DNA çalkalanarak bile kırılabilir.
- ◆ Dondurulmuş dokunun öğütülmesi ile ekstraksiyon bufferi ile muamelesi arasındaki süre DNA'nın nükleotik degregasyonunu engellemek amacıyla en aza indirilmelidir.

### **2.1.2. PCR (Polmerase Chain Reaction=Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

PCR üzerine ilk makale 1985 yılında Saiki ve ark., tarafından yazılmış ve yayınlanmıştır (**Block, 1989**). PCR' da genetik materyalin çoğaltılması ve ortaya koyulması esastır. PCR'ın çalışma prensibi oldukça basittir. Özet olarak izole edilen hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa oligonükleotid primerler ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi yardımı ile in vitro koşullarda sayısal (amplifikasyonu) olarak çoğaltılması esasına dayanır (**Arda, 1995**).

#### **PCR küçük hacimler halinde hazırlanır;**

- Hedef DNA sekansları,
- İki tür spesifik oligonükleotid primerleri,
- Termotabil DNA polimeraz (Taq polimeraz veya diğerleri),
- Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bulunur.

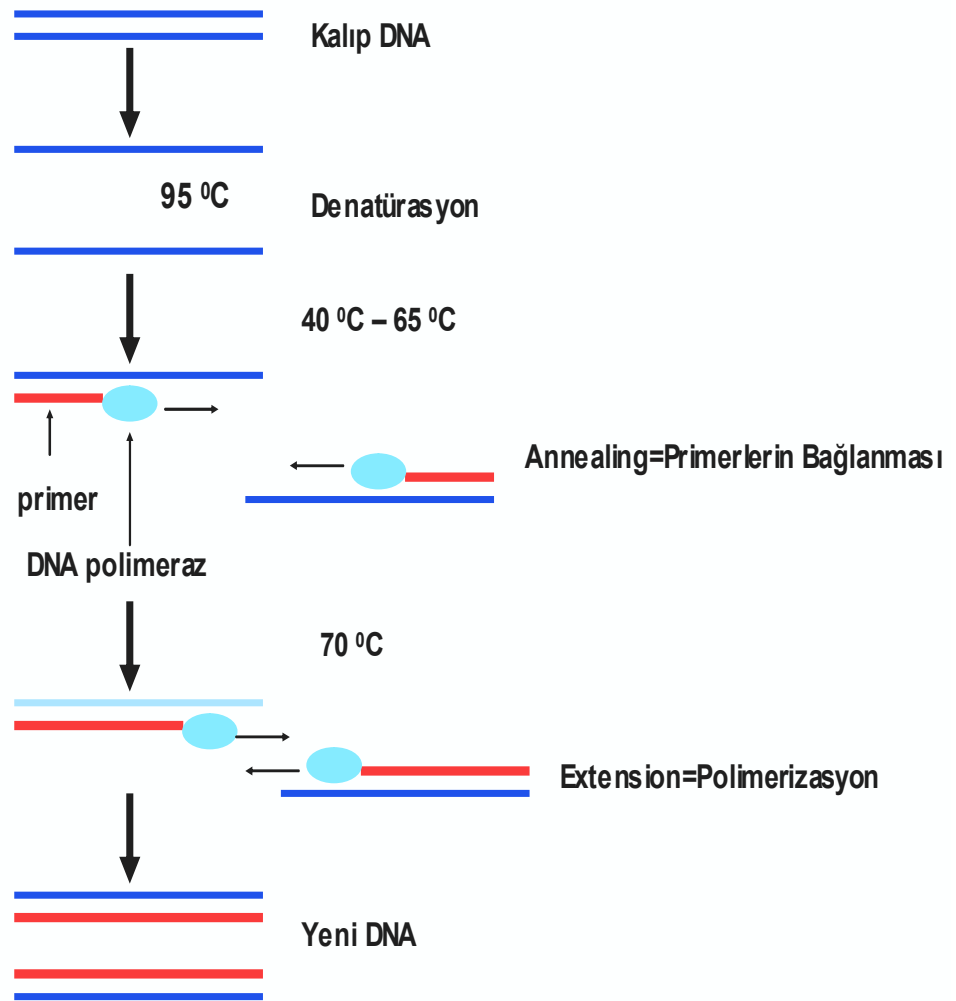
#### **Reaksiyon,**

- Hedef DNA'nın denatürasyonu (95 °C)
- Primer DNA'larının bağlanması ( 37-50 °C)
- Polimerizasyon (70-72 °C) işlemlerini içermektedir .

Tüp içinde bulunan karışım önce 95 °C'ye ısıtılarak çift iplikli DNA'nın denatürasyonu sağlanır ve tek iplikçik haline getirilir. Bu işlem sonucunda tüp 37-50 °C sıcaklığa düşürülerek primerlerin tek iplikçiklerin 3' uçlarındaki nükleotidlere

bağlanması sağlanır. Polimerizasyon için 70 °C’de primerler tek iplikçikli DNA’yı kalıp olarak kullanarak sentezini yapar ve çift iplikçikli DNA’lar meydana gelir.

Böylece birinci döngünün sonunda DNA iki katına ulaşır. Bu 3 aşamalı birinci döngü bittikten sonra 30-55 döngü devam ettirilirse milyonlarca DNA elde edilebilir. Döngü sonucunda teorik olarak  $2^n$  miktarda çift zincirli DNA molekülü elde edilir (Şekil 2.2.).



**Şekil 2.2.** PCR Reaksiyonu ve Aşamaları

### **2.1.3 Markır Tipleri**

#### **2.1.3.1. Morfolojik Markırlar**

Morfolojik özellikler tek genle kontrol edilebilir ve genetik markır olarak kullanılabilir. Görsel olarak değerlendirilebilen kalitatif özelliklerdir. Bu markırlar bitki doğasında vardır ve mutasyon sonucu ortaya çıkmışlardır (**Aka-Kaçar, 2001**).

Morfolojik markırların kullanım potansiyelleri uzun bir süredir bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları nedeniyle pratikte uygulanabilirliği kısıtlı kalmıştır (**Paterson, 1996**).

#### **2.1.3.2. Biyokimyasal Markırlar**

Biyokimyasal markırlar genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş proteinlerdir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler spesifik biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markır olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlar (**Aka-Kaçar, 2001**).

#### **2.1.3.3. DNA Markırları**

Moleküler markırlar DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizinlerinden geliştirilebilirler (**Yıldırım ve ark., 2001**).

Her biri ökaryotik DNA'daki özelliklere dayalı olarak tasarlanan ve kalıtsal olarak izlenebilen moleküler markırlar günümüzde bitki moleküler biyolojisi alanında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler markırların bitki moleküler biyolojisinde kullanıldığı alanlara örnek olarak bitki genom haritalanması, markırlar



yardımıyla ıslah (marker-assisted breeding), gen klonlama, tohum saflığı testleri ve saflık tayini verilebilir (**Brown ve ark., 1996; Ayres ve ark., 1997; Röder ve ark., 1995**).

DNA markırları kullanılarak genetik çeşitlilik araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlanması yapılabilir ve filogenetik akrabalıkları bulunabilir (**Lowe ve ark., 1996**).

#### **Genetik markırlarla ilgili önemli kriterler**

**Polimorfizm (Farklılık Gösterme):** Kullanılan bir markırın farklı genotipleri ayırt edebilme yeteneğidir. Markırların farklılık gösterme oranları markır tipine ve bitki türüne göre büyük ölçüde değişmektedir (**Yıldırım ve ark., 2001**). Polimorfizm oranının yüksek olması tercih edilen bir durumdur.

**Güvenilirlik:** Aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir markır analizinin her zaman ve her koşulda aynı sonuçları vermesidir. Güvenilirlik markır tipine göre değişmektedir (**Yıldırım ve ark., 2001**).

**Eşbaskınlık (ko-dominantlık):** Markırların eşbaskın olması, yani her iki allelinde ayırt edilebilmesidir. Bu tercih edilen bir durumdur.

İlk DNA markır sisteminin uygulanması RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism markırları) analizleri ile olmuş (**Botstein ve ark., 1980**), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin ortaya koyulması ile RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA ), SSR (Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markır sistemleri ortaya koyulmuştur.

DNA markırları ;

- DNA melezleme markırları (RFLP),
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım markırları (RAPD, SSR, AFLP, ISSR) olmak üzere iki grup altında incelenir.

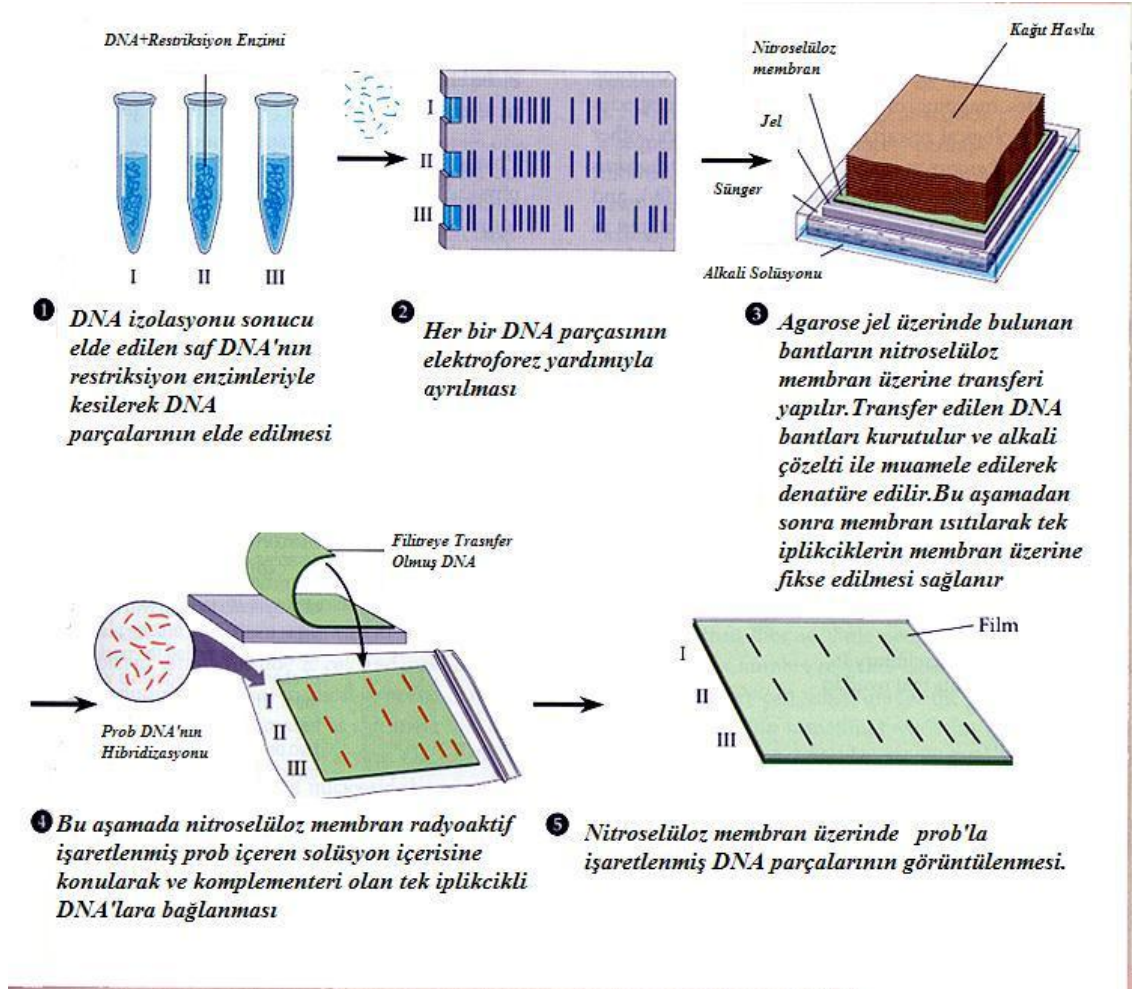
**Moleküler Markırların Uygulama Alanları**

- Genotipik tanımlama,
- Çeşit tescili,
- Islah hatlarının tanımlanması ve tohum saflık testleri,
- Hibrit çeşit saflık testleri,
- Cinsiyet belirleme, Genetik çeşitliliğin belirlenmesi,
- Gen kaynaklarının genetik kökeninin belirlenmesi,

**RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism)**

RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism markerları) (**Bostein ve ark., 1980**), dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforez'de ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır (**Şekil 2.3.**).

RFLP markırları ile türler arasındaki ve içindeki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eşbaskın (co-dominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir (**Yıldırım ve ark., 2001**). En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır (**Walton, 1993**).



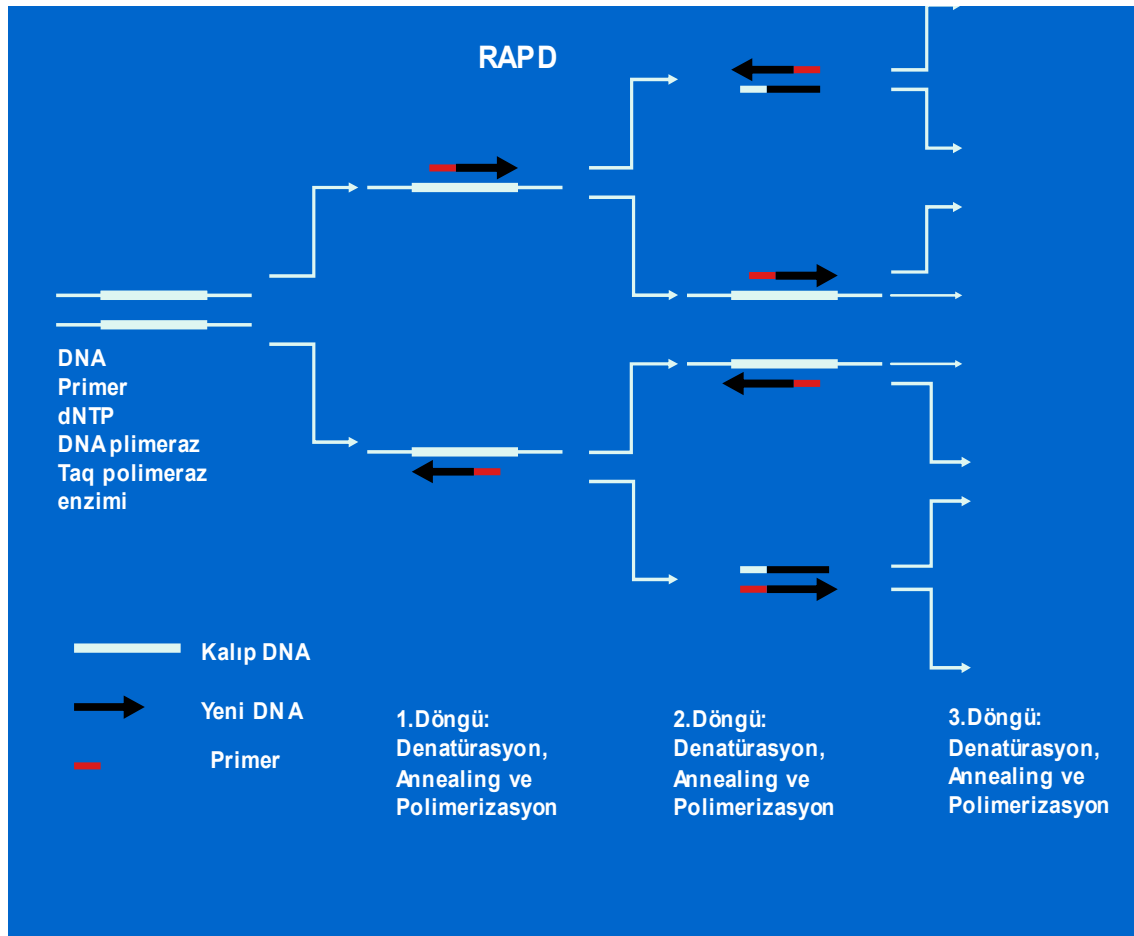
Şekil 2.3. RFLP Analiz Aşamaları (Anonim, 2007)

### RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

PCR (Polymerase Chain Reaction)'ın keşfi ile DNA polimorfizm araştıran yeni markır sistemleri ortaya koyulmuştur. Williams ve ark., (1990) tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır (Şekil 2.4.).

Amplifikasyon ürünleri bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduktan sonra gümüş nitrat yada ethidium bromid boyaması ile bandlar görünür hale gelir, bazı parçaların bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenir.

RAPD markırları, RFLP'nin tersine düşük kalitede ve miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen dominant markır (Corazza-Nunes ve ark., 2002) olmaları nedeni ile yorumlanmasının zor, güvenilirliğinin çok sınırlı ve tekrarlanamamaktadır (Lavi ve ark., 1994).



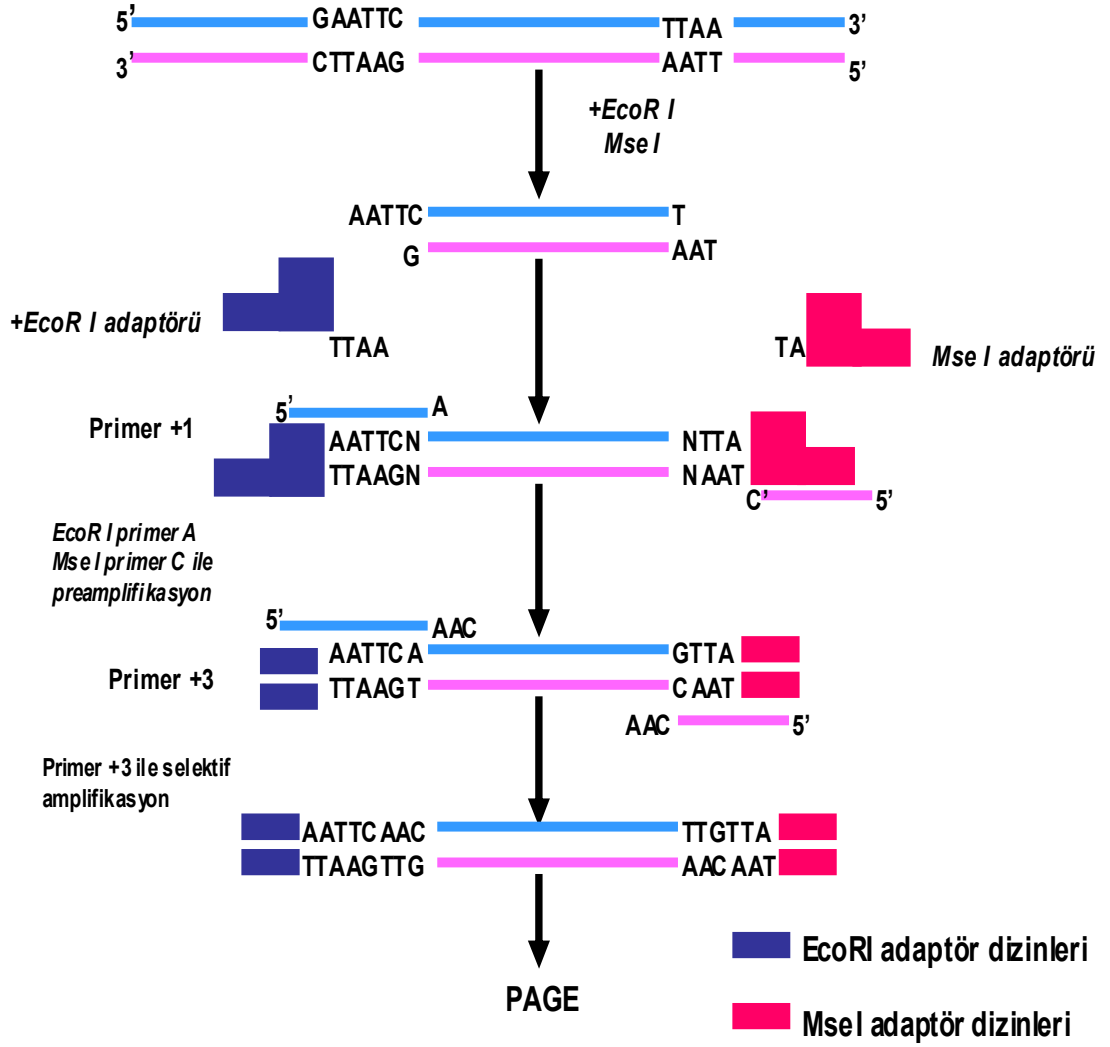
Şekil 2.4. RAPD Analiz Aşamaları

**AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir (**Yıldırım ve ark., 2001**).

1. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (EcoRI/MseI) ve biyotinle işaretlenmiş 2 adaptör kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin uygun bir DNA ligaz ile birleştirilmesi,
2. Ligaz edilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu (**Şekil 2.5.**),
3. Bu fragmentlerin özel oluşturulan ve radyoaktif işaretlenmiş primerlerle gerçek amplifikasyonu ve PAGE (poliakrilamid jel elektroforez) de koşulmasıdır (**Ergül, 2000**).

Polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolaydır. Kuruluş aşamasında maliyet gerektirir (**Walton, 1993**). Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır (**Maughan ve ark., 1995**).



Şekil 2.5. AFLP Analiz Aşamaları

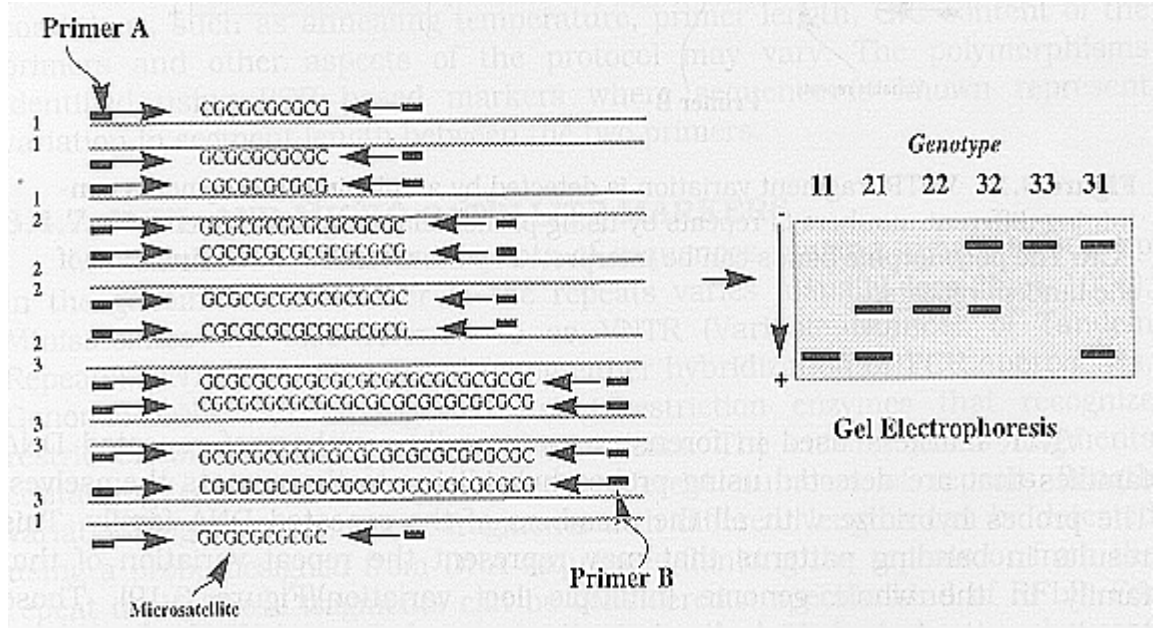
**SSR (Simple Sequence Repeat)**

SSR (Simple Sequence Repeat) markırları ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır (**Hamada ve ark., 1982; Weber, 1990**). *Citrus*'larda iki, üç ve dört nükleotidlik mikrosatellit dizileri bulunmuştur (**Kijas ve ark., 1995**).

Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucunda farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir (**Yıldırım ve ark., 2001**).

Bitkiler aleminde ilk çalışmalar tarla bitkileri ile olmuş soya, pirinç, arpa ve buğday gibi bitkiler ile oldukça yakın zamanda SSR'ların karakterizasyonu bahçe bitkileri türlerinde üzüm bitkisinde başlamıştır (**Aka-Kaçar, 2001**).

Mikrosatellitler kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilen bir moleküler belirleyici grubudur. Mikrosatellitler ile ilgili en belirgin dezavantaj ise bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir (**Büyükunal-Bal, 2003**).



Şekil 2.6. SSR Analiz Aşamaları (Anonim, 2005)

## 2.2. *Aurantioideae* Altfamilyası ile İlgili Yapılan Taksonomik Çalışmalar

*Citrus* cinsi ve bu cinsin *Aurantioideae* alt familyasında yer alan yakın akraba cinslerinin taksonomik ayrımı uzun zamandır karmaşa ve tartışma kaynağı olmuştur. Bu nedenle, uzun zamandan beri bu karmaşık yapı giderilememiş olup günümüzde de tartışmalar devam etmektedir. Bu taksonomik sorun sadece türlerarası melezlemelerde değil aynı zamanda cinsler arası melezlemelerle çok daha fazla karmaşık bir yapı kazanmıştır.

*Citrus* cinsi içerisinde türlerin ayrımını güçleştiren belli başlı etkenler şunlardır (Esen ve Geraci, 1976) :

- Tür içi ve türler arası melezleme durumunda etkin bir yeniden üreme mekanizmasının bulunmaması,
- Adventif nüseller embriyoni yoluyla melezleme, açılma ve mutasyondan doğan değişikliğin korunması,

Bu tartışmayı çözmek için yapılan girişimler Linneaus 1753'e kadar uzanmaktadır. Linneaus o zamanlarda Avrupa'da bilinen *Citrus* tür ve çeşitlerine



dayalı olarak yaptığı taksonomik çalışmasında, *Citrus* cinsi için 3 tür *C.medica* (ağaç kavunu, limon ve laymlar), *C.aurantium* (portakal ve turunçlar) ve *C.grandis* (şadoklar) önermiştir (Swingle, 1967).

**Risso (1813)**, 8 turunçgil türünü kabul etmiş, 1818-1822 yılları arasında yaptığı bir çalışmada bu sayıyı 42'ye yükseltmiştir. **Hooker (1875)**, turunçgilleri 13 cins - 43 tür içinde sınıflamış; **Bonavia (1888)**, turunçgil tür ve çeşitlerinin çizimlerini yaparak taksonomik gelişmelere katkıda bulunmuştur. **Engler (1896)**, önceleri tüm dünyadaki turunçgil türlerinin sayısını 6 olarak belirlerken, 1931 yılında bu sayıyı 11'e çıkarmıştır. **Lushington (1910)**, *citrus* cinsine giren tüm kültüre alınmış varyeteler için 21 farklı bilimsel isim koymuştur (Swingle, 1967).

Yakın zamanlarda, turunçgil taksonomisinde 2 ana sistem gelişmiştir. Bunlar, Swingle ve Tanaka'nın geliştirdiği sistemlerdir. Her iki taksonomik çalışma uzun yıllar boyunca yapılan araştırmalara dayanmaktadır. Her iki araştırmacı da her ne kadar 1915-1930 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya'da değişik zamanlarda bir araya gelerek işbirliği yapmışlarsa da taksonomik açıdan farklı görüşlere sahip olmuşlardır. **Swingle (1943)**, *Citrus* cinsi için 2 altcins (*Eucitrus* ve *Papeda*) ve bunlara ait 16 tür önerirken; **Tanaka (1969)**, 2 alt cins (*Archicitrus* ve *Metacitrus*) ve bunlara ait 159 türün varolduğunu belirtmektedir (Swingle, 1967 ; Davies and Albrigo, 1994).

Swingle, bilinen türlerin morfolojik özelliklerini gösteren formların tür olarak tanımlanmadan önce melez olmadıklarının doğrulanması gerektiğini belirtmektedir. Bu görüş, bir taksonomik sistem içerisinde olası değişimleri en aza indirmek gibi bir avantaja sahiptir. **Hodgson (1965)**, Swingle tarafından kabul edilen 16 türü geliştirerek bunu 36 türe çıkarmış ve bu türler **Çizelge 2.1.** de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Swingle ve Hodgson Tarafından Kabul Edilen Turunçgil Sistematigi  
(Davies and Albrigo, 1994).

---

**Cins : CITRUS**

---

**Altains : EUCITRUS**

---

*Citrus medica* (Ağaç kavunu)  
*Citrus limon* (Limon)  
*Citrus aurantifolia* (Laym)  
*Citrus sinensis* (Turunç)  
*Citrus reticulata* (Mandarin)  
*Citrus grandis* (Şadok)  
*Citrus paradisi* (Altıntop)  
*Citrus indica*  
*Citrus tachibana*

---

**Altains : PAPEDA**

---

*Citrus ichangensis*  
*Citrus micrantha*  
*Citrus latipes*  
*Citrus macroptera*  
*Citrus hystrix*  
*Citrus celebica*

---

**EUCITRUS ALT CİNSİNE GİREN EK 20 TÜR**

---

*Citrus limettoides* (Filistin tatlı laymı)  
*Citrus latifolia* (Tahiti laymı)  
*Citrus bergamia* (Bergamot)  
*Citrus jambhiri* (Kaba limon)  
*Citrus limetta* (Akdeniz tatlı laymı)  
*Citrus myrifolia* (Çin turuncu)  
*Citrus junos* (Yuzu)  
*Citrus nobilis* (King mandarini)  
*Citrus unshiu* (Satsuma mandarini)  
*Citrus deliciosa* (Yerli mandarin)  
*Citrus tangerina* (Tangerin)  
*Citrus reshni* (Cleopatra mandarin)  
*Citrus madurensis* (Kalamondin)  
*Citrus sunki* (sunki mandarini)  
*Citrus natsudaiai*  
*Citrus maderaspatana*  
*Citrus karna*  
*Citrus pennivesiculata*  
*Citrus macrophylla*  
*Citrus limonia* (Rangpur laymı)

Tanaka temelde, Swingle gibi aynı türleri benimsemekle beraber, her bir türü daha dar bir kavramla ele alarak bunlarla ilişkili tiplere, melez olarak bilinseler de ek özel adlar vermiştir. Tanaka botanik çeşit yada melez olarak bilinen birçok formlara tür statüsünü vermektedir. Tür sayısının bu gibi üretkenliğinin doğrulanması tartışmalı ise de *Citrus* cinsi içindeki tür kavramının net bir tanımı eksik kalmaktadır. Tanaka'nın sistemi bir çok turunçgil türü bakımından morfolojik tanımlamalar sağlamaktadır (Seker, 1999). Tanaka sistematğinde yer alan türler Çizelge 2.2 de yer almaktadır.

**Çizelge 2.2.** Tanaka Tarafından Kabul Edilen Turunçgil Sistematığı (Swingle, 1967)

|                                          |
|------------------------------------------|
| <b>Cins: CITRUS</b>                      |
| <b>I. Altıns ARCHICITRUS</b>             |
| <b>Papeda – Acutifolia (6 tür)</b>       |
| <i>Citrus macroptera</i>                 |
| <i>Citrus celebica</i>                   |
| <i>Citrus southwickii</i>                |
| <i>Citrus micrantha</i>                  |
| <i>Citrus boholensis</i>                 |
| <i>Citrus vitiensis</i>                  |
| <b>Papeda – Obtusifolia (3 tür)</b>      |
| <i>Citrus hystrix</i>                    |
| <i>Citrus balincolong</i>                |
| <i>Citrus westeri</i>                    |
| <b>Papeda – Longipetiola (3 tür)</b>     |
| <i>Citrus latipes</i>                    |
| <i>Citrus kerrii</i>                     |
| <i>Citrus combara</i>                    |
| <b>Limonellus – Eulimonellus (4 tür)</b> |
| <i>Citrus aurantifolia</i>               |
| <i>Citrus latifolia</i>                  |
| <i>Citrus limettoides</i>                |
| <i>Citrus webberi</i>                    |
| <b>Limonellus – Megacarpa (12 tür)</b>   |
| <i>Citrus bergamia</i>                   |
| <i>Citrus davaoensis</i>                 |
| <i>Citrus javanica</i>                   |
| <i>Citrus papaya</i>                     |
| <i>Citrus ovata</i>                      |

*Citrus observa*  
*Citrus pseudolimonum*  
*Citrus macrophylla*  
*Citrus longispina*  
*Citrus hyalopulpa*  
*Citrus pennivesiculata*  
*Citrus semperflorens*

---

**Limonellus – Pseudopapeda (2 tür)**

---

*Citrus excelsa*  
*Citrus montana*

---

**Citrophorum – Citrioides (5 tür)**

---

*Citrus medica*  
*Citrus limonimeditica*  
*Citrus odorata*  
*Citrus nana*  
*Citrus alata*

---

**Citrophorum – Limonioides (6 tür)**

---

*Citrus limon*  
*Citrus limonia*  
*Citrus limetta*  
*Citrus jambhiri*  
*Citrus longilimon*  
*Citrus pseudolimon*

---

**Citrophorum – Decumanoides (13 tür)**

---

*Citrus aurata*  
*Citrus pyriformis*  
*Citrus balotina*  
*Citrus megaloxycarpa*  
*Citrus karna*  
*Citrus lumia*  
*Citrus mellarosa*  
*Citrus peratta*  
*Citrus rissoi*  
*Citrus assamensis*  
*Citrus duttae*  
*Citrus macrolimon*  
*Citrus sarbati*

---

**Cephalocitrus – Decumana (6 tür)**

---

*Citrus grandis*  
*Citrus truncata*  
*Citrus pseudograndis*  
*Citrus pseudogulgul*  
*Citrus suizabon*  
*Citrus panuban*

---

**Cephalocitrus – Intermedia – Flavicarpa (9 tür)**

---

*Citrus paradisi*  
*Citrus glaberrima*  
*Citrus aurantiaca*  
*Citrus hiroshimana*  
*Citrus mitsuharu*  
*Citrus omikanto*  
*Citrus pseudoparadisi*  
*Citrus tosa – asahi*  
*Citrus flavicarpa*

---

**Cephalocitrus – Intermedia – Aureocarpa (6 tür)**

---

*Citrus intermedia*  
*Citrus asahikan*  
*Citrus kotokan*  
*Citrus hassaku*  
*Citrus iwaikan*  
*Citrus tengu*

---

**Aurantium – Medioglobosa (16 tür)**

---

*Citrus medioglobosa*  
*Citrus natsudaikai*  
*Citrus obovoidea*  
*Citrus otachibana*  
*Citrus ampullacea*  
*Citrus yuge – hyokan*  
*Citrus yamabuki*  
*Citrus sulcata*  
*Citrus himekitsu*  
*Citrus anonyma*  
*Citrus taiwanica*  
*Citrus iriomotensis*  
*Citrus rugulosa*  
*Citrus miaray*  
*Citrus papillaris*  
*Citrus pseudo – papillaris*

---

**Aurantium – Aurantioides – Racemosa (6 tür)**

---

*Citrus autantium*  
*Citrus myrifolia*  
*Citrus rokugatsu*  
*Citrus maderaspatana*  
*Citrus yanbarusensis*  
*Citrus neo – autantium*

---

**Aurantium – Aurantioides – Contracta (1 tür)**

---

*Citrus canaliculata*

---

**Aurantium – Sinensioides (7 tür)**

---

*Citrus sinensis* *Citrus sinograndis*  
*Citrus funadoko*

*Citrus tankan*

*Citrus temple*

*Citrus iyo*

*Citrus oblonga*

---

**Aurantium – Osmocitrioides – Tenuicarpa (3 tür)**

---

*Citrus tamurana*

*Citrus ujukitsu*

*Citrus luteo – turgida*

---

**Aurantium – Osmocitrioides – Compacta (1 tür)**

---

*Citrus aurea*

---

**Aurantium – Osmocitrioides – Paranobilis (1 tür)**

---

*Citrus shunkokan*

---

**II. Altciins METACITRUS**

---

---

**Osmocitrus – Protosmocitrus (1 tür)**

---

*Citrus ichangensis*

---

**Osmocitrus – Euosmocitrus (9 tür)**

---

*Citrus junos Citrus hanaju*

*Citrus sudachi*

*Citrus inflata*

*Citrus yuko*

*Citrus takuma – sudachi*

*Citrus pseudo – aurantium*

*Citrus wilsonii*

*Citrus sphaerocarpa*

---

**Osmocitrus – Pseudoacrumen (1 tür)**

---

*Citrus nippokorena*

---

**Acrumen – Euacrumen (3 tür)**

---

*Citrus nobilis*

*Citrus unshiu*

*Citrus yatsushiro*

---

**Acrumen – Microacrumen – Anisodora (4 tür)**

---

*Citrus keraji*

*Citrus oto*

*Citrus tarogayo*

*Citrus inflato – rugosa*

---

**Acrumen – Microacrumen – Citriodora – Megacarpa (13 tür)**

---

*Citrus reticulata*

*Citrus clementina*

*Citrus tangerina*

*Citrus delicoisa*

*Citrus genshokan*

*Citrus benikoji*

*Citrus succosa*

*Citrus platymamma*

*Citrus paratangerina*  
*Citrus crenatifolia*  
*Citrus suhuiensis*  
*Citrus tardiferax*  
*Citrus suavissima*

---

**Acrumen – Microacrumen – Citriodora – Microcarpa – Angustifolia (10 tür)**

---

*Citrus tachibana*  
*Citrus sunki*  
*Citrus reshni*  
*Citrus tardiva*  
*Citrus indica*  
*Citrus erythrosa*  
*Citrus kinokuni*  
*Citrus ponki*  
*Citrus oleocarpa*  
*Citrus pseudo – sunki*

---

**Acrumen – Microacrumen – Citriodora – Microcarpa – Latifolia (6 tür)**

---

*Citrus depressa*  
*Citrus leiocarpa*  
*Citrus tumida*  
*Citrus lycopersicaeformis*  
*Citrus amblycarpa*  
*Citrus hainanensis*

---

**Pseudofortunella (1 tür)**

---

*Citrus madurensis*

3. büyük grup ise **Barret ve Rhodes (1976)** , **Scora (1975)** 146 sayısal fenotipik özellik ve izoenzim analizlerine dayanarak turunçgilleri iki ana gruba ayırmaktadır.

**1.Grup**

- Turunç (*Citrus aurantium*)
- Şadok (*Citrus grandis*)
- Altıntop (*Citrus paradisi*)
- Mandarin (*Citrus reticulata*)
- Portakal (*Citrus sinensis*) olmak üzere 5 türü,

**2.Grup**

- Laym (*Citrus aurantifolia*)
- Limon (*Citrus lemon*)
- Ağaç kavunu (*Citrus medica*) olmak üzere 3 tür'ü kapsamaktadır.

Bu araştırmacılar ayrıca Ağaç kavunu (*Citrus medica*), Şadok (*Citrus grandis*), ve Mandarin (*Citrus reticulata*) türlerini gerçek tür, diğerlerini ise melez olarak kabul etmektedirler (Green ve ark., 1986; Torres ve ark., 1978; Luro ve ark., 1992; Yamamoto ve ark., 1993).

Çeşitli taksonomistler bu iki ana sistemi yani Swingle'in tutucu ve Tanaka'nın aşırı ayrımcı görüşlerini eleştirerek kendi sistemlerini de oluşturmaya çalışmışlardır. Hangi sınıflandırmanın *Citrus* cinsi içerisindeki türlerin kökenini kesinlikle yansıttığı konusunda bir anlaşma sağlanamamıştır.

Son yıllarda turuncgil taksonomisi içerisindeki karışıklığı gidermek için moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

**2.3. Turuncgillerde Yapılan Moleküler Çalışmalar**

Scora (1975), olasılıkla portakalın mandarin x şadok; altıntopun portakal x şadok; limonun ağaç kavunu x kaba limon veya şadok; laymın ise ağaç kavunu x şadok x *Microcitrus* melezi olduğunu bildirmişlerdir.

Luro ve ark., (1992), RAPD yöntemiyle 3 turuncgil cinsine (*Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*) ait 18 tür ve çeşidinde filogenetik çalışmalar yapmışlardır. *Citrus aurantifolia* Barret ve Rhodes (1976)'a göre *Citrus medica*, *Citrus grandis*, ve *Microcitrus*'un üçlü melezi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak *Citrus medica*'ya yakın bulunmuştur. Turuncun (*Citrus aurantium*) bazı genlerini şadok'tan (*Citrus grandis*) alan bir mandarinden (*Citrus reticulata*) oluştuğu kabul edilmiştir.

Yamamoto ve ark., (1993), *Citrus*, *Fortunella* ve *Poncirus* cinsinde yer alan 28 tür ve çeşidi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemiyle tanımlamışlardır. Bunlar, Mitokondrial DNA analizlerine göre, *Citrus* ağaç kavunu, şadok ve mandarin olmak üzere başlıca 3 gruba; ayrıca şadok grubu şadok ve yuzu



olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. Şadok alt grubu şadok, altıntop, limon, turunç, portakal, *Citrus reticulata*, *C.natsudaidai*, *C. hassaku*, *C. sudachi*, *C. hyuganatsu* ve *C. iyo*'yu kapsamıştır. Yuzu alt grubu, Yuzu (*Citrus junos*) ve Meksika laymını (*Citrus aurantifolia*); mandarin grubu ise mandarin (*Citrus reticulata*) ve portakal X mandarin melezlerini kapsamıştır. *Poncirus* cinsi, *Citrus* ve *Fortunella*'dan uzak bulunmuş; bununla beraber, *Fortunella* cinsinin mitokondrial genomu Yuzu ve layma benzer olduğu için *Citrus*'dan ayırlanamamıştır. Kloroplast DNA analizlerinde ise, 2 grup oluşmuştur. *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, ağaç kavunu, Yuzu, Kalamodin ve mandarin grubuna dahil edilen çeşitler benzer fragment örneğini gösterirken, şadok alt grubundakiler ve laym diğer fragment örneğini göstermiştir.

**Deng ve ark., (1995)**, RAPD markırları ile limon mutantları arasında yaptığı tanımlamada Interdonato limon çeşidinin genetik olarak diğer limonlardan uzak olduğunu, diğer limonlar arasında ise yüksek düzeyde benzerlik bulunduğunu saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, yeni turunçgil çeşitlerin elde edilmesi için tanımlanması gerektiğini vurgulamışlardır.

**Machado ve ark., (1996)**, 39 Akdeniz (yerli) mandarini genotipinde polimorfizm ve genetik benzerliği RAPD markırlarıyla araştırmışlar ve genotipler arasında düşük genetik varyasyon olsa dahi RAPD markırlarıyla genetik polimorfizmin saptanabileceğini ortaya koymuşlardır.

**Fang ve Roose (1997)**, 22 primerle ISSR markırları kullanılarak 68 turunçgil çeşidini ayırt etmeye çalışmışlardır. Farklı turunçgil türleri çok farklı parmak izi örnekleri vermiştir. Mutasyon sonucunda seçilmiş olan 33 portakaldan 14 ve 7 altıntoptan 1 tanesi ayırt edilebilmiştir. 6 limon çeşidinden 5 tanesi ISSR yöntemiyle ayırt edilmiştir. Mandarin çeşitleri arasında birçok farklılık bulunmakla birlikte, analizi yapılan 5 Satsuma çeşidi arasında farklılık saptanamamıştır. Bu yöntemle 5 sitranj çeşidi ayırt edilebilmiş, fakat Carrizo sitranjı ile Troyer arasındaki farklılık belirlenememiştir.

**Federici ve ark., (1998a)**, 6 cins ve 45 tür ve yapay melezinden oluşan 88 turunçgil genotipi arasındaki ilişkileri RFLP yöntemini, 32 *Citrus* ve *Microcitrus* ise RAPD yöntemi kullanılarak saptamışlardır. Araştırmacılar, iki yöntemin benzer sonuçlar verdiğini ve ayrıca, Şadok (*Citrus maxima*) ile *Citrus hongheensis* ve *Citrus*

*latipes* arasında yakın akrabalık bulunduğunu saptamışlardır. Yalnızca melez olmayan genotip sınılandığında *Citrus medica* ve *Citrus indica* aynı salkımda yer almış; bütün türler dikkate alındığında ise, *Citrus medica* limon, laym ve akrabaları arasında yer almıştır. Mandarinler hem kendi içerisinde hemde diğer türler arasında güçlü bir gruplandırma göstermemiş; fakat birkaç çeşit farklı türlerin bulunduğu gruba girmiştir.

**Federici ve ark., (1998b)**, 45 Citrus türünden 73 ve akraba turunçgil'den 12 tür ve çeşitte RFLPs yöntemini kullanarak turunçgiller içerisinde yer alan türlerin kökenlerini bulmaya çalışmışlardır. Araştırmacılar, bergamotun (*Citrus bergamia*) turunç (*Citrus aurantium*) x Akdeniz tatlı laymı (*Citrus limetta*) türlerinin melezlemesinden oluştuğunu, Rangpur laymının (*Citrus limonia*) ise 6 mandarin türünün herhangi birisi ile Meksika laymı (*Citrus aurantifolia*) veya Makrofilla (*Citrus macrophylla*) türlerinin melezi olduğunu belirtmişlerdir.

**Novelli ve ark., (1998)**, 31 portakal çeşidinde Mikrosatellite markırları kullanarak 18 primerle çeşitleri değerlendirmeye çalışmışlar; ancak turunçgil tür ve akrabalarında başarılı sonuçlar veren bu yöntemle çeşitler arasında polimorfizm saptamaları olanağı bulunmamıştır. Araştırmacılar, portakalda görüldüğü gibi düşük oranda polimorfizm gösteren vejetatif çoğaltılan türlerdeki çalışma için bu moleküler marker tiplerinin uygun olmadığını ve portakalda yeni mikrosatellite primerlerinin geliştirilmekte olduğunu bildirmişlerdir.

**Targon ve ark., (1998)**, RAPD yönteminin çeşitler arasındaki farklılıkları belirlemek için birçok bitkide kullanıldığını, fakat kendilerinin 122 portakal çeşidinde yaptıkları çalışmada bunu sağlayamadıklarını ve daha duyarlı başka tekniklere de gereksinim olduğunu belirtmişlerdir.

**Coletta ve ark., (2000)**, 35 mandarin grubunda genetik benzerliği belirlemek için RAPD markırlarını kullanmışlardır. 23 adet RAPD primeri kullanarak 109 bant elde edilmiştir. Elde edilen bu bantların 45 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar mandarin grubunda genetik benzerliğin yüksek olduğunu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mandarin diğer gerçek turnunçgil türleriyle arasındaki genetik benzerlik oranı ağaç kavunu (*Citrus medica L.*) ve şadok (*Citrus grandis Osbeck*) çok daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar aslında bazı taksonomik

çalışmalarda önerildiği gibi, bir çok türden ziyade, genetik olarak farklı bireyler ve birçok melezden oluşan tek tür olduğunu (*Citrus reticulata* Blanco) kabul etmişlerdir.

**Nicolosi ve ark., (1999)**, *Citrus* cinsine ait 36 ve *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* ve *Eremocitrus* cinslerine ait birer türde RAPD, SCAR ve cpDNA markırlarıyla turunçgillerin filogenisini araştırmışlardır. *Fortunella*'nın *Citrus* cinsine yakın, diğerlerinin *Citrus* cinsinden ve birbirlerinden uzak olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar Swingle sistematğinde olduğu gibi, *Citrus* cinsinde *Eucitrus* ve *Papeda* olmak üzere 2 altgrup oluştuğunu, fakat *Citrus celebica* ve *Citrus indica*'nın bu gruplarda yer almadığını belirtmişlerdir. *Citrus* cinslerinde yer alan hemen hemen bütün türler 3 alt gruba dağılmıştır. Gerçek Turunçgil Grubu'nda yer alan her genotip ve tür kendi cinsi içerisinde yer almıştır. Farklı filogenetik ilişkiler cpDNA verileriyle ayrıca ortaya konmuştur. *Eucitrus* ve *Papeda* alt cinsine ayırım ortadan kaldırılarak, *Citrus* cinsi Tanaka tarafından *Archicitrus* ve *Metacitrus* olmak üzere 2 alt cinse ayrılmıştır. *Citrus medica* ve *Citrus indica* diğer *Citrus*'lardan oldukça uzak bulunmuştur. Limon ve Filistin tatlı laymı *Citrus latipes* salkımında liderlik eden Şadok salkımında yer almıştır. *Citrus aurantifolia* ise *Micrantha* salkımına yerleşmiştir. Ayrıca, genetik köklerine göre 17 tür ve çeşidin genetik orijini araştırılmıştır. Limonunun ağaç kavunu x turunç; Rangpur laymı ve kaba limonun ise ağaç kavunu x mandarin melezi olduğu varsayılmıştır. Diğer yandan, elde edilen verilere göre Meksika laymı için *Citrus micrantha*'nın ana ve *Citrus medica*'nın baba olduğu bildirilmiştir.

**Ruiz ve ark., (2000)**, izoenzim ve SSR yöntemi ile 46' sını *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. var 'Flaying Dragon' X Ortanique (Tangor) [(*C. reticulata* (Blanco) X *C. sinensis* (L.))] melezi ve 106' sını *Fortunella crassifolia* Swing. genotipi olmak üzere toplam 152 genotipte nüseller ve zigotik embriyo tanımlamasını yapmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde izoenzim analizlerinde yeterli polimorfizm görülmesine rağmen, SSR yönteminin izoenzim yöntemine göre daha hızlı ve etkili olduğunu belirtmişlerdir.

**Coletta ve ark., (2000)**, 25 RAPD primeri kullanarak 19 Ponkan mandarin çeşidinde genetik çeşitliliği araştırdıkları bu çalışmada, 25 RAPD primerinin 112

bant ürettiğini ve bunun 32 tanesinin 5 çeşit içinde polimorfik olduğunu, diğer 14 çeşitte ise genetik farklılığın bulunmadığını, bunda 14 çeşidin ya farklı lokal isimlerle klonal çoğaltıldığını ya da nokta mutasyonları gibi özellikleri saptamada yetersiz olan RAPD yönteminin genetik çeşitliliği saptayamadığını bildirmişlerdir.

**Gülşen ve ark., (2001a)**, 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 ilişkileri saptamak amacı ile izoenzimleri, ISSR (inter-simple sequence repeats) ve SSR (microsatellite) markırlarını kullanmışlardır. Çalışılan limonlar arasında izoenzimler çok az varyasyon gösterirken 8 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. Araştırmacılar bu nedenle 48 limonun çok fazla genetik değişiklikleri içermeyen klonal ebeveynlerden mutasyonlar sonucu oluştuğunu savunmuşlardır. Ağaç kavunlarının limon, kaba limon, tatlı laym ve tatlı limonların çekirdek DNA'larının büyük bölümünü oluşturduğu, ISSR markırları kullanılarak tespit edilmiştir. Limonlardan 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.

**Yeşilöglü T., (2002)**, Turunçgil cins, tür ve akrabalarından oluşan 30 adet türün RAPD yöntemiyle tanımlanarak turunçgil sistematikteki yerinin belirlenmesi ve türlerin birbirlerine genetik uzaklığının saptanması amacıyla yaptıkları bu çalışmada 10 RAPD primeri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda ; Turunçgil cins, tür ve akrabaları arasındaki polimorfizm oranı 0.26-0.85 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. 'İlkel Turunçgil Grubu'nda yer alan *Pleiospermium alatum* ve *Severinia buxifolia* ile 'Gerçek Turunçgil Grubu'nda yer alan *Citrus*, *Fortunella* ve *Microcitrus* cinslerine ait türler arasındaki polimorfizmin genel olarak yüksek

bulunduğunu, ‘İlkel Turunçgil Grubu’nda yer alan *Pleiospermium alatum* ile ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *Citrus micrantha* türleri arasındaki polimorfizm oranının denemeye alınan türler içerisinde en yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. *Pleiospermium alatum* ile Yakın Turunçgil Grubu içerisinde yer alan *Citropsis gilletiana* arasındaki polimorfizmde yüksek olduğu saptamışlardır. En düşük polimorfizm oranı ise ‘Gerçek Turunçgil Grubu’nda yer alan *Citrus limonia* ve *Citrus pennivesiculata* türleri arasında olduğunu belirlemişlerdir.

**Corazza-Nunes ve ark., (2002)**, RAPD ve SSR yöntemleri ile 38 altıntop (*C. paradisi* Macf.) ve 3 şadok (*C. maxima* (Burm.) Merr.) çeşitlerinin genetik farklılıklarını ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada 21 RAPD ve 5 SSR primeri kullanarak 41 çeşidi 2 temel grupta toplamışlardır.

**Oliveira ve ark., (2002)**, Yaprak ucu morfolojisi (LAM; Leaf Apex Morphology) ve SSR yöntemleri ile Murcot [(*C. reticulata* (Blanco) X *C. sinensis* (L.) Osb.) X Pera [*C. sinensis* (L.) Osb.]]’nın kontrollü melezlenmesi ile elde edilen melezlerin nüseller bitkileri tespit etmişlerdir. Melezler öncelikle LAM yöntemi kullanılarak gözlemsel olarak sınıflanmıştır. Daha sonra genotipleri SSR yöntemi ile analiz etmişlerdir. LAM yöntemi ile elde edilen yüksek hibrit oranı, SSR analizleri sonucunda düşmüştür. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak; sadece LAM gözlemsel sonuçlarının genotip tanımlamada yetersiz olduğu ve tanılama çalışmalarında moleküler markır sistemleriyle birlikte kullanılması gerektiğini önermişlerdir.

**Pang ve ark., (2003)**, SSR DNA markırları kullanarak, *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eromocitrus*, *Atlantia* cinslerine ait 29 genotipte genetik akrabalığı saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, 7 SSR primeri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda 16,3 allel/primer olmak üzere toplam 114 polimorfik allel saptanmış ve ‘Neighbour-joining’ yöntemi ile yapılan kümeleme analizi sonucunda *Microcitrus*’un *Citrus*’a yakın, *Poncirus*’un ise *Citrus*’a uzak olduğunu, bundan dolayı da *Poncirus*’un *Citrus*’tan türememiş olabileceğini bildirmişlerdir.

**Koehler-Santos ve ark., (2003)**, 37 mandarin çeşidini morfolojik ve moleküler markırlar kullanarak karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada 9 SSR primeri kullanmışlar ve bunların 8’inde polimorfik bant elde

etmişler. Mandarin genotiplerini morfolojik olarak 4 ana grupta, SSR markırları kullanarak ise 3 ana grup'ta toplamışlardır.

**Mariniello ve ark., (2004)**, 44 RAPD primeri kullanarak, Güney İtalya'nın Campania bölgesinde yetiştirilen 10 limon çeşidini tanımlamak için yaptıkları araştırmada, 4 limon çeşidinin (Sorrento, Procida, Amalfi ve Gloria d'Amalfi) test edilen 44 RAPD primer içersindeki 5 RAPD primerin kullanılmasıyla birbirlerinden başarılı bir şekilde kolaylıkla ayırt edilebildiğini rapor ederek, RAPD teknolojisinin çeşitlerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişler.

**Aka-Kaçar ve ark., (2005)**, RAPD yöntemi ile uç kurutan (*Phoma tracheiphila*) hastalığına dayanıklı veya tolerant olarak belirlenmiş olan toplam 16 limon genotipin moleküler tanılamasını yapmışlardır. Çalışmada kullanılan 100 primer içersinden 48 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Çalışmada tüm genotiplerin birbirinden farklılıkları ortaya konulmuştur. Ancak Tuzcu 896 ve Tuzcu 897 genotipleri RAPD yöntemi ile birbirinden ayıramadığı gözlenmiştir.

## 3.MATERYAL VE METOD

## 3.1. Bitkisel Materyal

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonu” içerisinde yer alan 88 turunçgil ve akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tipler’den belirlenmiş ve detayları verilmiş olan bitkisel materyaller kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılacak Bitkisel Materyal

| SOY               | ALTSOY                                   | CİNS                  | TÜR                                                       |
|-------------------|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Clauseneae</i> | <i>Micromelinae</i>                      | <i>Micromelum</i>     | -                                                         |
|                   | <i>Clauseninae</i>                       | <i>Glycosmis</i>      | <i>Glycosmis pentaphylla</i>                              |
|                   |                                          | <i>Clausena</i>       | <i>Clausena lansium</i><br><i>Clausena excavata</i>       |
|                   |                                          | <i>Murraya</i>        | <i>Murraya paniculata</i>                                 |
|                   | <i>Merrillinae</i>                       | <i>Merrillia</i>      | -                                                         |
| <i>Citreae</i>    | <i>Triphasiinae</i>                      | <i>Wenzelia</i>       | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Monanthocitrus</i> | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Oxanthera</i>      | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Merope</i>         | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Triphasia</i>      |                                                           |
|                   |                                          | <i>Pamburus</i>       | <i>Pamburus missionis</i>                                 |
|                   |                                          | <i>Luvunga</i>        | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Paramignya</i>     | -                                                         |
|                   | <i>Balsamocitrinae</i>                   | <i>Swinglea</i>       |                                                           |
|                   |                                          | <i>Aegle</i>          | <i>Aegle marmelos</i>                                     |
|                   |                                          | <i>Afraegle</i>       |                                                           |
|                   |                                          | <i>Aeglopsis</i>      | <i>Aeglopsis chevalieri</i>                               |
|                   |                                          | <i>Balsamocitrus</i>  | <i>Balsamocitrus dawei</i>                                |
|                   |                                          | <i>Feronia</i>        | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Feroniella</i>     | -                                                         |
|                   | <i>Citrinae</i><br>(İlkel Turunçgiller)  | <i>Severinia</i>      | <i>Severinia buxifolia</i>                                |
|                   |                                          | <i>Pleiospermium</i>  | <i>Pleiospermium alatum</i>                               |
|                   |                                          | <i>Burkillanthus</i>  | -                                                         |
|                   |                                          | <i>Limnocitrus</i>    |                                                           |
|                   |                                          | <i>Hesperethusa</i>   | <i>Hesperethusa crenulata</i>                             |
|                   | <i>Citrinae</i><br>(Yakın Turunçgiller)  | <i>Citropsis</i>      |                                                           |
|                   |                                          | <i>Atalantia</i>      | <i>Atalantia ceylanica</i>                                |
|                   | <i>Citrinae</i><br>(Gerçek Turunçgiller) | <i>Fortunella</i>     | <i>Fortunella japonica</i><br><i>Fortunella margarita</i> |

| SOY     | ALTSOY                            | CİNS               | TÜR                                      |
|---------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------------|
| Citreae | Citrinae<br>(Gerçek Turunçgiller) | <i>Eremocitrus</i> | <i>Eremocitrus glauca</i>                |
|         |                                   | <i>Poncirus</i>    | <i>Poncirus trifoliata</i> var “Benecke” |
|         |                                   | <i>Clymenia</i>    | -                                        |
|         |                                   | <i>Microcitrus</i> | <i>Microcitrus australasica</i>          |
|         |                                   | <i>Citrus</i>      | <i>Citrus amblycarpa</i>                 |
|         |                                   |                    | <i>Citrus ampullacea</i>                 |
|         |                                   |                    | <i>Citrus assamensis</i>                 |
|         |                                   |                    | <i>Citrus aurantium</i>                  |
|         |                                   |                    | <i>Citrus benikoji</i>                   |
|         |                                   |                    | <i>Citrus bergamia</i>                   |
|         |                                   |                    | <i>Citrus canaliculata</i>               |
|         |                                   |                    | <i>Citrus celebica</i>                   |
|         |                                   |                    | <i>Citrus davaoensis</i>                 |
|         |                                   |                    | <i>Citrus depressa</i>                   |
|         |                                   |                    | <i>Citrus excelsa</i>                    |
|         |                                   |                    | <i>Citrus hassaku</i>                    |
|         |                                   |                    | <i>Citrus hanaju</i>                     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus hiroshima</i>                  |
|         |                                   |                    | <i>Citrus intermedia</i>                 |
|         |                                   |                    | <i>Citrus indica</i>                     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus iyo</i>                        |
|         |                                   |                    | <i>Citrus junos</i>                      |
|         |                                   |                    | <i>Citrus karna</i>                      |
|         |                                   |                    | <i>Citrus keraji</i>                     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus konejime</i>                   |
|         |                                   |                    | <i>Citrus latipes</i>                    |
|         |                                   |                    | <i>Citrus leiocarpa</i>                  |
|         |                                   |                    | <i>Citrus limon</i> var. “Kütdiken”      |
|         |                                   |                    | <i>Citrus lumia</i>                      |
|         |                                   |                    | <i>Citrus maderaspatana</i>              |
|         |                                   |                    | <i>Citrus maxima</i> var “ Reinking”     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus meyeri</i>                     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus miaray</i>                     |
|         |                                   |                    | <i>Citrus micrantha</i>                  |
|         |                                   |                    | <i>Citrus montana</i>                    |
|         |                                   |                    | <i>Citrus moi</i>                        |
|         |                                   |                    | <i>Citrus myrtifolia</i>                 |



| SOY            | ALTSOY                                   | CİNS          | TÜR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Citreae</i> | <i>Citrinae</i><br>(Gerçek Turunçgiller) | <i>Citrus</i> | <i>Citrus natsudaidai</i><br><i>Citrus nextour</i><br><i>Citrus nobilis</i><br><i>Citrus nippokorena</i><br><i>Citrus obovoidea</i><br><i>Citrus paradisi</i> var. "Marsh seedless"<br><i>Citrus clementina</i><br><i>Citrus reticulata</i> var."Fremont"<br><i>Citrus reshni</i><br><i>Citrus rokugatsu</i><br><i>Citrus rugulosa</i><br><i>Citrus succosa</i><br><i>Citrus shunkokan</i><br><i>Citrus sinensis</i> var. "Hamlin"<br><i>Citrus sinograndis</i><br><i>Citrus sulcata</i><br><i>Citrus sunki</i><br><i>Citrus sudachi</i><br><i>Citrus tachibana</i><br><i>Citrus taiwanica</i><br><i>Citrus tamurana</i><br><i>Citrus tardiva</i><br><i>Citrus tosu</i><br><i>Citrus unshiu</i><br><i>Citrus ujukitsu</i><br><i>Citrus webberii</i><br><i>Citrus winter</i><br><i>Citrus yatsushiro</i><br><i>Citrus yuko</i><br>C-32<br>C-35<br>Kobasu<br><i>Casimiroa tetrameria</i><br><i>Citrus sinensis</i> var. "Yafa"<br><i>Citrus sinensis</i> var. "Navelina"<br><i>Ortanique</i><br><i>Citrus aurantifolia</i> var. "West indian"<br><i>Citrus jambhiri</i><br>Rough Lemon |

***Clausena lansium***; Doğal yayılış alanı Çin'in güneydoğusudur. Meyve eti hafif asitli, marmelat gibi hoş bir aromatik tadı vardır. Genellikle taze olarak ayrıca tatlı, reçel ve içecek olarak da tüketilir. Soğuğa karşı oldukça dayanıklıdır. Subtropik bölgelerde yetişir.

***Clausena excavata***; Genellikle ince uzun ağaçlardır. Dalları ince ve tüylüdür. Yapraklar sivri uçlu 3.5-7 cm uzunluğunda koyu yeşil renklidir. Yapraklar ezildiğinde karakteristik baharata benzer bir koku yayılır. Küçük beyaz çiçekler uç

kısımlarda meydana gelir. Bunu 7-10 mm çaplı pembe üzüksü yenilebilir şeffaf meyveler takip eder, her biri 1-2 tohum içerir.

***Glycosmis pentaphylla***; Pink lime, jamaica mandarini gibi isimlerle yaygındır. Yaprak ve çiçek durumları çok çeşitlidir. Yapraklar 1-2 çift yada teklidir. Uzun mızraksı, küt yada sivri uçludur. Tam olarak Filipin'lerin kuzeyi ve kuzeydoğu Australia'nın timor bölgesi, Malay yarımadasının iç bölgeleri ve Hindistan bölgelerinde yayılmaktadır.

***Murraya paniculata***; Küçük ağaçlardır. Yaprakları, eşkenar dörtgen şeklinde 2.75 cm uzunluğunda ve parlaktır. Güzel kokulu beyaz çiçeklere sahiptir. Meyve kırmızımsı oval ve 1/2 cm uzunluğunda yada daha azdır.

***Aegle marmelos***; Küçük yada orta boylu aromatik ve yaprağını belirli mevsimlerde döken ağaçlardır. Ağaç gövdesi ve dallar açık kahverengidir. Dallarda sağlam koltukaltı dikenleri mevcuttur. Yapraklar karşılıklı, soluk yeşil renkli ve tüylüdür. Meyveler sarımsı yeşildir. Yüzeyinde dikdörtgen şeklinde benekler vardır. Tohumlar etin içine gömülmüş ve çok sayıdadır.

***Aeglopsis chevalieri***; Bodur yada küçük ağaçlardır. Dalları çok sayıdadır. Dikenleri tekli ve sivri uçlu'dur. Yapraklar tekli ve orta boyutludur. Yaprak sapları kanatsızdır. Çiçekler küçük ve bileşik salkım şeklinde, tüysüz ve beyazdır. Armut şeklinde meyveler verir. Meyve kabuğu sert, parlak turuncu-kahverengidir.

***Pamburus missionis***; Yapraklar tekli, dikdörtgen şeklindedir. Çok çiçekli ve çiçekler kıvrımlı bir şekildedir. Küçük bir ağaçtır. Tepesi çok gürdür. Dallar yuvarlak, düzgün, parlak yeşildir. Yaşlılarda güçlü keskin dikenler vardır. Bu dikkate değer bitkilerin yaprakları farklıdır. Soluk-gri yeşil renklidirler, kadifemsi dış yüzeyi ve dokulu bir yapısı vardır. *Pamburus missionis*'lerin odunları Hindistan'da mobilya yapımında kullanılır.

***Severinia buxifolia***; Dikenli bodur yada küçük bir ağaçtır. Yaprakları koyu yeşil renklidir. Her bir yaprakta tek dikenler vardır.

***Pleiospermium alatum***; Bu türler Hindistan'ın güney kısmındaki kurak bölgelerde oldukça yaygındır. Meyvelerinin çok acı olduğu söylenir. Kabuk kısımları çok sert ve sarımsıdır. Yaprakları ezildiğinde limon kokusu yayılır.

***Hesperethusa crenulata;*** *Hesperethusa crenulata* yeşil yapraklı, tüylerle kaplı olması ve güzelliğinden dolayı süs bitkisi olarak kullanılır. Bu tür küçük ağaçlardır. Yaygın olarak balta girmemiş ormanlarda yetişir. Dikenler bazen çifttir. Yapraklar çok kısa ve çıkıntılıdır.

***Fortunella margarita;*** *Fortunella margarita*'nın meyveleri küçük oval şeklinde, sulu, hafif tatlıdır. Meyveleri soyulmadan kabuğuyla birlikte yenir. Kabuğu tatlı ve ince'dir. Japonca ismi "Nagami" dir. Herdem yeşildir. *F. margarita*'nın en önemli özelliklerinden birisi yaprakların dala bağlantısının sapsızmış gibi görülmesidir. Dolayısıyla eklem yokmuş gibi bir izlenim verir. Yaprakları tek parçalı ve yaprakların alt ile üst renkleri birbirinden farklıdır. Alt taraf açık yeşil renklidir. Çiçekleri küçüktür.

***Fortunella Japonica;*** Meyveleri yuvarlak şekilli ve hafif soluk renklidir Japonca ismi "Marumi"dir. Tad oval kamkatlara göre tadı biraz daha azdır.

**Üç Yapraklı (*Poncirus trifoliata*) :** Temel özelliği yapraklarının üç parçadan oluşmasıdır. Ağaçları 4-5 m büyüyen küçük ağaçlardır. Meyveleri küçük, üzerleri pürüzlü ve ince tüylerle kaplıdır. Soğuk havalara dayanıklıdır. Meyveleri önce gri renkli olgunlaşınca açık sarı renklidir. Meyve eti acı-ekşidir. Bol miktarda çekirdeklere sahiptir. Kalın, sivri dikenleri vardır. Çiçekleri beyaz, hoş kokuludur. Çeşitli hasatlıklara karşı dayanıklı olması bakımından daha çok anaç olarak kullanılır. *Citrus* cinsi için anaç olarak kullanılan en eski tür'dür.

**Kütdiken;** Türkiye'de üretimi ve depolanması en fazla yapılan çok üstün meyve kalitesine sahip bir çeşittir. Meyve kabuk rengi açık sarı veya limon sarısıdır. Kabuk düzgün ve parlak, meyve etine sıkı bağlıdır. Meyve elips şeklinde'dir. Meyve basına 10.65 adet çekirdek düşmektedir. Yüksek verimlidir ve düzenli meyve verir. Ağaçlar orta kuvvette büyür. Meyvelerin ağaç üzerinde dağılımı düzgündür. Orta mevsim çeşididir. Meyveler depolamaya çok elverişli olması nedeniyle, Kasım başlarında ilk yağmurlardan sonra hasat edilir. Ancak hasat Şubat ayına kadar devam eder. Uygun koşullarda hasat edilen, paketlenen ve depolanan limonlar 9 ay süre ile depolanabilir. Bu özellik Kütdiken limonuna olan istemi artırmaktadır. Ayrıca üstün meyve kalitesi ihracata elverişliliğini artırır. Bu çeşit, Akdeniz bölgesinde özellikle İçel ve Hatay illerinde yaygınlık gösterir.

**West Indian Lime;** Birkaç tane yaygın isim içeren *West Indian Lime* Meksika lime yada key lime olarakta bilinir. Meyveler yuvarlak ve sulu'dur. Meksika Laymı turunçgiller içerisinde en ekşi tada sahip çeşittir. Orta büyüklükte taçlı ağaçlar oluşturlar. Yaprakları küçük, kanatçık belirgindir. Keskin sivri dikenleri vardır. Olgunluk zamanı geçince meyveler dökülür. Tüketiciler laymı yeşil olarak tüketmek ister. Soğuklara çok duyarlı çeşitlerdir. Türkiye'de yetiştirilmez. Meyveyi hasat ettikten sonra muhafazası sonrasında kabuk rengi sarıya dönüşüyor. Meksika laymı en çok Ortadoğu'da kullanılır. Buralarda meyveler kurutulur ve o şekilde tüketilir. Çok özel ve belirgin bir kokusu vardır.

**Citrus aurantium;** (Tuzcu 33-9 turuncu); Akdeniz başta olmak üzere turunçgil üreticisi ülkelerde en çok kullanılan anaçtır. Turunç üzerine aşılı ağaçların meyvelerinin kalitesi mükemmel olmaktadır. Kireçli topraklara dayanıklı olan bu anaç bazı limonlar, Satsuma mandarini ve Kamkatlar haricindeki diğer çeşitlerle genellikle iyi bir uyuşma gösterir. Bu özelliklerinin yanında en büyük dezavantajı *Tristeza* virüs hastalığına çok duyarlı olmasıdır. Turunç, *Phytophthora ssp* (Kök boğazı çürüklüğü) hastalığına genelde dirençli olarak tanımlanmasına rağmen, bazı araştırmacılar bunun her zaman gerçeği yansıtmadığını belirtmektedirler.

**Citrus unshiu;** 1900'lü yılların başlarında Japonya'dan Batum yoluyla Rize'ye gelmiştir. Meyve kabuğu hasat döneminde portakal renginde ve hafif pürüzlüdür, meyve etine bağlılığı gevşektir. Olgunlaşma döneminden sonra kabuğun etten ayrılması kolaylaşır.

Depolamaya ve taşımaya elverişlidir. Meyveleri basık şekillidir. Meyve eti koyu portakal rengindedir. Tat, koku ve kalitesi yüksek bir çeşittir. Çekirdeksiz bir çeşit'tir. Genelde düzenli ürün veren bir mandarin çeşidi'dir. Partenokarpiye eğilimi oldukça yüksektir. Ağaçları yayvan taçlı olup düşük sıcaklara çok dayanıklıdır.

Erkenci bir çeşittir. Meyveleri Ekim ayı ortasından itibaren olgunlaşır ve olgunluktan sonra ağaç üzerinde fazla kalmaz. Türkiye'de üretimi en çok yapılan mandarin çeşididir. Özellikle Ege bölgesinde üretilir.

**Citrus clementina;** Yerli bir mandarin ile turunç arasında doğal bir melez olduğu sanılan erkenci bir çeşittir. Orta boylu, sık taçlı ağaçlar meydana getirir ve yaprakları mızrak şeklindedir. Meyvedeki tohum sayısı tozlanmaya bağlı olarak

değişim gösterir. Meyve iriliği küçük ile orta; meyve şekli ise hafif basık ile yuvarlak arasında değişim gösterir. Meyve kabuğu koyu portakal ile kırmızımsı portakal renginde, orta kalınlıkta, yüzeyi düzgün ve parlaktır. Dilim sayısı 8 - 12 adettir. Meyve eti koyu portakal renginde ve suludur.

***Citrus reshni***; Kireçli ve kumlu topraklara orta derecede, ıslak topraklara ise zayıf derecede dayanıklıdır. Soğuklara ve özellikle tuzlu topraklara dayanıklı'dır

***Fremont***; Ponkan X Klemantin yapay melezidir. Dik büyüyen, orta boyda ağaçlar oluşturan bir çeşittir. Meyveleri orta büyüklükte, yuvarlak parlak kabuklu ve mandarinler içerisinde en koyu portakal renkli bir çeşittir. Ancak oldukça zor soyulur. Meyvesi sulu, tatlı, çekirdekli (ortalama 13 çekirdek) bir çeşittir. Ağaç üzerinde daha çok kalabilir (diğer mandarinlere göre). Çok iyi bir tozlayıcıdır. Türkiye'de çok fazla yetiştirilir. Orta doğu ülkelerine bu çeşitle önemli bir ihracatımız vardır.

***Citrus sunki***; Çin orijinli, küçük meyveli ve ekşi bir mandarindir. Güneydoğu çin bölgesinde anaç olarak yaygın şekilde yetiştirilmektedir. Tristezaya ve tuza toleranslıdır. Soğuklara orta derece dayanıklıdır. Kireçli topraklara iyi adapte olmaktadır.

***Citrus nobilis***; (King mandarini) Orjini bilinmeyen eski bir çeşittir. Meyvelerin dış görünümü karakteristiktir. Birçoğu portakallarda olduğu gibi boyutları büyüktür. Dış kabuk rengi olgunlarda turuncu yada sarımsı turuncudur ve kolaylıkla soyulur. Fakat aşırı derecede yağlıdır. Oldukça geç olgunlaşır.

***Reinking Şadok***; Büyük sarı kabuklu meyveleri tatlı, beyaz ve çok suludur. Kabukları çok incedir. Kış yada ilkbaharda hasat edilir.

***Marsh Seedless***; Bu altıntop büyük ağaçlar meydana getirir. Meyveleri yuvarlak basık ve iridir. Orta kalınlıkta olan meyve kabuğu sarı renkte olup olgunluk ilerledikçe kirli sarıdır. Ticari anlamda çekirdeksiz, yola ve muhafazaya son derece elverişli, sofralık ve sanayilik bir çeşittir.

***Citrus latipes***; *Citrus ichangensis* gibi soğuğa dayanıklıdır. Fakat çok çeşitli yaprakları ve daha ince kabukları vardır. Tanaka bu türü *Papeda* bölümüne yerleştirmiştir.

***Citrus micrantha* var. *Microcarpa***; *C. micrantha* var. *Microcarpa* *Citrus* 'larda en küçük meyve ve çiçeklere sahiptir.

***Citrus celebica***; Swingle'e göre *Papeda* alt cinsi içerisinde yer almaktadır.

***Citrus amblycarpa***; Taşlı dış kabuğu ve açık turuncu rengiyle bir turuncu benzerdir. Meyve eti açık sarıdır ve 21 segmente ayrılmıştır. Herbir segmentte 1 tohum vardır.

***Citrus depressa***; Küçük meyveli mandarin grubunda yer almaktadır. Meyveleri çok küçük, turuncu renklidir.

***Citrus myrtifolia***; Bir turuncu türüdür fakat, dekoratif görünümü vardır. Yavaş büyüme özelliğine sahiptir ve dikensizdir. Boğum araları kısadır ve genelde üzerine aşılı çeşitlerde küçük taç oluşumuna neden olur. Bodur anaç olarak kullanılmaktadır.

**Tayvan Turuncu (*Citrus taiwanica*)**; Bir turuncu melezi olduğu düşünülmektedir. Turuncudan üstün yanı *Tristeza*'ya daha tolerant olmasıdır.

***Citrus bergamia***; Ağaçları orta kuvvetli, yaygın büyüme özelliğindedir. Meyveleri yuvarlak, sarı renkli, meyvesi çok asidik ve çok çekirdeklidir. Bergamot yağı çay ve parfümlerde çok kullanılmaktadır.

***Citrus natsudaiai* (*Natsudaiai*)**; Japonya'da 17.yy' da bulunmuştur. Japonyada ya altıntop yada portakal olarak adlandırılmaktadır.

***Citrus junos* (Yuzu CRC)**; *C.ichangensis* swing ile *Citrus reticulata* melezi olduğu bildirilmektedir. Bu anaç *Phytophthora* ssp.'ye dirençliliği, üzerine aşılı ağaçların uzun ömürlü oluşu, soğuklara dayanıklılığı ve üç yapraklıdan daha etkili bir şekilde besin elementlerini absorbe etmesi nedeni ile ilgiyi üzerine çekmiştir. Kazık kökü toprağın derinliklerine gittiğinden kuraklılığa karşı dayanıklılığı yüksek bulunmuştur. Fidan döneminde büyümesi yavaştır ve üzerine aşılı ağaçların meyveye yatması geç olur.

***Citrus meyeri***; Ticari anlamda çekirdeksiz bir limon çeşididir. Çok sulu, ince ve parlak kabuklu, limon şeklinde bir çeşittir. Erken yaşlarda meyveye yatar. Bu limon Kasım ayından itibaren kabuk rengini portakal rengine (turuncuya) çevirmeye başlar. Meyve eti de portakal rengine çevrilmeye başlar. Bu çeşit ince kabuklu olması nedeniyle yola ve muhafazaya dayanıklı değildir.

**Yafa**; Yerli portakallardan bir tanesinde meydana gelen göz (tomurcuk) mutasyonu sonucu ortaya çıkmıştır. Turunçgil çeşitlerinin %95'i doğal göz mutasyonu sonucu ortaya çıkmıştır. Yafa ağaçlarının tacı dağınıktır. Dalları diğer portakallara göre gevşektir. Yafa ağaçları büyük ağaçlardır. Yaprakları iri ve diğer portakallara göre daha açık renklidir. Meyveleri orta iri ve/veya iridir. Meyve şekli oval şekillidir. Meyveleri pürüzlüdür. Yafa ticari anlamda çekirdeksiz bir çeşittir. Meyve suyu orta düzeydedir. Meyveleri kalın kabukludur. Dilimler kolay soyulur. Dilim zarı incedir. Meyve eti gevşektir.

**Navelina**; En erkenci göbekli portakaldır. İhracat açısından çok önemlidir. Ağaçları güçlü bir yapıya sahiptir. Meyve ağırlığı 200 – 250 gramdır. Çekirdeksizdir (**Tuzcu, 2002**).



**Şekil 3.1.** *Severinia buxifolia* SRA (1), *Citrus natsudaïdai* (2), *Aegle marmelos* (3), *Balsamocitrus dawei* (4), *Citrus sunki* (5), *Citrus amblycarpa* (6), *Citrus aurantium* (7), *Citrus benikoji* (8), *Citrus bergamia*(9).



**Şekil 3.2.** *Citrus canaliculata* (10), *Citrus depressa* (11), *Citrus excelsa* (12), *Citrus hanaju* (13), *Citrus hassaku* (14), *Citrus hirosima* (15), *Citrus intermedia* (16), *Citrus iyo* (17), *Citrus keraji* (18).





Şekil 3.3. *Citrus lumia* (19), *Citrus macrophylla* (20), *Citrus moi* (21), *Citrus myrtifolia* (22), *Citrus natsudaoidai* (23), *Citrus sudachi* (24), *Citrus sulcata* (25), *Citrus tachibana* (26), *Citrus tamurana* (27).



Şekil 3.4. *Citrus winter* (28), *Citrus leiocarpa* (29), *Citrus meyer* (30), *Clausena lansium* (31), *Clausena excavata* (32), *Citrus clementina* (33), *Eremocitrus glauca* (34), *Citrus junos* (Yuzu)(35),



Şekil 3.5. *Fortunella margarita* (36), *Fortunella obovata* (37), *Citrus reticulata* var. *Fremont* (38), *Glycosmis pentaphylla* (39), *Citrus sinensis* var. *Hamlin* (40), *Hesperethusa crenulata* (41), *Citrus limon* var. *Kütiken* (42), *Microcitrus australasica* (43), *Citrus paradisi* var. *Marsh seedless* (44),



Şekil 3.6. *Murayya paniculata* (45), *Citrus sinensis* var. *Navelina* (46), *Citrus reticulata* var. *Ortanique* (47), *Poncirus trifoliata* var. *Beneke* (48), *Citrus jambhir* (49), *Citrus sudachi* (50), *Citrus taiwanica* (51).

### **3.2. Metod**

#### **3.2.1 Mikroatellit (SSR) Analizleri**

Araştırmada mikrosatellit analizleri Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

##### **3.2.1.1 DNA İzolasyonu**

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonun’dan sağlanan bitkisel materyallerden DNA izolasyonu, Ç.Ü.Z.F. Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

DNA parmakizlerini belirlemek amacıyla DNA ekstraksiyonu yapılacak çeşit/tiplerin yarı açılmış genç yaprakları ilkbahar döneminde alınmıştır.



**Şekil 3.7.** DNA İzolasyonu Yapılan Yaprak Örnekleri

Bunun en büyük nedeni, DNA ile birlikte ekstrakte edilen bileşiklerden özellikle fenoller ve onların oksidasyon ürünleri ile orta lamel ve hücre duvarından sentezlenen polimerik karbonhidratların DNA'ya bağlanarak DNA'nın saflığını bozmalarıdır. Dolayısıyla, özellikle fenollerin ve polimerik karbonhidratların nispeten daha az bulunduğu sürgün uçlarındaki 2-3 yaprakçık alınmıştır. DNA izolasyon yöntemi olarak daha önce turuncgillerde başarı ile uygulanmış olan **Dellaporta ve ark (1985)**, kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (**Aka-Kaçar, 2001**).

- 3 g genç yaprak alınarak, havan içerisinde sıvı azot ile iyice öğütülür (**Şekil 3.8.**),
- Öğütülen yaprak örnekleri 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılır,
- Tüpler oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildikten sonra 15 ml ekstraksiyon buffer A eklenerek 65 °C'de 30 dk. İnkübe edilir,
- 2 dk. buz üzerinde bekletilir,
- 6 ml 5M KAc eklenerek 5 dk. buz üzerinde bekletilir,
- 13.475 rpm'de 4 °C'de 20 dk. santrifüj edilerek (Suprafuge 22, Heraeus-Sepatech), süpernatant temiz bir santrifüj tüpüne aktarılır ve 15 ml isopropanol (-20 °C) eklenir,
- 15-30 dk. oda sıcaklığında bekletilerek, 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj yapılır,
- Sıvı kısım tüpten uzaklaştırılır ve tüpler 1 dk. ters çevrilerek bekletilir,
- 5 ml 76% ETOH+NH<sub>4</sub>Ac (10mM) solüsyonu çökelen (pellet) kısma eklenerek yıkama yapılır ve oda sıcaklığında 20 dk. bekletilir,
- 4 °C'de 10 dk. 5000 rpm'de santrifüj edilerek ve üst kısım (süpernatant) tüpten uzaklaştırılır,
- 1.5 ml T<sub>50</sub>E<sub>10</sub> eklenerek 1 sa. 37°C 'de çalkalanarak inkübe edilir,
- 150:1 NaAc (3M) eklenerek, buz üzerinde 20 dk. bekletilir,

- 12.000 rpm hızda 15 dk. santrifüj edilerek sıvı faz temiz bir santifüj tüpüne alınarak üzerine 15 ml isopropanol eklenir ve DNA iplikçiklerinin çöktürülmesi sağlanır,
- 30-60 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 6000 rpm’de 10 dk. tekrar santrifüj edilir,
- Sıvı kısım tüpten uzaklaştırılarak çökelti 37 °C’de 30 dk. inkübe edilir,
- 5 ml 76% ETOH+NH<sub>4</sub>Ac (10mM) solüsyonu çökelen (pellet) kısma eklenerek yıkama yapılır ve oda sıcaklığında bekletilir,
- 10.000 rpm’de 10 dk. santrifüj yapılır, sıvı kısım tüpten uzaklaştırılır,
- Tüp içerisindeki çökelti (DNA=pellet) 37 °C’de 30 dk. kurutulur,
- Kurutulan çökelti (DNA) 500:1 TE+RNAse solüsyonunda çözündürülerek -20 °C’de saklanır.



**Şekil 3.8.** DNA İzolasyonunda Yaprakların Öğütülmesi

**3.2.1.2. Mikrosatellit (SSR) Analizleri PCR koşulları**

Bitkisel materyallerden izole edilen DNA'lar seyreltilerek sentetik olarak hazırlanmış mikrosatellit primerleri ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek thermal cycler (model) içerisine yerleştirilmiştir. Reaksiyon ve PCR koşulları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Reaksiyon Koşulları:**

- 0.5 ml eppendorf tüpte;
- 25 ng genomik DNA
- 1X PCR reaksiyon buffer (10Mm Tris-HCl pH: 9.0, 50mM KCl, % 0.1 Triton x100, %0.01 (w/v gelatin)
- 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2.5 pM primer (forward ve reverse)
- 0.6 ünite Taq polimerase

Toplam hacim:10µl olacak şekilde aşağıda verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

**PCR Döngü Programı**

|                 |                                                |
|-----------------|------------------------------------------------|
| 94 °C 5 dk      | ön “denaturation”                              |
| 94 °C 1 dk      | DNA'nın çift ipliğinin ayrılması“denaturation” |
| 55*-60 °C 30 sn | primerlerin bağlanması “annealing”             |
| 72 °C 1 dk      | yeni iplikçiğin yazılımı “extention”           |
| 72 °C 4 dk      | son yazılım                                    |
| 4 °C ∞          |                                                |

LiCor DNA analiz sistemi için hazırlanan primerlerle yapılacak analizler için farklı PCR koşulları kullanılmıştır. PCR koşulları aşağıdaki şekilde gerçekleşmiştir.

**LiCor PCR Reaksiyonları**

| Kullanılan Kimyasallar | Her örnek için kullanılan miktar (ul) |
|------------------------|---------------------------------------|
| ddH <sub>2</sub> O     | 5.00                                  |
| PCR Master Mix 2X      | 8.00                                  |
| MgCl <sub>2</sub>      | 0.50                                  |
| Taq DNA polimeraz      | 0.05                                  |
| M13 primer (Forward)   | 0.50                                  |
| F + R primer           | 1.00                                  |
| DNA (5ng)              | 5.00                                  |
| Toplam Hacim           | 10 ul                                 |

DNA'lar, sentetik olarak hazırlanmış floresan etiketli mikrosatellit primerleri ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek "termal cycler" içerisine yerleştirilmiştir

**Şekil 3.9.** PCR döngü programında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır.



**Şekil 3.9.** Thermal Cycler



**Mikrosatellit Analizlerinde Kullanılan Primerler**

Mikrosatellit analizlerinde toplam 15 adet primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler Roose ve ark., (yayınlanmamış) tarafından karakterize edilmiştir.

Araştırmada kullanılan primerlere ait bilgiler **Çizelge 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5** de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Mikrosatellit Analiz Aşamalarında Kullanılan Forward Primerler

| No. | Primer Numarası | Tekrarlanan Motif  | Forward Primer            | Forward Primer Uzunluğu |
|-----|-----------------|--------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1   | 54              | (CAT) <sub>n</sub> | AACACCTTAAGGCTGCAGGA      | 20                      |
| 2   | 83              | (AC) <sub>n</sub>  | CCAAAAGTTCTTGATTTCGTTG    | 22                      |
| 3   | 84              | (CA) <sub>n</sub>  | CTGCCCTACAGAGAGCGTAGA     | 21                      |
| 4   | 105             | (AC) <sub>n</sub>  | TTGGACCCGAGAGTACAAGC      | 20                      |
| 5   | 139             | (TG) <sub>n</sub>  | CATGTGGATGCGAAGAGGTA      | 20                      |
| 6   | 161             | (AC) <sub>n</sub>  | AGAGTTCAAGCGCCTTGGTA      | 20                      |
| 7   | 171             | (CA) <sub>n</sub>  | TGCACACACACATACACATGC     | 21                      |
| 8   | 173             | (CA) <sub>n</sub>  | GCATAGAATAAGAAATGACAGCAAA | 25                      |
| 9   | 174             | (CA) <sub>n</sub>  | AAAACAACCTTCACGAGTCACAA   | 22                      |
| 10  | 178             | (AC) <sub>n</sub>  | TTCCATGATTGACCATTTC       | 20                      |
| 11  | 415             | (ATG) <sub>n</sub> | GTACACGATGAGGGGAGCAA      | 20                      |
| 12  | 432             | (ATG) <sub>n</sub> | CGAACGGGGTGACTTAAAAA      | 20                      |
| 13  | 559             | (TG) <sub>n</sub>  | AACCATTACGCTCACCGAAG      | 20                      |
| 14  | 562             | (CAT) <sub>n</sub> | GCAACGTTGTGGACTGTGAT      | 20                      |



Çizelge 3.3. Mikrosatellit Analiz Aşamalarında Kullanılan Reverse Primerler

| No. | Primer Numarası | Tekrarlanan Motif  | Reverse Primer         | Reverse Primer Uzunluğu |
|-----|-----------------|--------------------|------------------------|-------------------------|
| 1   | 54              | (CAT) <sub>n</sub> | CGTTGTTGATGATTCTTGATGA | 22                      |
| 2   | 83              | (AC) <sub>n</sub>  | TCGTCAACCTCCATGCTGTA   | 20                      |
| 3   | 84              | (CA) <sub>n</sub>  | GTGCCGCATCTGATTTC      | 19                      |
| 4   | 105             | (AC) <sub>n</sub>  | CCAGTGTGCTTGGCATT      | 20                      |
| 5   | 139             | (TG) <sub>n</sub>  | GGCTTTTCAAACATGTCAAACA | 22                      |
| 6   | 161             | (AC) <sub>n</sub>  | ACATGCATATTGCTCCTCCA   | 20                      |
| 7   | 171             | (CA) <sub>n</sub>  | GACGGTGCAAAGAAAGCACT   | 20                      |
| 8   | 173             | (CA) <sub>n</sub>  | ATGCCTGCACCTTTGGTAAG   | 20                      |
| 9   | 174             | (CA) <sub>n</sub>  | GATGGGCAGCATGTAGTTCA   | 20                      |
| 10  | 178             | (AC) <sub>n</sub>  | GTTCTGCCAGCAGCATAGT    | 20                      |
| 11  | 415             | (ATG) <sub>n</sub> | CTCCCTCACAGCTTCACCA    | 19                      |
| 12  | 432             | (ATG) <sub>n</sub> | CTTGAGGGTGAGGCAGTGAC   | 20                      |
| 13  | 559             | (TG) <sub>n</sub>  | CCCTAATTGCATCTTCCCAAT  | 21                      |
| 14  | 562             | (CAT) <sub>n</sub> | TTCGTTAATTATGCTTCCATGA | 22                      |

Çizelge 3.4. Floresan Etiketli Forward Primerlerin Baz Dizinleri

| Primer | Forward Primer                                 |
|--------|------------------------------------------------|
| 161    | CACGACGTTGTAAAACGACAGAGTTCAAGCGCCTTGGTA        |
| 174    | CACGACGTTGTAAAACGAC<br>AAAACAACCTTCACGAGTCACAA |

**Çizelge 3.5.** Floresan Etiketli Reverse Primerlerin Baz Dizinleri

| Primer | Reverse Primer       |
|--------|----------------------|
| 161    | ACATGCATATTGCTCCTCCA |
| 174    | GATGGGCAGCATGTAGTTCA |

**3.2.1.3. Mikrosatellit Elektroforez Koşulları**

Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl çekilerek + 2µl yükleme bufferi eklenmiş ve % 0.9'lık agaroz jelde **Şekil 3.10.**, 1X TAE (Trizma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA(Na<sub>2</sub>.EDTA.H<sub>2</sub>O) buffer eklenerek koşulmuştur. Jel % 0.1 oranındaki ethidium bromide solusyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek amplifikasyon ürünlerinin varlığı belirlendikten sonra Polyacrilamide Gel Elektroforezde (PAGE) koşma işlemine geçilmiştir.

**Şekil 3.10.** Agarose Jel Elektroforez

**Polyacrilamide Jel Elektroforez**

% 6 konsantrasyonda poliakrilamid jel hazırlamak için;

100 ml'lik

43 g üre,

10 ml 10X TBE buffer,(Tris-Base, Boric asit, EDTA(Na<sub>2</sub>.EDTA.H<sub>2</sub>O))

15 ml % 40'luk Acrylamide (19:1Acrylamide,N,N' methylene bis-acrylamide)

500 µl amonium persulfate (0.1g/1ml),

100 µl TEMED,

75 ml ddH<sub>2</sub>O içeren solüsyon hazırlanır.

Hazırlanan solüsyon şırınga yardımı ile elektroforez aparatına enjekte edilerek **Şekil 3.11.**, polimerize olması beklenir **Şekil 3.12.**

**LiCor için Poliakrilamide Jel hazırlığı**

Elde edilen PCR ürünlerini koşturmak amacıyla % 6.5 poliakrilamide jel hazırlanmıştır. Poliakrilamide jel hazırlamak amacıyla;

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Üre                         | 8.4g   |
| %50 Long Ranger Akrilamide  | 2.6 ml |
| 10X TBE Buffer              | 2.0 ml |
| TEMED                       | 15 µl  |
| Amonyum Persulfat (APS-%10) | 150 µl |

Solusyonları karıştırılıp elektroforez aparatına dökülerek, yaklaşık 2 saat polimerize olması beklenmiştir.

**LiCor Elektroforez koşulları**

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra aparat cihaza yerleştirilerek 1000 V, 35 mA, 25 W 45<sup>0</sup>C’de yaklaşık 30 dk. ön ısıtma yapılarak ardından eşit miktarda formamide yükleme bufferı eklenmiş ve 95<sup>0</sup>C de 2 dk denatüre edilmiş örneklerden 0.5µl elektroforeze yüklenerek 1500 V, 35 mA, 50 W 48<sup>0</sup>C’de elektroforez koşullarında 1.5 saat koşulmuştur. Amplifiye edilmiş ürünler 50-350 bp uzunluğundaki DNA marker (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) kullanılarak hesaplanmıştır.



**Şekil 3.11.** Polyacrlyamide Jelin Enjektör Yardımıyla Dökülmesi



**Şekil 3.12.** Polyacrlyamide Jelin Bekletilmesi

PCR reaksiyon ürünlerini yüklemekten önce 700 ml 1X TBE buffer elektroforeze eklenerek 90 W'da 1-1.5 saat ön ısıtma (preheating) yapılmıştır **Şekil 3.13.** Bu aşamada jelin sıcaklığının 40-50 °C olması gereklidir. Her 20 µl'lik PCR reaksiyonu için 8 µl loading buffer eklenerek 95 °C'de denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra her bir örnek için 4 µl yükleme yapılarak ve 80 W, ~ 1900-2100 V'da 2.5-3 saat elektroforezde koşulmuştur. Elektroforez aleti olarak, Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Elektrophresis Cell (BIO RAD) kullanılmıştır.



**Şekil 3.13.** Polyacrlyamide Jelde Ön Isıtma Yapılması



**Şekil 3.14.** PCR Ürünlerinin Jelde İlerlemesi

### **Gümüş Nitrat Boyama**

Elektroforezde koşma işlemi tamamlandıktan sonra jel öncelikle fiksatif solusyon (% 10'luk glacial asetik asit) içerisine koyularak 20 dk. çalkalanmış, daha sonra 3 kez ddH<sub>2</sub>O ile çalkalanarak, 20-30 sn kurumaya bırakılmıştır. Jel boyama solusyonuna (1 paket AgNO<sub>3</sub> + 3ml %37'lik Formaldehite 2 L saf suda çözülür) transfer edilerek 30 dk. bu solusyonda bekletilmiş ve daha sonra developing solusyonuna (10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2L saf suda çözünür ve 10 C' ye soğutulduktan sonra üzerine 3 ml Formaldehite ve 400 µl Sodyum Thiosülfate eklenir) aktararak bantlar görülene kadar çalkalanmıştır. Bantlar görülmeye başlayınca 2-3 dk tekrar developing solusyonuna koyulmuştur. Bu solusyon üzerine fix/stop solusyon direkt olarak eklenerek bantların daha iyi görünmesi ve kalıcı olması sağlanmıştır. Son olarak jel 2 kez ddH<sub>2</sub>O ile çalkalanarak kurumaya bırakılmış ve özel tarayıcı aracılığı ile görüntülenmiştir.

### **3.2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi**

#### **3.2.2.1. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi**

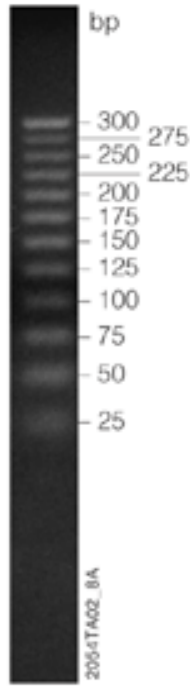
DNA izolasyonları sonucu elde edilen DNA'lar TE çözültisi içerisinde 1:50 oranında sulandırılarak DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrede (Nanodrop) **Şekil 3.15** de 260 ve 280 nm'de okuma yapılarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.15.** DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Spektrofotometre

### 3.2.2.2. Benzerlik İndeksleri ve Dendogramların Oluşturulması

Mikrosatellit analizlerinde PAGE sonucu elde edilen bantlar, bant olma veya olmama durumlarına göre “1” veya “0” şeklinde ve amplifikasyon bulunmayan durumlarda “9” olarak değerlendirilerek benzerlik indeksleri oluşturulmuştur (Nei ve Li, 1979). Bantların değerlendirilmesinde 25 bp DNA markır kullanılmıştır.. Benzerlik indeksleri **Nei ve Li, 1979** tarafından geliştirilen ve aşağıda verilen “Benzerlik indeksi” formülüne göre hesaplanmıştır.



**Şekil 3.16.** % 6'lık PAGE'de Koşularak Elde Edilmiş 25 bp Büyüklüğünde DNA Markırı

Cinsler, türler ve çeşitler arasındaki genetik benzerlikler ve bu benzerliklere dayalı dendogramların oluşturulması **Rolf (1992)** tarafından geliştirilen **NTSYS** (Numerical Taksonomy and Multivariarte Analysis System, Version 2.0) adlı bilgisayar paket programı kullanılarak yapılmıştır.



Benzerlik indeksi=  $\frac{2 N_{ij}}{N_i + N_j}$

$N_{ij}$ : iki çeşitteki homolog (ortak) bant sayısı

$N_i + N_j$ : İki çeşitteki toplam bant sayısı

### **3.2.3.3 Lokus Başına Düşen Allel Sayısı**

Lokus Başına Düşen Allel Sayısı=  $\frac{\text{Elde edilen toplam allel sayısı}}{\text{Lokus sayısı}}$

#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

Turunçgil akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerin arasındaki genetik ilişkileri ortaya koymak ve turunçgil taksonomisine ışık tutmak için yapılan bu çalışmada Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “Tuzcu Turunçgiller Koleksiyonu” içerisinde yer alan turunçgil ve akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tipler’den belirlenmiş 88 genotip ve 15 adet SSR primeri kullanılmıştır.

##### **4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI**

###### **4.1.1. Mikrosatellite (SSR) Analizi Sonuçları**

Bu çalışmada kullanılan 15 SSR primerinden 13 tanesinde istenilen amplifikasyon gerçekleşmiştir. İstenilen amplifikasyon gerçekleşmeyen AC01 ve CT19 primeri değerlendirmeye alınmamıştır.

**Primer #54:** (CAT)<sub>n</sub> tekrarı içeren #54 no’lu primerin tekrar uzunluğu 20 bp ve 150, 163, 166, 169, 172, 175 bp olmak üzere toplam 6 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Tezde belirtilmiş olan SSR protokolü ile istenilen amplifikasyon elde edilmiş, karakterizasyon çalışmaları için kaliteli bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant elde edilmiştir. *Clausena lansium*, Kobasu ve *Casimiroa tetrameria* bu primerle PCR sonucu amplifikasyon gerçekleşmediği için jel görüntüsünde bant oluşturmamışlardır. *Eremocitrus glauca* 163 ve 169 bp, *Fortunella margarita* ve *Fortunella japonica*’da 163 bp, *Poncirus trifoliata* var. *Beneke* 163 bp, C-32 163 bp, *Citrus unshiu* 163 bp, *Citrus sinensis* var. Yafa ve *Citrus sinensis* var. Navelina 163 ve 169 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlardır. Ayrıca bu primerle yapılan analiz sonucunda diğerlerinden farklı olarak *Citrus assamensis* 163-166 ve 169 bp olmak üzere üç adet bant meydana gelmiştir. 54 no’lu primerle elde edilen bantlardan 175 bp büyüklüğündeki bant *Citrus moi* ve *Citrus ujukitsu* genotiplerinde 150 bp’lik bant yalnızca *Microcitrus australasica* ve *Citrus*

*sinograndis* genotiplerinde elde edilmiştir. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.1.** ve **Şekil 4.2'**de görülmektedir.

**Primer #84:** (CA)<sub>n</sub> tekrarı içeren 21 bp uzunluğundaki #84 no'lu primer 127, 145, 150, 157, 160, 171, 173, 175, 178, 183, 193, 197, 204, 207 bp olmak üzere toplam 14 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Tezde belirtilmiş olan standart SSR protokolü ile istenilen kalitede bantlar elde edilmiş ve turuncgil akraba ve türlerinin karakterizasyon çalışmalarında kullanılması uygun bulunmuştur. Bu primerle yapılan PCR analizi sonucunda yalnızca *Citrus clementina* amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Clausena lansium* 178 ve 193 bp, *Eremocitrus glauca* 193 bp, *Poncirus trifoliata* var. *Beneke* 178-193 ve 204 bp, *Citrus sunki* 183 ve 193 bp, *Fortunella margarita* ve *Fortunella japonica* 193 bp, *Citrus sinensis* var. Yafa ve *Citrus sinensis* var. Navelina 193 ve 204 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlardır. 127 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Clausena excavata*'da, 207 bp büyüklüğündeki bant ise yalnızca *Citrus shunkokan*'da meydana gelmiştir. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.3.** ve **Şekil 4.4.'**de görülmektedir.

**Primer #415:** (ATG)<sub>n</sub> tekrarı içeren 20 bp uzunluğundaki #415 no'lu primer 121, 125, 127, 134 bp büyüklüğünde olmak üzere toplam 4 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Tezde belirtilen SSR protokolü ile çok kaliteli bantlar meydana gelmiştir. *Citrus myrtifolia*'da amplifikasyon gerçekleşmemiş, 121 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Clausena lansium* genotipinde oluşmuştur. *Poncirus trifoliata* var. *Beneke* 127 bp, C-35 ve C-32 127 bp, *Fortunella margarita*, *Fortunella japonica* türlerinde 125 bp, *Citrus limon* var. Kütdiken 125 bp, *Citrus sinensis* var. Yafa ve *Citrus sinensis* var. Navelina 125 ve 127 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlardır. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.5.** ve **Şekil 4.6.'**da görülmektedir.

**Primer #432:** (ATG)<sub>n</sub> tekrarı içeren 20 bp uzunluğundaki 432 no'lu primerden 215bp-350bp arasında toplam 8 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir bant en fazla üç adet bant elde edilmiştir. Yapmış olduğumuz SSR protokolü ile çok kaliteli ve ayırt edilebilir bantlar elde edilmiştir. *Pamburus missionis* ve *Citrus celebica* türlerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina ve *Citrus reticulata* var. Ortanique 239 bp büyüklüğünde bir adet, *Citrus intermedia* 215-229 ve 239 bp olmak üzere üç

adet polimorfik bant elde edilmiştir. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.7.** ve **Şekil 4.8.**'de görülmektedir.

**Primer #559:** (TG)<sub>n</sub> tekrarı içeren #559 no'lu primer 214, 260, 268, 270, 275, 278 bp büyüklüğünde toplam 6 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla iki adet bant oluşmuştur. Ayrıca bu primerle elde edilen jel görüntülerinde kaliteli ve ayırt edilebilir bantlar meydana gelmiştir. *Citrus assamensis* ve *Casimiroa tetrameria* genotiplerinde PCR sonucu amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Clausena lansium* 260 bp büyüklüğünde bir adet, *Clausena excavata* 270 bp büyüklüğünde bir adet, *Murraya paniculata* 260 ve 270 bp büyüklüğünde iki adet, *Poncirus trifoliata* var.*Beneke*, C-35 ve C-32 260 bp büyüklüğünde bir adet, *Citrus sinensis* var. Hamlin 260 bp ve 278 bp büyüklüğünde toplam iki adet bant elde edilmiştir. 214 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Eremocitrus glauca* genotipinde elde edilmiştir. Ayrıca *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina ve *Citrus reticulata* var. Ortanique 260 bp büyüklüğünde bir adet bant oluşturmuşlardır. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.9.** ve **Şekil 4.10.**'da görülmektedir.

**Primer #173:** (CA)<sub>n</sub> tekrarı içeren #173 no'lu primer 177, 181, 183, 185, 198, 212 bp büyüklüğünde toplam 6 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant oluşmuştur. *Citrus micrantha* var. Microcarpa, *Citrus honaju*, *Citrus moi*, *Citrus excelsa*, *Citrus myrtifolia*, *Citrus winter* genotiplerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Citrus hassaku* 185-198-212 bp olmak üzere üç adet bant elde edilmiştir. Ayrıca 212 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Citrus hassaku* genotipinde meydana gelmiştir. *Clausena lansium* 181 bp büyüklüğünde bir adet, *Clausena excavata* 183 bp büyüklüğünde bir adet, *Murraya paniculata* 181 ve 183 bp büyüklüğünde iki adet, *Poncirus trifoliata* var.*Beneke*, C-35, C-32, *Fortunella margarita* ve *Fortunella japonica* genotiplerinde, 185 ve 198 bp olmak üzere iki adet bant elde edilmiştir. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.11.** ve **Şekil 4.12.**'de görülmektedir.

**Primer #171:** (CA)<sub>n</sub> tekrarı içeren 21 bp uzunluğundaki #171 no'lu primer 138, 140, 142, 146, 150, 152, 159, 162, 175, 180, 235 bp büyüklüğünde toplam 11 adet bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla dört adet bant meydana

gelmiştir. *Severinia buxifolia*, *Citrus aurantium* (Tuzcu 33-9), *Citrus assamensis*, *Citrus davaoensis* genotiplerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. 180 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Citrus benikoji* genotipinde, 175 bp büyüklüğündeki bant *Citrus micrantha* ve *Citrus lumia* genotiplerinde meydana gelmiştir. *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina ve *Citrus reticulata* var. Ortanique 146 ve 159 bp büyüklüğünde iki adet, *Citrus aurantifoli* var. West Indian 150 ve 159 bp büyüklüğünde iki adet, *Citrus clementina* 138 ve 140 bp büyüklüğünde iki adet, *Citrus reticulata* var. Fremont 138 ve 146 bp büyüklüğünde iki adet bant elde edilmiştir. Ayrıca *Citrus sinensis* var. Hamlin ve *Citrus unshiu* genotiplerinde 146-150-159 ve 162 bp büyüklüğünde dört adet bant elde edilmiştir.

**Primer #178:** (AC)<sub>n</sub> tekrarı içeren 20 bp uzunluğundaki #178 no'lu primer 167, 197, 200, 206, 211, 215, 223 bp büyüklüğünde toplam 7 adet bant elde edilmiştir. *Clausena excavata*, *Murraya paniculata*, *Citrus celebica*, *Citrus keraji*, *Citrus tamurana*, *Citrus taiwanica*, *Citrus myrtifolia*, *Citrus meyeri* ve *Citrus tardiva* genotiplerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant elde edilmiştir. 223 bp büyüklüğündeki bant yalnızca *Calusena lansium* genotipinde meydana gelmiştir. *Glycosmis pentaphylla* 197-206 ve 211 bp, *Hesperethusa crenulata* 200-206 ve 211 bp, *Eremocitrus glauca* 200-206 ve 211 bp, *Poncirus trifoliata* var. Beneke 167-206 ve 211 bp, *Citrus davaoensis* 197-206 ve 211 bp, *Citrus webberii* 197-200 ve 211 bp, *Citrus excelsa* 197-206 ve 211 bp, *Citrus sunki* 197-200 ve 211 bp büyüklüğünde toplam üç adet bant oluşmuştur. *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina genotiplerinde 206 ve 211 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.13.**'de görülmektedir.

**Primer #83:** (AC)<sub>n</sub> tekrarı içeren 22 bp uzunluğundaki #83 no'lu primer SSR protokolü kullanılarak yapılan çalışmada istenilen kalitede ve ayırt edilebilir bantlar elde edilmiştir. Bu primerle yapılan analiz sonucunda 189, 191, 193, 195, 197, 200, 203, 205, 207, 210, 212 bp büyüklüğünde toplam 11 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant oluşmuştur. *Aeglopsis chevalieri*, *Hesperethusa crenulata*, *Atalantia ceylanica*, *Citrus intermedia* genotiplerinde amplifikasyon meydana gelmemiştir. *Clausena lansium*, *Clausena*

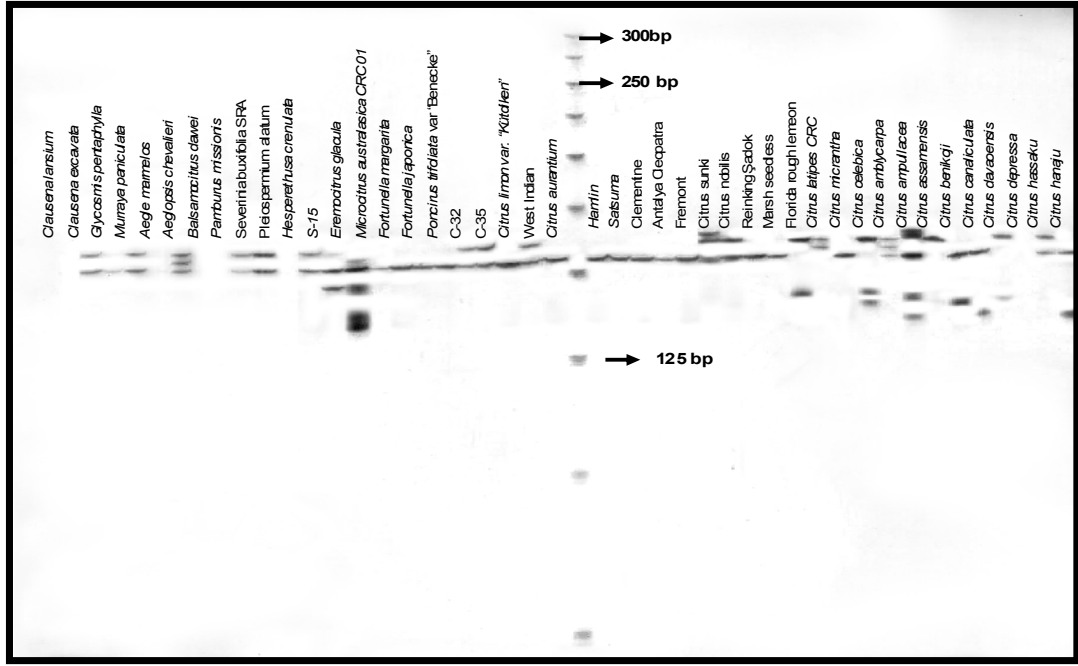
*excavata*, *Glycosmis pentaphylla* 197 ve 205 bp, *Eremocitrus glauca* 195 bp, *Citrus aurantifolia* var. West Indian 203 ve 210 bp, *Citrus limon* var. Kütdiken 203 ve 207 bp, *Citrus clementina* 193 bp, *Citrus celebica* 193 ve 212 bp, *Citrus sinensis* var. Hamlin 210 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlardır. Bu primere ait jel görüntüleri **Şekil 4.14.**'de görülmektedir.

**Primer #562:** (CAT)<sub>n</sub> tekrarı içeren 20 bp uzunluğundaki #562 no'lu primer 209, 215, 222, 257, 271 bp büyüklüğünde toplam 5 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Tez'de belirtilmiş olan SSR protokolü kullanılarak yapılan çalışmada istenilen kalitede ve beklenen büyüklükte bantlar elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant oluşmuştur. *Clausena lansium*, *Murraya paniculata*, *Aeglopsis chevalieri*, *Pamburus missionis*, *Severinia buxifolia*, *Pleiospermium alatum*, *Citrus aurantium* (Tuzcu 33-9), *Citrus celebica*, *Citrus webberii*, *Citrus indica*, *Citrus tachibana*, *Citrus junos*, *Casimiroa tetrameria* genotiplerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina genotiplerinde 215 ve 222 bp *Citrus reticulata* var.Ortanique 215 ve 257 bp, *Citrus meyeri* 215 ve 222 bp, *Citrus grandis* var. Reinking Şadok, *Citrus miaray* 222 bp, *Eremocitrus glauca* 209 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir.

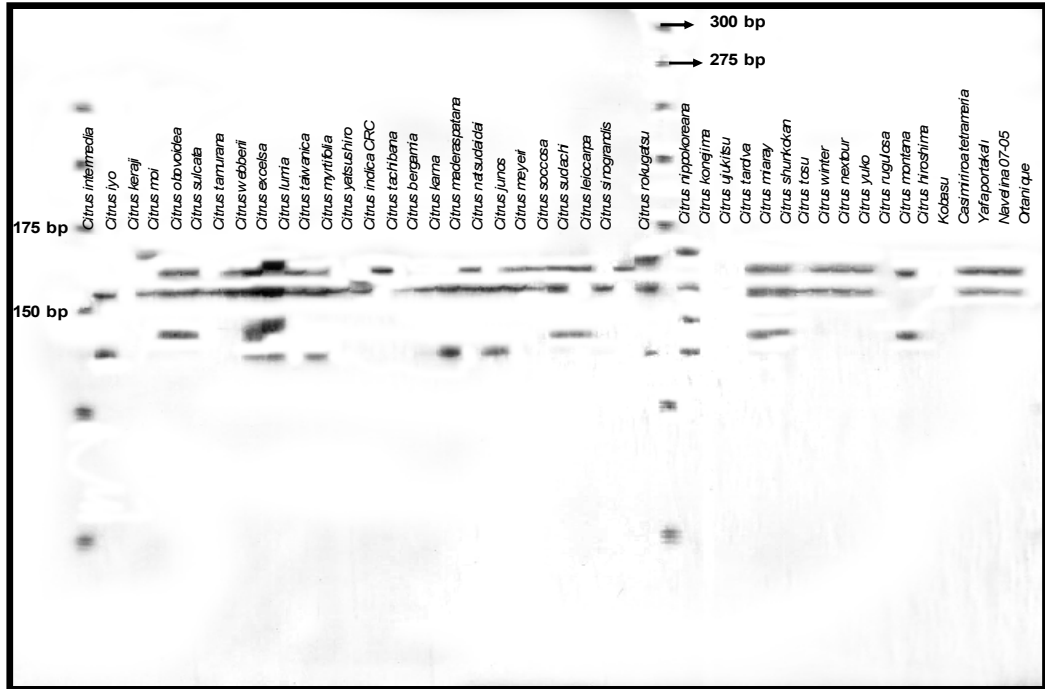
**Primer #139 bp:** (TG)<sub>n</sub> tekrarı içeren 22 bp uzunluğundaki #139 no'lu primer 173, 178, 186, 193, 198, 200, 225 bp uzunluğunda toplam 7 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant oluşmuştur. *Clausena excavata*, *Murraya paniculata*, *Aegle marmelos*, *Aeglopsis chevalieri*, *Pamburus missionis*, *Severinia buxifolia*, *Pleiospermium alatum*, *Poncirus trifoliata* var.Beneke, C-35, *Fortunella margarita*, *Fortunella japonica*, *Citrus excelsa*, *Citrus myrtifolia*, *Citrus bergamia*, *Citrus junos*, *Citrus leiocarpa*, *Citrus miaray*, *Casimiroa tetrameria* genotiplerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *Calusena lansium* 193 bp, *Glycosmis pentaphylla* 186 bp, *Balsamocitrus dawei* 186 ve 198 bp, *Citrus limon* var.Kütdiken 186 ve 198 bp, *Citrus nobilis* 186 bp, *Citrus canaliculata* 186 bp, *Citrus sinensis* var. Yafa, *Citrus sinensis* var. Navelina genotiplerinde *Citrus reticulata* var.Ortanique 215 ve 257 bp, *Citrus meyeri* 215 ve 222 bp, *Citrus grandis* 193 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir.

**Primer #174:** (CA)<sub>n</sub> tekrarı içeren ve 22 bp uzunluğundaki #174 no'lu primer 156, 158, 161, 162, 180, 185, 189, 210 213, 280 bp büyüklüğünde toplam 10 bant elde edilmiştir. Elektroforez aleti olarak, Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Elektrophoresis Cell (BIO RAD) kullanılarak yapılan analizde kaliteli bantlar elde edilememiş, bu nedenle fluerasan etiketli primerlerin kullanıldığı Li-Cor elektroforez aleti kullanılmıştır. Her genotip için en az bir en fazla üç adet bant oluşmuştur. *Citrus sinensis* var. Yafa 158 ve 280 bp, *Citrus excelsa* 158 bp, *Citrus latipes* 158 bp, *Citrus celebica* 156 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. *Citrus sinensis* var. Navelina da amplifikasyon gerçekleşmemiştir.

**Primer #161:** (AC)<sub>n</sub> tekrarı içeren 20 bp uzunluğundaki #161 no'lu primer standart SSR protokolü ile istenilen kalitede bantlar elde edilememiştir. 154, 156, 160, 166, 168, 172, 174, 176, 180, 182, 185 bp uzunluğunda toplam 11 adet polimorfik bant oluşmuştur. Elektroforez aleti olarak, Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Elektrophoresis Cell (BIO RAD) kullanılarak yapılan analizde kaliteli bantlar elde edilememiş, bu nedenle fluerasan etiketli primerlerin kullanıldığı Li-Cor elektroforez aleti kullanılmıştır. *Clausena excavata*, *Glycosmis pentaphylla*, *Pamburus missionis*, *Eremocitrus glauca*, *Microcitrus australasica*, *Citrus canaliculata*, *Citrus intermedia*, *Citrus webberii*, *Citrus myrtifolia*, *Citrus tachibana*, *Citrus karna*, *Citrus sudachi*, *Citrus sinograndis*, *Citrus rogatsu*, *Casimiroa tetrameria* genotipleri amplifikasyon vermemiştir. *Clausena lansium* 156 bp, *Aegle marmelos* 174 ve 176 bp bant elde edilmiştir. Bu primer turunçgillerde yapılan karakterizasyon çalışmalarında kullanılması uygun bulunmuştur.

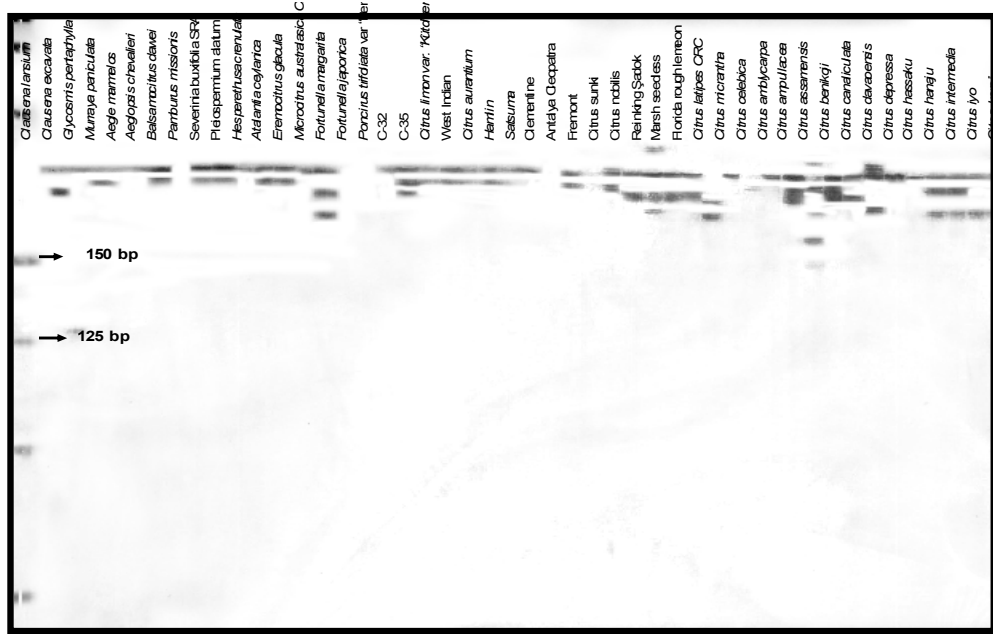


Şekil 4.1. 54 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.

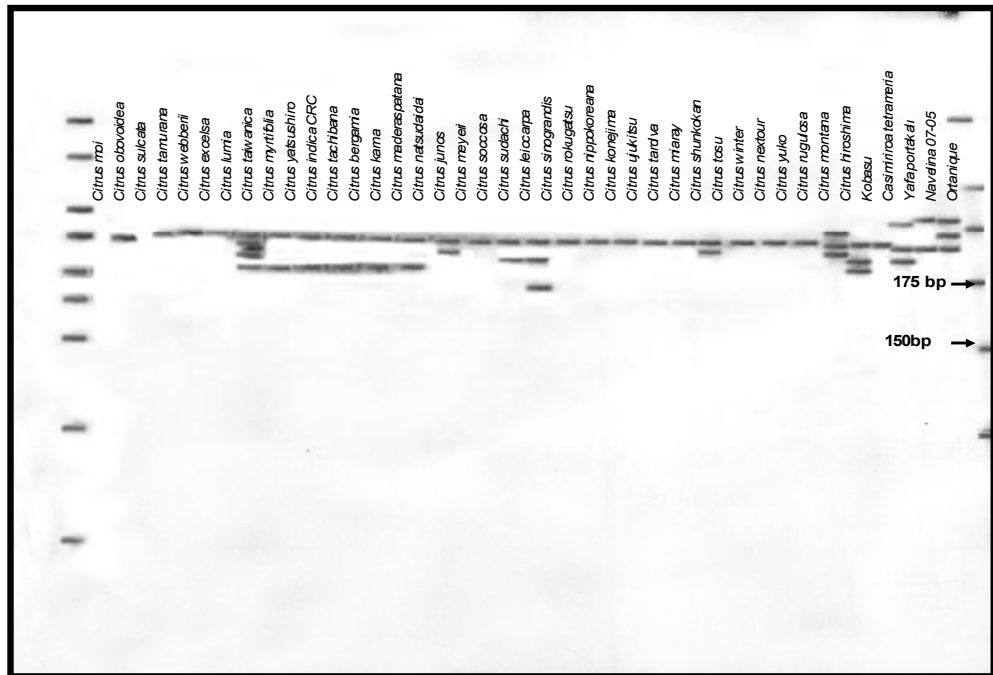


Şekil 4.2. 54 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.

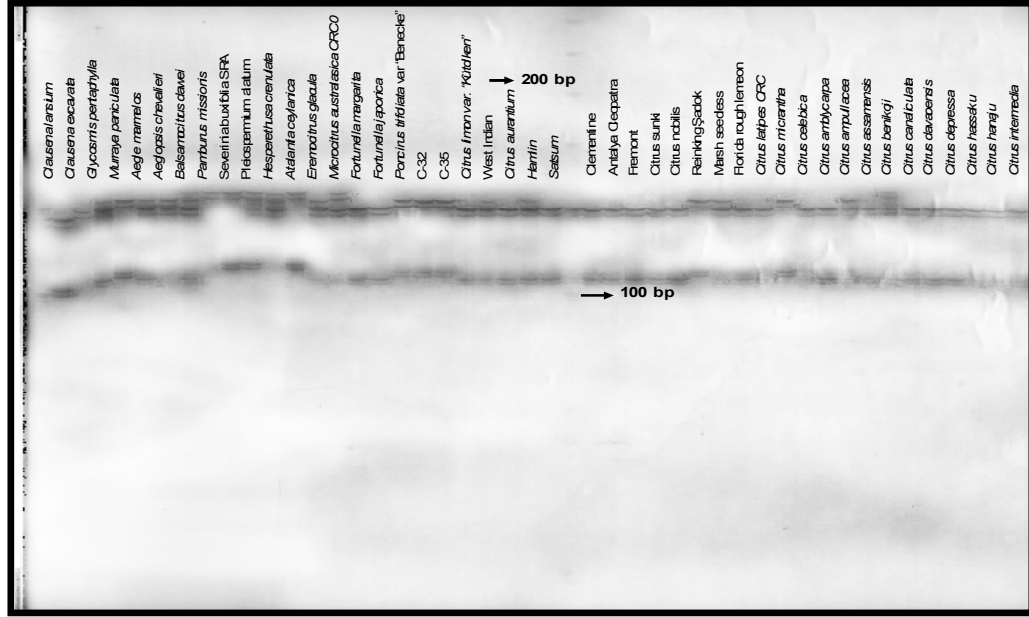




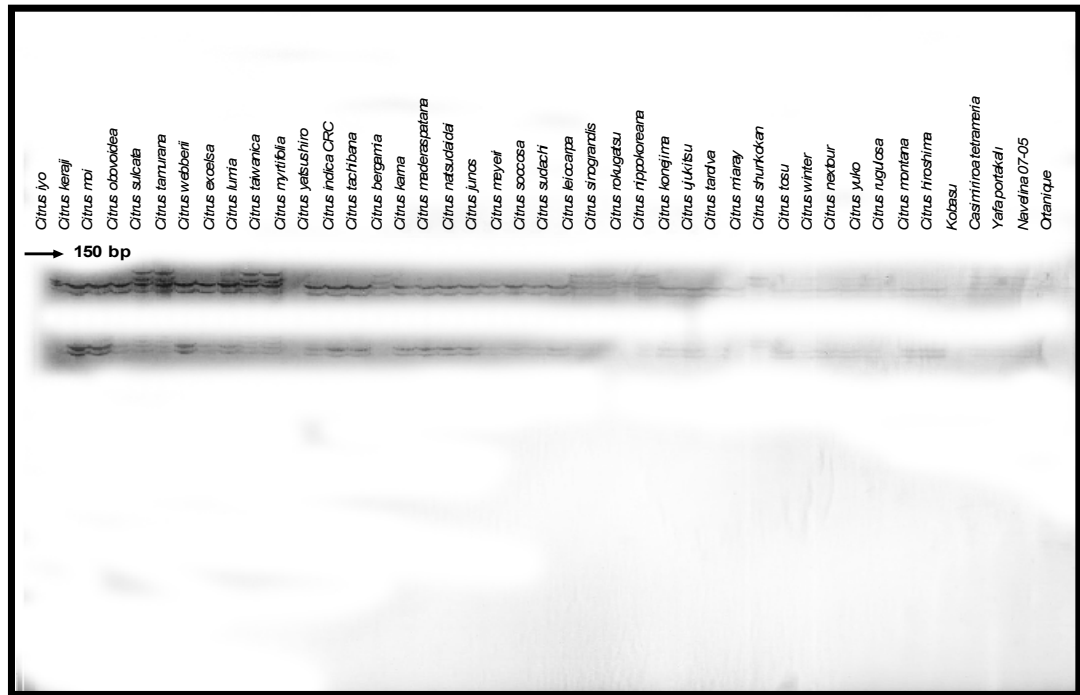
Şekil 4.3. 84 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



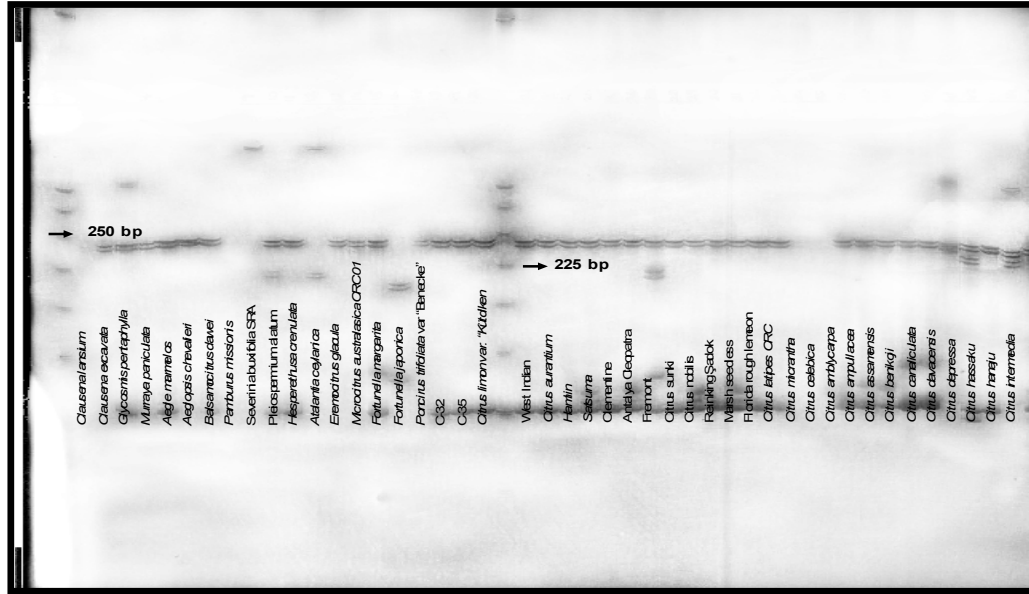
Şekil 4.4. 84 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



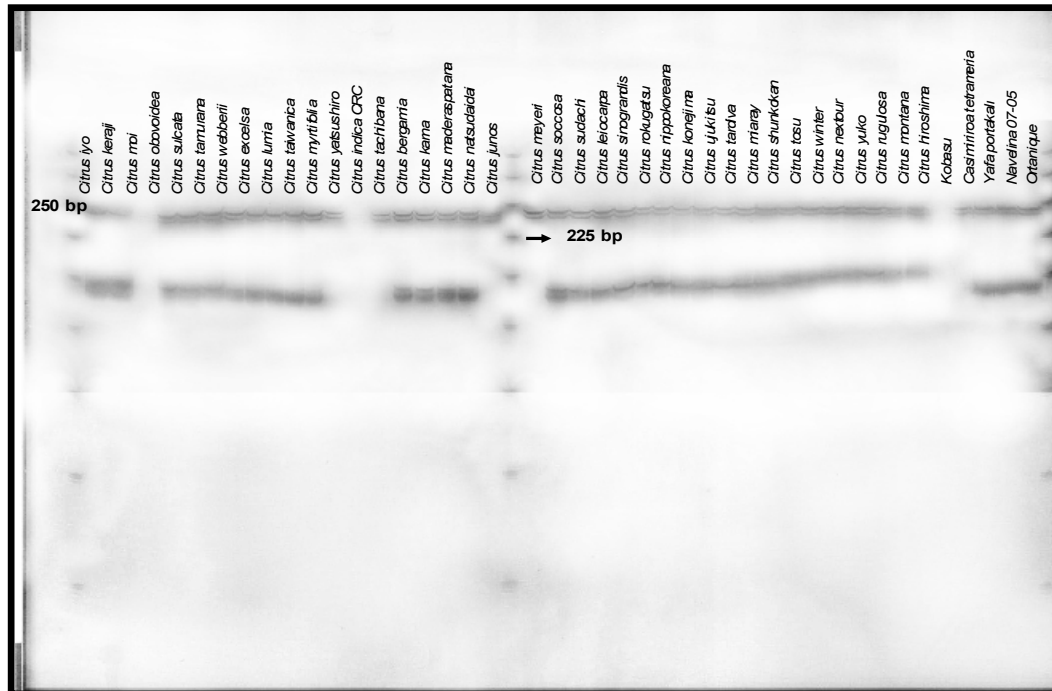
Şekil 4.5. 415 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



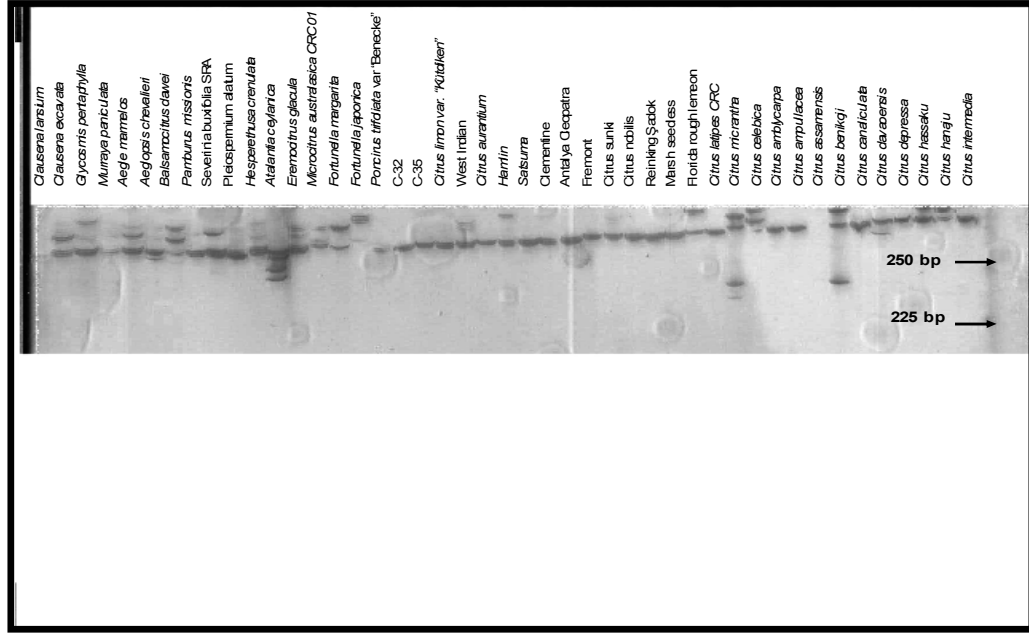
Şekil 4.6. 415 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



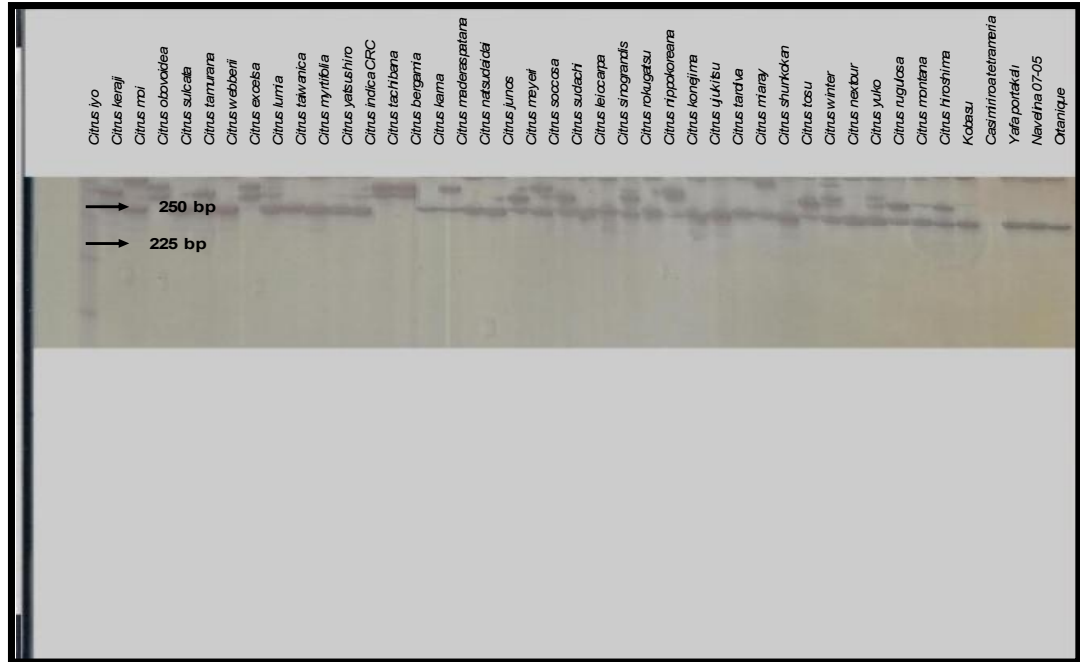
Şekil 4.7. 432 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



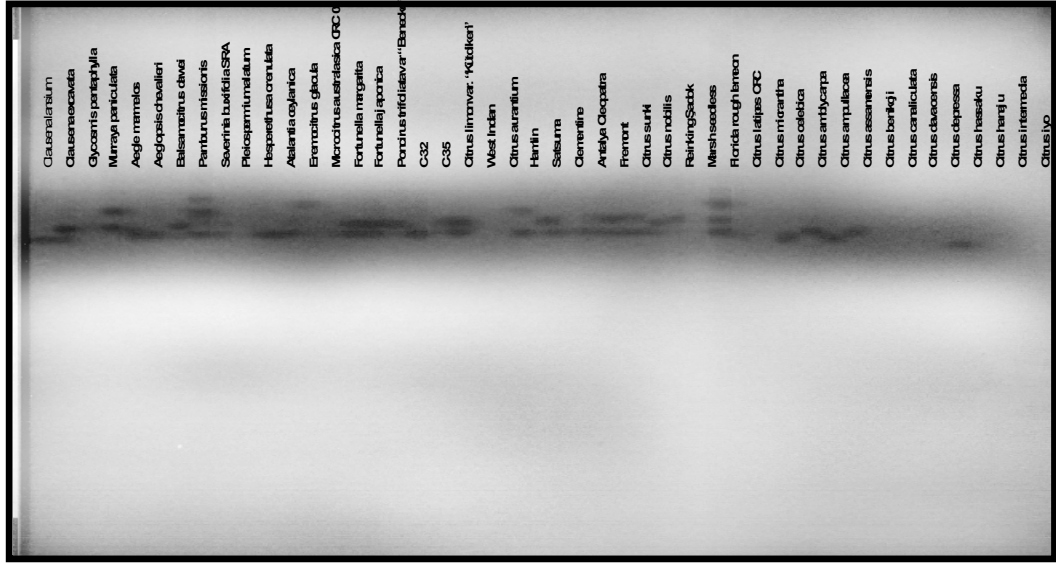
Şekil 4.8. 432 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



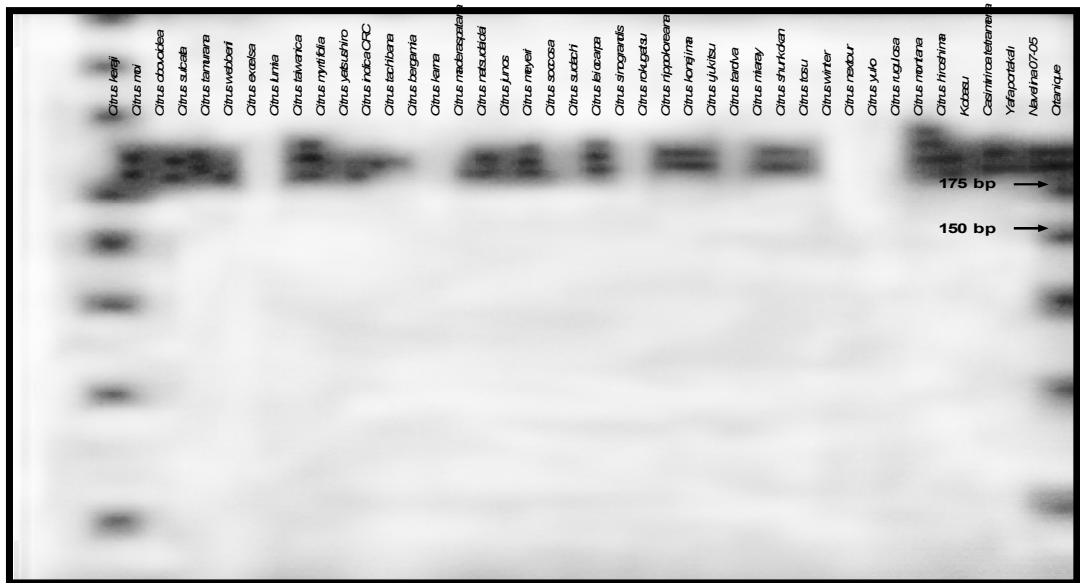
Şekil 4.9. 559 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.10. 559 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



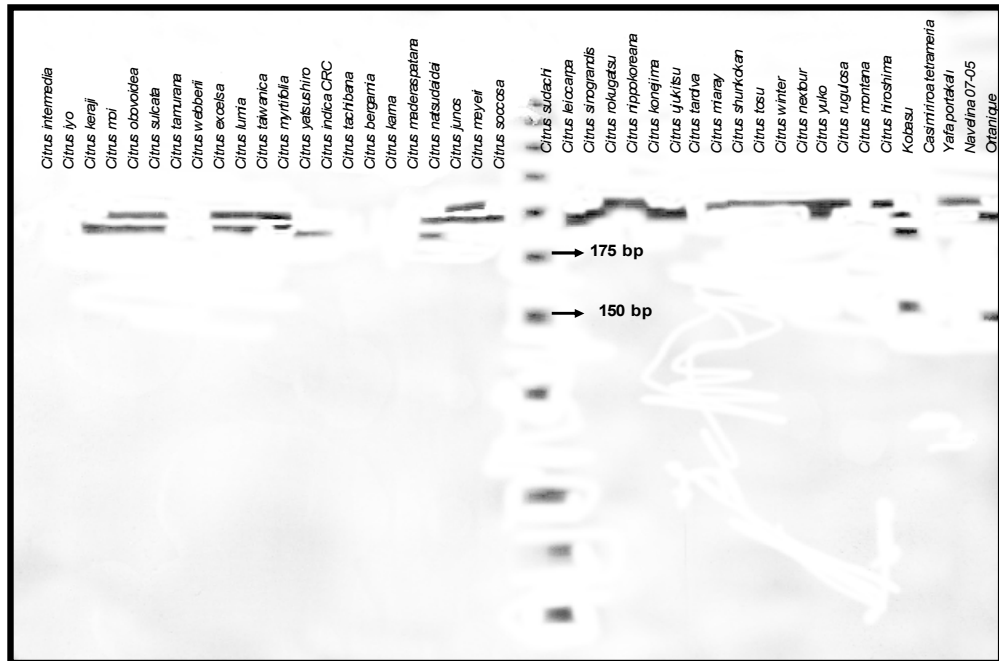
Şekil 4.11. 173 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.12. 173 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.13. 178 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.14. 83 no'lu SSR Primeri ile Amplifikasyon Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.

**4.1.2. SSR Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendogramın Değerlendirilmesi**

Analizler sonucunda elde edilen dendogram **Şekil 4.15.**'de görülmektedir. Dendogram önce iki ana gruba ayrılmıştır. 2 no'lu ana grupta *Clauseneae* soyu *Clauseninae* alt soyunda yer alan ve turunçgillere uzak akraba olan *Clausena lansium* yer almaktadır. Bu genotip diğer bütün turunçgil tür ve akrabalarına 0.69 oranında uzak bulunmuştur. Bu genotipe yakın olması gereken ve A.1. ve C.1.1. alt grubunda yer alan uzak akrabalarla aynı grupta yer almamıştır. Dendogramdaki 1 no'lu ana grup 1.1 ve 1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. 1.2 no'lu alt grupta bulunan ve *Citreae* soyunda ilkel turunçgil grubunda yer alan *Severinia buxifolia* ve turunçgillere uzak akraba olan *Pamburus missionis* 0.75 oranında birbirine yakın bulunurken bu iki genotip yakın turunçgiller grubunda yer alan *Atalantia ceylanica* 'ya 0.56 oranında benzer bulunmuştur.

1.1 no'lu alt grup kendi arasında 1.1.1 ve 1.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. 1.1.2 no'lu alt grupta *papeda* alt cinsinde yer alan *Citrus latipes* ve *Citrus clementina* yer almaktadır. Bu iki genotip 0.44 oranında yakın bulunmuştur.

1.1.1 no'lu alt grup 1.1.1.1 ve 1.1.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. 1.1.1.2 no'lu alt grupta *papeda* alt cinsinde yer alan *Citrus celebica* ve *Citrus assamensis* 0.77 oranında yakın bulunmuştur.

1.1.1.1 no'lu alt grup tekrar 1.1.1.1.1 ve 1.1.1.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. 1.1.1.1.2 no'lu alt grupta yer alan *Citrus mantana* ve *Kobasu* birbirlerine 0.67 oranında benzer bulunmuştur.

1.1.1.1.1 no'lu alt grup 1.1.1.1.1.1 ve 1.1.1.1.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. 1.1.1.1.1.2 no'lu alt grupta *papeda* alt cinsinde yer alan *Citrus micrantha* ve *Citrus benikoji* 0.56 oranında benzer bulunmuştur.

1.1.1.1.1.1 no'lu alt grup A ve B olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. B alt grubu B.1 ve B.2 olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır. B.1 alt grubunda gerçek turunçgil grubunda yer alan *Microcitrus australasica* (Australia finger lime) ve *Citrus nippokorennia* genotipleri 0.73 oranında benzer bulunmuştur. Bu alt grupta yer alan birbirine 0.70 oranında yakın bulunan *Fortunella margarita* (Nagami kamkatı) ve *Fortunella Japonica* (Marumi kamkatı)'ya benzerlik oranı 0.62 olarak

belirlenmiştir. B.2 alt grubunda yer alan *Citrus indica* ve *Citrus tachibana* 0.84 oranında benzer bulunmuştur.

A grubu A.1 ve A.2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. A.1 alt grubunda turunçgillere uzak akraba olan 4 tür yer almaktadır. *Clausena excavata* ve *Murayya paniculata* 0.72 oranında benzer bulunmuştur. Bu grupta yer alan *Balsamocitrus dawei* ve *Pleiospermium alatum* 0.69 oranında benzer bulunmuştur.

A.2 alt grubu A.2.1 ve A.2.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. A.2.2 alt grubunda toplam 4 genotip yer almaktadır. C-32 ve *Citrus limon* var. Kütdiken birbirlerine 0.78 oranında yakın bulunurken C-35'e 0.70 oranında, ayrıca bu üç genotip *Poncirus trifoliata* var. Beneke'ye 0.60 oranında yakın bulunmuştur.

A.2.1 alt grubu A.2.1.1 ve A.2.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. A.2.1.2 alt grubunda bir tane genotip yer almaktadır. *Citrus lumia* A.2.1.1 alt grubundaki genotiplere 0.55 oranında yakın bulunmuştur.

A.2.1.2 alt grubu A.2.1.1.1 ve A.2.1.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. A.2.1.1.2 no'lu bu alt grupta *Citrus aurantium* (Turunç), *Citrus reticulata* (Mandarin) ve *Citrus sinensis* (Portakal) genotipleri yer almaktadır. *Citrus aurantium* (Turunç) ve *Citrus sunki* (sunki mandarini) 0.74 oranında birbirlerine yakın bulunmuştur. *Citrus reticulata* var. Fremont bu iki genotipe 0.63 oranında, *Citrus amblycarpa* (nasnaran mandarini) ve *Citrus ujukitsu* 0.70 benzer bulunurken bütün bu alt gruptaki benzerlik oranı 0.60 olarak belirlenmiştir.

A.2.1.1.1 alt grubu C.1 ve C.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. C.2 alt grubunda bulunan *Citrus grandis* var. Reinking Şadok ve *Citrus ampullacea* 0.63, *Citrus canaliculata* ve *Citrus hassaku* 0.70 oranında benzer bulunmuştur. Bu alt grubun benzerlik oranı 0.62 olarak belirlenmiştir.

C.1 alt grubu C.1.1 ve C.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. C.1.1 alt grubu C.1.1.1 ve C.1.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. C.1.1.2 alt grubunda bulunan *Aeglopsis chevalieri* C.1.1.1 alt grubundaki genotiplere 0.62 oranında yakın bulunmuştur.

C.1.1.1 alt grubu C.1.1.1.1 ve C.1.1.1.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. C.1.1.1.1 alt grubunda turunçgillere uzak akraba olan *Glycosmis*



*pentaphylla* ve *Aegle marmelos* 0.85 oranında birbirine yakın bulunurken, *Citrus jambhiri* bu iki genotipe 0.75 oranında yakın bulunmuştur.

C.1.1.1.2 alt grubunda yer alan *Hesperethusa crenulata* ve *Eremocitrus glaula* 0.82, bu alt grubun diğer dalında yer alan *Citrus aurantifolia* var. West indian ve *Citrus sinensis* var. Hamlin 0.81 oranında benzer bulunurken bu iki dal birbirine 0.71 oranında yakın bulunmuştur.

C.1.2 alt grubu C.1.2.1 ve C.1.2.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. C.1.2.1 alt grubu C.1.2.1.1 ve C.1.2.1.2 no'lu alt gruplara ayrılmıştır. C.1.2.1.1 alt grubunda yer alan *Citrus unshiu* ve *Citrus davoensis* 0.70 oranında benzer bulunurken bu alt grubun C.1.2.1.2 alt grubuna benzerlik oranı 0.65 olarak belirlenmiştir.

C.1.2.1.2 alt grubunda yer alan *Citrus reshni* ve *Citrus sunki* (sunki mandarini) 0.80, *Citrus iyo* ve *Citrus moi* 0.78 oranında benzer bulunmuştur. *Citrus depressa* ise bu alt gruptaki genotiplerin tamamına olan benzerlik oranı 0.66 olarak belirlenmiştir.

C.1.2.2 alt grubu C.1.2.2.1 ve C.1.2.2.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. C.1.2.2.1 alt grubu D.1 ve D.2 olmak üzere tekrar iki alt gruba ayrılmıştır. D.1 alt grubu D.1.1 ve D.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. D.1.1 alt grubunda toplam beş genotip yer almaktadır. *Citrus intermedia* ve *Citrus leiocarpa* 0.88 oranında yakın bulunurken *Citrus sudachi* bu 2 genotipe 0.80 oranında yakın bulunmuştur. *Citrus junos*'un bu üç genotipe benzerlik oranı 0.78 olarak belirlenmiştir.

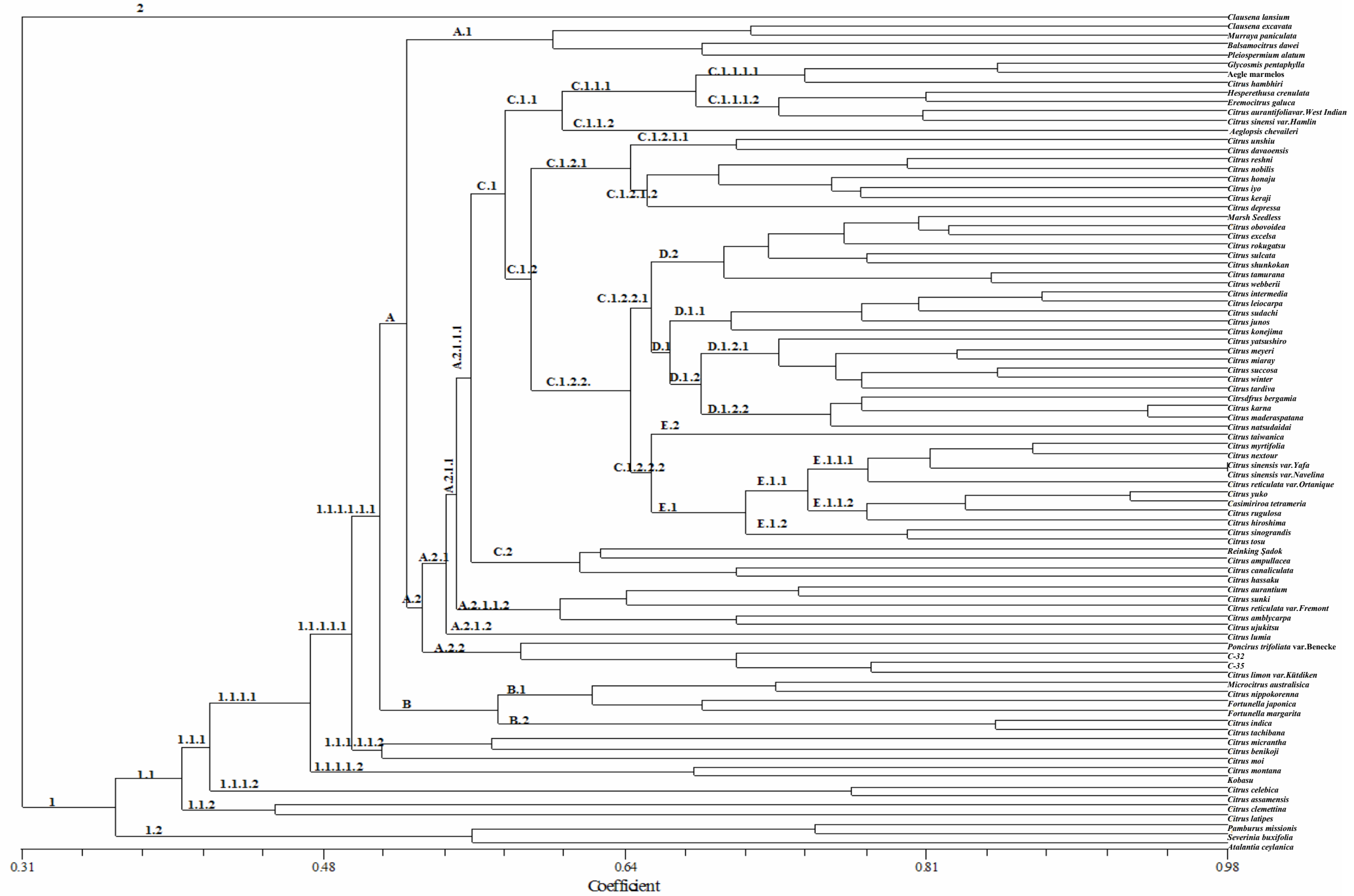
D.1.2 alt grubu D.1.2.1 ve D.1.2.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. D.1.2.1 alt grubunda altı adet genotip yer almaktadır. *Citrus meyeri* ve *Citrus miaray* 0.88 oranında, *Citrus saccosa* ve *Citrus winter* 0.85 oranında benzer bulunmuştur. *Citrus tardiva* bu grupta yer alan genotiplerin tamamına 0.73 oranında yakın bulunmuştur.

D.1.2.2 alt grubunda 4 adet genotip bulunmaktadır. *Citrus karna* ve *Citrus madereapatana* 0.93 oranında benzer bulunmuştur. Bu alt grupta yer alan *Citrus bergamia* (Bergamot) ve *Citrus natsudaikai* bu iki genotipe 0.77 oranında yakın bulunmuştur.

D.2. alt grubunda yer alan *Citrus obovoidea* ve *Citrus excelsa* 0.82 oranında yakın bulunurken *Citrus paradiasi* var.Marsh seedless bu iki genotipe 0.80 oranında yakın bulunmuştur. *Citrus sulcata*, *Citrus shunkokan* genotipleri 0.78 oranında, *Citrus tamurana*, *Citrus webberii* 0.85 genotipleri ise oranında yakın bulunmuştur.

C.1.2.2.2 alt grubu E.1 ve E.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. E.1 alt grubu E.1.1 ve E.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. E.1.1 alt grubu E.1.1.1 ve E.1.1.2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. E.1.1.2 grubunda yer alan *Citrus yuko*, *Casimiriroa tetrameria* genotipleri 0.92 oranında yakın bulunurken *Citrus rugulosa* bu iki genotipe 0.82 oranında yakın bulunmuştur. *Citrus hiroshima* ise bu üç genotipe 0.77 oranında yakın bulunmuştur.

E.1.1.1 alt grubunda beş genotip yer almaktadır. *Citrus myrtifolia* ve *Citrus nextour* 0.88 yakın bulunmuştur. Bu alt grubda yer alan *Citrus sinensis* var.Yafa ve Navelina % 100 oranında benzer bulunmuştur. Benzer bulunan bu iki genotip *Citrus reticulata* var. Ortanique mandarinine 0.77 oranında benzer bulunmuştur. E.1.2 alt grubunda yer alan *Citrus sinograndis* ve *Citrus tosu* 0.80 oranında yakın bulunmuştur.



Şekil 4.15. Turunçgil akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerin mikrosatellit analizi sonucu elde edilen dendrogram.

#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

**Aslıhan AĞAR**

**Şekil 4.16.** Turunçgil akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerin mikrosatellit analizi sonucu elde edilen benzerlik indeksi.

**4.2. TARTIŞMA**

Turunçgil taksonomisi ve filogenisi çok komplike ve karmaşıktır. Bunun en büyük nedeni turunçgillere yakın akrabalar arasında eşeysel uyuşmanın olması göz mutasyonlarındaki yüksek oran, kültivasyonda eski bir tarih ve geniş alana yayılmasıdır.

Geçmişte türler, cinsler arasındaki akrabalıklar morfolojik karakterlere dayandırılıyordu. Bu güne kadar en çok kabul gören sistematik Swingle ve Tanaka sistematığıdır.

Tez kapsamında çalışılan SSR primerleri ile elde edilen verilerin NTSYS programında yapılan analizler sonucunda oluşturulan dendogramda *Clauseneae* soyu, *Clauseninae* alt soyunda yer alan ve turunçgillere uzak akraba olan *Clausena lansium*, analizi gerçekleştirilen tüm genotiplere 0.31 oranında benzer veya yaklaşık %70 oranında uzak bulunmuştur. Elde edilen sonuç turunçgillere uzak akraba olan bu tür için beklenen bir sonuç olmakla beraber yine aynı tür içerisinde yer alan *Clausena excavata*, *Murraya* cinsi içerisinde yer alan *Murraya paniculata* ile aynı kolda yer almıştır. Bunun en önemli nedeni turunçgillere uzak akraba olan genotiplerin kullanılan SSR markırları ile istenilen kalitede amplifikasyon vermemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Genom içinde dağılan SSR bölgeleri yakın türlerde istenilen amplifikasyonu sağlamasına rağmen uzak türlerde istenilen kalitede amplifiye olmayan genotiplerde yapılan 9 puanlaması ile dendogramda beklenenden farklı bir dağılım gözlenmektedir.

SSR analizlerine göre yapılan bu çalışmada *Eremocitrus* ve *Microcitrus* *Citrus*'dan genel olarak farklı olduğu tesbit edilmesine rağmen *Citrus aurantifolia* var. West Indian ve *Citrus sinensis* var. Hamlin 0.71 oranında yakın bulurken diğer *Citrus* gruplarına 0.45 oranında uzak bulunmaktadır. **Herrero ve ark (1996), Federici ve ark (1998a)**, yaptıkları çalışmada *Eremocitrus* ve *Microcitrus*'un *Citrus*'dan farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç önceki yapılan çalışmaları tamamen destekler nitelikte değildir. *Microcitrus* ve *Eremocitrus*'un *Citrus*'lardan tamamen uzak olmadığı tespit edilmiştir. **Herrero ve ark (1996), Federici ve ark (1998), Barkley ve ark (2006)**, *Poncirus* 'un *Citrus*'lardan farklı fakat kamkatların

*Citrus*'lara yakın olduğunu ayrıca bu iki grubun en az karışıma sahip olduğunu belirtmişlerdir.

SSR analizlerine dayanarak yapılan bu çalışmada kullanılan *Fortunella japonica* ( Marumi kamkatı) ve *Fortunella margarita* (Nagami kamkatı)'nın birbirine yakın ve bir karışımın olmadığı ayrıca kamkatların *Citrus*'lara yakın olduğu tespit edilmiş ve yapılan önceki çalışmaları destekler nitelikte olmuştur. Yalnız, **Pang ve ark (2007)**, Turunçgil ve akrabaları arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak amacıyla yapmış oldukları çalışmada AFLP markırları kullanmışlar ve *Fortunella hindsii*'nin *Citrus*'lardan uzak olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar bu iki cinsin morfolojik olarak da çok farklı olduğunu vurgulamışlardır. Bununla beraber bazı araştırmacılar *Fortunella*'nın *Citrus*'larla iç içe geçtiğini belirtmişlerdir. **Herrero ve ark (1996)**, ve **Federici ve ark (1998b)**, izoenzim markırları ile **Nicolisi ve ark (2000)**, RAPD ve SCAR markırları ile **Pang ve ark (2003)**, SSR analizleri ile bu iki cinsin morfolojik olarak gözlenenden moleküler olarak daha az farklı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların bildirişleri tez kapsamında elde edilen bulgularla uyumludur.

Çalışmada kullanılan *Poncirus trifoliata* var. Beneke *Citrus*'lara genel olarak 0.46 oranında uzak bulunmasına rağmen *Citrus* cinsi içerisinde yer alan *Citrus limon* var. Kütdiken ile aynı alt grup içerisinde yer almıştır. Ortaya çıkan bu sonuç diğer yapılan çalışmalarla tam olarak uyuşmamaktadır.

*Citrus sinensis* (Portakal) en yaygın *citrus* türü olarak bilinmektedir. Portakal türü çeşit özelliklerine göre 4 ana gruba ayrılmıştır. Bu ana gruplar arasında fenotipik olarak farklılık bulunmasına rağmen yapılan birçok çalışmada bu farklılık tespit edilememiştir. **Herrero ve ark (1996)**, İzoenzim analizleri ile 58 portakal çeşidi arasındaki genetik farklılığı belirlemek için yaptıkları çalışmada portakal çeşitleri arasında genetik farklılığın olmadığını tespit etmişlerdir. **Luisa ve ark (1998)**, portakal çeşitleri arasında genetik farklılığı belirlemek amacıyla RAPD analizlerini gerçekleştirmiş. Elde edilen sonuçlara göre çeşitler arasında fenotipik farklılık bulunmasına rağmen genetik olarak farklılık olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. **Novelli ve ark (1998)**, Mikrosatellit primeri kullanılarak yaptığı analizlerde portakal çeşitleri arasındaki polimorfizmi belirlemeye çalışmışlar fakat polimorfizim

gözlememişlerdir. **Luro ve ark (1995)**, portakalların genetik olarak bir ‘‘biotip’’ olduğunu istenilen klonların seleksiyonu ve somatik mutasyonu sonucu olduğunu bildirmişlerdir.

*Citrus sinensis*’in (Portakal) *Citrus reticulata* (Mandarin) ve *Citrus grandis* (Pummelo) ‘in doğal hibridi olduğu fakat baskın olarak mandarin özelliği gösterdiği belirtmişlerdir (**Green ve ark., 1986**). Diğer yandan Portakal’ın %50 mandarin ve % 50 pummelo özelliği taşıdığını bildirmişlerdir (**Barret ve Rhodes 1976., Barkley ve ark., 2006, Nicolosi ve ark., 2000**).

SSR analizlerine dayalı olarak yapılan bu çalışmada kullanılan portakal çeşitleri mandarin ve pummelo’nun yer aldığı alt gruplar içinde kümelenmiştir. Fakat mandarine daha yakın olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuçta bize diğer çalışmaları destekler nitelikte olmuştur. Ayrıca kullanılan *Citrus sinensis* var. Yafa ve *Citrus sinensis* var. Navelina portakal genotipleri arasında hiçbir genetik farklılığın olmadığı tesbit edilmiştir. Bu iki genotip *Citrus reticulata* var. Ortanique mandariniyle aynı kümede yer almıştır. Bu sonuç bize portakalın mandarin hibridi olduğunu göstermektedir.

*Citrus reticulata* (mandarin) çeşitlerinden oluşan grup genellikle *Citrus unshiu*, *Citrus nobilis* ve bunların melezlerinden oluşmaktadır. Mandarin turunçgil türleri içerisinde en yüksek çeşitliliğin görüldüğü gruptur. Çeşitler arasında morfolojik olarak benzerlik olmasına rağmen genetiksel olarak büyük farklılıklar vardır (**Koehler-Santos ve ark., 2003** ).

**Luro ve ark (1995)**, Mandarin tür ve çeşidinde minisatellit analizi kullanarak yapmış olduğu çalışmada mandarinler arasında genetiksel olarak büyük bir çeşitliliğin olduğunu bildirmişlerdir. **Koehler-Santos ve ark (2003)**, mikrosatellit analizleriyle yaptıkları çalışmada *Citrus sunki* ve *Citrus reticulata* var.Ortanique ayrı alt gruplarda yer almıştır. Mandarinlerde yapılan kloroplast DNA çalışmalarında mandarinlerin tek bir bant verdiği belirlenmiştir. Bu da mandarinlerin tür statüsünü desteklemektedir (**Moore, 2001**).

Bizim yaptığımız bu çalışmada kullanılan bir mandarin olan *Citrus sunki* ve *Citrus reticulata* var.Ortanique birbirlerine uzak olduğu tespit edilmiş ve iki mandarin genotipi ayrı alt gruplarda yer almıştır. Önceki yapılan çalışmaları

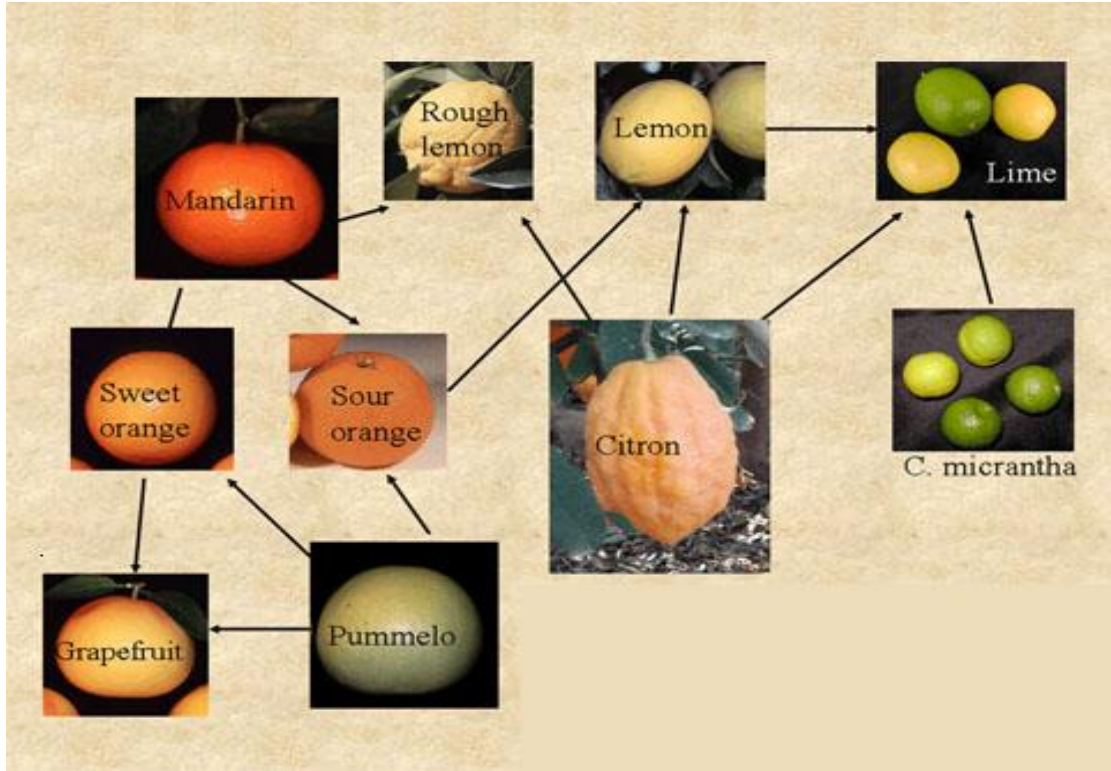
destekler nitelikte olmuştur. *Citrus reshni* ve *Citrus nobilis* (King mandarini) birbirlerine yakın olduğu tesbit edilmiştir. *Citrus clementina* mandarini diğer tüm mandarinlere uzak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada mandarin genotipleri arasında polimorfizm tesbit edilmiştir. Mandarinlerin turunç hibridi olduğu belirtilmektedir (**Koehler-Santos ve ark., 2003** , **Barkley ve ark., 2006**). Bu çalışmada ulaşılan sonuç mandarinlerin turunç hibridi olduğunu desteklemektedir. *Citrus aurantium* ve *Citrus sunki* (sunki mandarini) 0.75, *Citrus miaraya*, *Citrus succosa*, *Citrus tardiva* arasındaki benzerlik oranı 0.77 olarak belirlenmiştir. Bu benzerlikler sonucumuzu doğrulamaktadır.

*Citrus indica* Kuzeydoğu Asya'da yetişen yabani ve endemik bir türdür. *Citrus indica*'nın kültüre alınmış pek çok *Citrus* türünün atası olduğu düşünülmektedir (**Malik ve ark., 2006**). **Swingle ve Reece (1967)**, tarafından bir mandarin olarak sınıflandırılmasına karşın **Tanaka (1977)**, ayrı bir tür olarak sınıflamıştır. **Federici ve ark (1998b)**, Swingle'ın aksine *Citrus indica*'yı Ağaç kavunu (*Citrus medica*) grubuna dahil etmiştir. **Barkley ve ark (2006)**, *Citrus indicayı* Ağaç kavunu, kamkat, papada ve düşük oranda mandarin karışımı olabileceğini belirtmiştir.

Yapılan bu çalışmada *Citrus indica* kamkat, mandarin, laym-limon ve portakal ile aynı grup içerisinde yer almış ve bir çok türün karışımı olabileceğini göstermektedir.

**Moore (2001)**, Limonların lime'lar gibi kompleks bir hibrit olduğunu fakat daha fazla citron (Ağaç kavunu) genlerini taşıdığını bildirmektedir. Moleküler veriler limonun citron ve turunç hibriti olduğunu ve turuncun ana ebeveyn olduğunu göstermiştir.





Şekil 4.17. Önemli Turunçgil Türleri (Anonim, 2001).

Bu çalışmada kullanılan limon çeşitleri arasında genetik olarak farklılık polimorfim gözlemlenmiştir. Kullanılan bütün limonlar genellikle turunç genotipleriyle yakın bulunmuş bu sonuçlarda limonun atasının ağaç kavunu ve turunç olduğu sonucunu desteklemektedir (Gülsen ve Roose, 2001a). *Citrus meyeri* (meyeri limonu), *Citrus miaray*'a yakın bulunmuştur. *Citrus meyeri* *Citrus lumia*'ya oldukça uzak bulunmuştur. *Citrus assemensis* ise papeda alt cinsinde yer alan *Citrus celebica*'ya 0.77 oranında yakın bulunmuştur. Sonuç olarak limon genotipleri ayrı alt gruplarda yer almıştır. Aka-Kaçar ve ark (2005), RAPD yöntemiyle yaptıkları çalışmada kullanılan limon genotiplerinin birbirinden farklı olduğunu belirtmişlerdir.

*Citrus bergamia* (Bergamot) bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı gruplar içerisinde yer almıştır. Barkley ve ark (2006), turunç hibridi olabileceğini ayrıca limon ve ağaç kavunu karakterlerine sahip olduğunu belirtirken Nicolosi ve ark (2000), Bergamotu ağaç kavunu grubuna dahil etmişlerdir. Federici ve ark (1998a), turunç ve citronun (Ağaç kavunu) melezlemesi sonucu olduğunu

belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise *Citrus bergamia* 'nın turunc hibridi olduğu ayrıca limon karakterlerine sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. Çünkü *Citrus bergamia* *Citrus maderaspatana* 'ya 0.77 oranında yakın bulunmuş ayrıca *Citrus bergamia* 'nın bulunduğu alt grup içerisinde mandarin genotipleri yer almaktadır.

**Scora (1975)**, Rough lemon (*Citrus jambhiri*) mandarin ve ağaç kavunun doğal hibridi olduğunu belirtmiştir. **Federici ve ark (1998a)**, **Nicolosi ve ark (2000)**, mandarin grubunun aksine ağaç kavunu grubunda kümelemiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre *Citrus jambhiri* 'nin yer aldığı kümede turuncgillere uzak akrabalar bulunmaktadır. Fakat mandarin gruplarına 0.67 oranında yakın bulunmuştur. Bu sonuç bize mandarine daha yakın olduğu belirtmiştir. Önceki yapılan çalışmalarla tam olarak uyum göstermemiştir.

*Citrus miaray* ve *Citrus maderaspatana* turunc hibridleridir. Bunlar mandarin gruplarına dahil edilmişlerdir. Çalışmadan çıkan bu sonuç **Barkley ve ark (2006)**, SSR analizleriyle yaptığı çalışmayla bu sonuç desteklenmiştir.

Limon ve limelerin atası ile ilgili yapılan birçok çalışmada benzer ve farklı sonuçlar vardır. **Federici ve ark (1998b)**, limon ve lime'ların hepsini ağaç kavunu içerisinde gruplamışlardır. **Barret ve Rhodes (1976)**, ve **Scora (1975)**, limonların lime ve ağaç kavununun doğal hibridi olduğu belirtmiştir. **Gülşen ve Roose (2001b)**, limonun ağaç kavunu ve turunc'un doğal hibridi olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan limon genotipleri farklı alt dallarda yer almıştır. *Citrus meyeri* (meyeri limonu) ve *Citrus lumia* mandarin'lerin bulunduğu alt küme içerisinde yer alırken *Citrus limon var.* Kütdiken portakal ve üç yapraklı melezi olan C-32 ve C-35 ile aynı altgrup içerisinde yer almıştır. *Citrus assamensis* ise papeda alt cinsinde yer alan *Citrus celebica* 'la aynı grupta yer alarak 0.78 oranında benzer bulunmuştur. Bu çalışmada limonlar arasında polimorfizm tesbit edilmiştir. Limonların mandarin hibridi olabileceğini göstermektedir.

*Citrus maxima* (pummelo) gerçek *Citrus* türü olarak kabul edilmektedir ve turunc ve altıntopun doğal hibridi olarak ortaya çıkmıştır (**Scora 1975** , **Barret ve Rhodes 1976**). Bizim çalışmamızda kullanılan *Reinking şadok* altıntop ve turunclarla aynı alt grup içinde yer almıştır.

Bu çalışmada kullanılan üç yapraklı ve portakal melezi olduğu bilinen C-32 ve C-35 Citrange‘leri bu çalışma sonucunda oluşan dendogramda  yapraklıyla aynı alt küme içerisinde yer almıştır.

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Araştırmada *Aurantioideae* alt familyasında yer alan turunçgil ve akrabalarına ait cins, tür, çeşit'ler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek amacıyla SSR tekniği ve bu teknikte 20 ve 22 bp büyüklüğünde 15 adet SSR primeri kullanılmıştır. Kullanılan AC01, CT19 ve 105 no'lu primerler'de amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Turunçgil cins, tür ve akrabalarının benzerlik indeksleri 0.31 ve 0.98 arasında değişim göstermiştir. Primer başına düşen bant sayısı 4-14 arasında değişmiştir. Bantların uzunluğu 150 bp-300 bp arasında değişim göstermiştir.

Turunçgil cins, tür ve çeşitler arasındaki genetik ilişkiler tartışılmıştır. Elde edilen bulguların bazıları uyumlu bulunurken bazı sonuçlar daha önce yapılan taksonomik sınıflandırmadan farklı bulunmuştur.

Bu farklılıkların nedenini bulmak için daha fazla SSR primeri ile çalışmanın devam etmesi ve/veya farklı markır sistemleri ile tez kapsamında çalışılan primerlerle genomun farklı bölgelerinin taranması önerilebilir.

*Citrus maxima* genomik kütüphanesinden izole bu primerler bazı turunçgil uzak akrabaları ile istenilen amplifikasyonu vermemiştir. Bunun en büyük nedeni genomda benzer SSR bölgelerinin bulunmamasından kaynaklanabilir. Bu nedenle bu türlerle çalışılırken genom bilgisi gerektirmeyen farklı markır sistemleriyle çalışılması önerilebilir veya bu akrabalara ait genomik kütüphanelerden primer karakterizasyonu gerçekleştirilebilir

Sonuç olarak; bu tez kapsamında bu güne kadar kullanılmamış SSR primerleri ile ilk kez turunçgil genotiplerinin karakterizasyonu yapılmış ve türlere özgü spesifik bantlar bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- ANONİM, 1975. *Citrus* Ciba Geigy Agrochemicals. Ciba- Geigy Kld. Basle, Switzerland. 88 p.
- ANONİM, 2001. [www.plantbiology.ucr.edu/people/faculty/roose.html](http://www.plantbiology.ucr.edu/people/faculty/roose.html)
- ANONİM, 2005.. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- ANONİM, 2007. [www.scb.ucb.ca](http://www.scb.ucb.ca)
- ARDA, M., 1995. Biyoteknoloji. Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar, No: 1,s:198.
- AYRES, N.M., MCCLUNG, A.M., LARKIN, P.D., BLIGH, H.F.J., JONES, C.A., PARK, W.D., 1997. Microsatellite and a Single Nucleotide Polymorphism Differentiate Apparent Amylose Classes in an Extended Pedigree of US Rice Germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:773-781
- AKA-KACAR, Y., 2001. Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No: 640, Adana, TÜRKİYE.
- AKA-KACAR, Y., DEMİREL, A., TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., ULAŞ, M., YILDIRIM, B. 2005. Preliminary Results on Fingerprinting Lemon Genotypes Tolerant to Mal Secco (*Phoma tracheipfhila*) Disease by RAPD Markers. *Biologia*, Bratislava 60 (3): 295-300.
- BARKLEY, A.N., ROOSE, M.L., KRUEGER, R.R., and 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., and RHODES, A.M.A., 1976. Numarical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and its Close Relatives. *Syst.Bot.* 1:105-136.
- BLOCK, W., 1989. A Biochemical Perspective of Polymerase Chain Raaction. *Biochemistry*, 30: 2735-2747.

- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. and DAVIS, R.W., 1980. Construction of a Genetic Map in Man Using Restriction Fragment Length Polimorphisms. *American Journal of Human Genet.* 32:314-331.
- BROWN, S.M., M.S. HOPKINS, S.E. MITCHELL, M.L. SENIOR, BECKMANN, J.S., and SOLLER, M., 1996. Restriction Fragment Length Polimorphism and Genetic Improvemet of Agricultural Species. *Euphyt.* 35:111-124.
- BÜYÜKÜNAL BAL, E.B., 2003. Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2): 34-40
- COLETTA, H.D., MACHADO, M.A., TARGON, M.L.P.N., MOREIRA, M.C.P.Q.D.G., and POMPEU, J., 2000. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA to Evaluate the Genetic Variability of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions. *Genetic and Molecular Biology.* v.23, p.169-172.
- CORAZZA-NUNES, M.C., MACHADO, M.A., NUNES, W.M.C., CRISTOFANI, M., and 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: 169-176.
- DAVIES, F.S., and ALBRIGO, L.G., 1994. *Citrus*. Redwood Boks. Trowbridge, Wiltshire, Great Britain. 254s.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B., 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version 11. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1(4):19-21.
- DENG, Z. N., GENTILE, A., NICOLASI, E., DOMINA, F., VARDI, A., and TRIBULATO, E., 1995. Identification of *in vivo* and Lemon Mutants by RAPD Markers. *Journal of Horticultural Science.* 70(1): 117-125.
- DEVLET PLANLAMA TEŞKİLATI, 2001. Özel İhtisas Komisyonu Raporları, Ankara
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L., 1987. Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.

- DUNHAM, V.L. and BRYANT, J.A., 1983. In isolation of membranes and organells from plant cells (ed. J. L. Hall and A. L. Moore), p.237. Academic Pres, London.
- ERGÜL, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.
- ESEN, A., GERACI, G., 1976. Distribution of Coagulation of Young Shoot Homogenates in *the Aurantioideae*. Amer. J. Bot. 63(3): 329-334.
- FANG D.Q. and ROOSE M.L., 1997. Identification of Closely Related *Citrus* Cultivars With Inter-Simple Sequence Repeat Markers. Theor Appl Genet, 95:408-417.
- FEDERICI, C.T., FANG D.Q., SCORA, R.W., and ROOSE, M.L., 1998a. Phylogenetic Relationship within the Genus *Citrus* by RFLP Analysis. Theoretical and Applied Genetics. 96(6-7):812-822.
- FEDERICI, C.T., ROOSE, M.L., and SCORA, R.W., 1998b. RFLP Analysis of the Origin of *Citrus bergamia*, *Citrus aurantium* and *Citrus limonia*. Proceedings of First Intertional Symoposium on Citrus Biotechonology, 55-62.
- GREEN, R.M., VARDI, A., and GALUN, E., 1986. The Plastome of Citrus. Physical Map, Variation Among Citrus Cultivars and Species and Comparison with Related. Genera. Theo Appl Genet. 72:170-177.
- GOKSEL, Ç., 1999. RAPD Markerleriyle Bazı Mandarin Çeşitlerinin Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- GULSEN, O and ROOSE, M.L, 2001a. Lemons: Diversity and Relationships with Selected *Citrus* Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers.Amer. Soc. Hort. Sci. 126(3):309-317.
- GULSEN, O and ROOSE, M.L, 2001b. Choroplast and Nuclear Genome analysis of the parentage of lemons. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:210-215.
- GULSEN, O., 2000. Turunçgiller ve Taksonomik problemleri. Derim, 17 (2): 98-104.

- HAMADA, H., PETRINO, M.G., and KAKUNAGA, T., 1982. A Novel Repeated Element with Z-DNA Forming Potential is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 6465–6469.
- HERRERO, R., ASINS, M.J., PINA, J.A., and CARBONELL, E.A., 1996. Genetic Diversity in the Orange Subfamily Aurantioideae. 2. Genetic Relationships Among Genera and Species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (8):1327-1334.
- HODGSON, R.W., 1965. Taxonomy and Nomenclature in *Citrus* Fruits. ‘‘Advances in Agricultural Sciences and Their Applications’’. *Madras Agric. J.* 317-331.
- JANICK, J., and MOORE, J.N., 1975. *Advances in Fruit Breeding*. Purdue Univ.Press, 623 p., West Lafayette, Indiana, U.S.A.
- KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S., and THOMAS, M.R., 1995. An Evaluation of Sequence-Tagged Microsatellite-Site Markers for Genetic Analysis with Citrus and Related Species. *Genome*, 38:349- 355.
- KOEHLER-SANTOS, P., DORNELLES, A.L.C. and DE FREITAS, L.B., 2003. Characterization of Mandarin Citrus Germplasm from Southern Brazil by Morphological and Molecular Analyses. *Pesq. agropec. Bras.*, Brasilia, v. 38, n. 7, p. 797-806.
- LAVI, U., CREGAN, P., SCCHAP, T., and MILLEL, J., 1994. Amplification and Breeding of Perennial Fruit Crops. In J. Janick (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol:397-401.
- LISTON, A., RIESEBERG, L.H., ADAMS, R.P., and DO, N., 1990. *Ann. Missouri Bot. Garden* 77:859.
- LOWE, A.J, HANOTTE, O. and GUARINO, L., 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: the Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*.107:50-54.
- LUIZA, M., NATIVIDADE – TARGON, P., MACHADO, M.A., FILHO, H. and CRISTOFANI, M., 1998. Genetic Polimorfizm of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Varieties Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA. First Int. *Citrus* Biotechnology Symposium, 29 November 3 December 1998.



- LURO, F., LAIGRET, F., BOVE, J.M., and OLLITRAULT, P., 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to *Citrus* Genetics and Taxonomy. *Proc. Int Soc. Citriculture*, 1: 225-228.
- LURO, F., LORIEUX, M., LAIGRET, F., BOVE, J.M., OLLITRAULT, P., 1995. Genetic Mapping of an Intergeneric Citrus Hybrid Using Molecular Markers. *Fruits* 49:404–408.
- MACHADO, M.A., FILHO, H.D.C., TARGON, M.L.P.N., and POMPEU, J., 1996. Genetic Relationship of Mediterranean Mandarins (*Citrus delicosa* Tenore) Using RAPD Markers. *Euphytica*, 2(3): 92: 321-326,
- MALIK, S.K., CHAUDHURY, R., DHARIWAL, O.P., and KALIA, R., 2006. Collection and Characterization of *Citrus indica* Tanaka and Citrus macroptera Montr. : Wild Endangered Species of Northeastern India.
- MARINELLO, L., SOMMELLA, M.G., COZZOLINO, A., DI PIERRO, P., ERCOLINI, and D., PORTA, R., 2004. Identification of Campania *Citrus Imon* L. by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Food Biotechnology*. 18, no.3;p .289.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., and BUSS, G.R., 1995. Microsatellite and Amplified Sequence Length Polymorphisms in Cultivated and Wild Soybean. *Genome*, 38:715-723.
- MOORE, G., 2001. Oranges and Lemons: Clues to the Taxonomy of *Citrus* from Molecular Markers. *TRENDS in Genetics* Vol.17 No.9 September 2001
- MURRAY, H.G., and THOMSON, W.F., 1980. Rapid Isolation of High Molecular Weigh Plant DNA. *Nucleic Acid Res* 8:4321-4325.
- NEI, M., and LI, W., 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variance in Terms of Restriction Endonukleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5256-5273.
- NICOLOSI, E., DENG, Z.N., GENTILE A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., and TRIBULATO, E., 2000. Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Invetigated by Molecular Markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 100 (8): 1155-1166.

- NOVELLI, V.M., CRISTOFANI, M., and MACHADO, M.A., 1998. Evaluation of Microsatellite Markers in Cultivars of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Proceedings of First International Symposium on Citrus Biotechnology, 47-50.
- OLIVEIRA, A.C., GARCIA, A.N., CRISTOFANI, M., and MACHADO, M.A., 2002. Identification of *Citrus* Hybrids Through the Combination of Leaf Apex Morphology and SSR Markers. *Euphytica*, 128: 397-403,
- PANG, X.M., HU, C.G., and DENG, X.X., 2003. Phylogenetic Relationships Among *Citrus* and Its Relatives as Revealed by SSR markers. *Yi Chuan Xue Bao*. 30(1):81-7.
- PATERSON, A.H., 1996. Making Genetic Maps. IN: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*. Academic Press, New York, p.23-27.
- PYLE, M.M. and ADAMS, R.P., 1989. In situ preservation of DNA in plant specimens. *Taxon*. 38:576-581.
- RAFALSKI, J. A., and TINGEY, S. V., 1993. Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines. *TIG*, 9(8): 275-279.
- RODER, M.S., J. PLASCHKE, S.U. KÖNIG, A. BORNER, M.E. SORRELLS, S.D., TANKSLEY, M.W. GANAL, 1995. Abundance, Variability and Chromosomal Location of Microsatellites in Wheat. *Molecular General Genetics*, 246:327-332
- ROLF., F.J., 1992. NTYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.7. Applied Biostatistics, Setauket, N.Y.
- RUIZ, C., BRETO, M.P. AND ASINS, M.J.A., 2000. Quick Methodology to Identify Sexual Seedling in *Citrus* Breeding Programs Using SSR Markers. *Euphytica*, 112: 89-94,
- SCORA, R. W., 1975. Biochemistry, Taxonomy, and Evolution of Modern Cultivated Citrus. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, 1:277-289.
- SEKER, M., 1999. *Aurantioideae* Aİlfamİyasındaki Önemli Turunçgil Genotİplerinin Tanılanmasında Genom Büyüklükleri ve İzoenzim

- Analizlerinden Yararlanma Olanakları. Doktora Tezi (Yayınlanmamış) s: 1-15.
- SUGAWARA, K., OOWADA, A., MORIGUCHI, T and OMURA, M., 1995. Identification of *Citrus* Chimeras by RAPD Markers. Hortscience, 30(6): 1276-1278.
- SWINGLE, W.T., 1967. The Botany of Citrus and Its Relatives of the Orange Subfamily. In: H. J. Webber and L. D. Batchelor (eds). The Citrus Industry Vol. 1. Univ. Calif. Berkeley, Calif.
- SWINGLE, W.T., REECE, P.C., 1967. The Botany of *Citrus* and Its Wild Relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) The *Citrus* Industry, vol 1, 2nd edn. University of California, Berkeley, pp 190-430.
- TORRES, A.M., SOOST, R.K. and DIEDENHOFEN, U., 1978. Leaf Isozymes as Genetic Markers in *Citrus* . Amer. J. Bot. 65:869-881.
- TANAKA, T., 1969. Taxonomic Problem of Citrus Fruits in the Orient . Bull. Univ. Pres. Serie B. 21: 133-138.
- TANAKA, T., 1977. Fundamental Discussion of Citrus Classification. Stud. Citrol. 14:1-6.
- TARGON, M.L.P.N., MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H.D., and CRISTOFANI, M., 1998. Genetic Polimorphsim of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Varieties Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA. Proceedings of First International Symposium on Citrus Biotechnonology, 51-54.
- TUZCU, Ö. 2002. Turunçgil Lisans Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (Yayınlanmamış).
- YILDIRIM, A. and KANDEMİR, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları (S. ÖZCAN., E. GÜREL ve M. BABALOĞLU). Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s:334-336.
- WALTON, M., 1993. Moleculer Markers: Which ones to use? Seed World, July 1993, p: 23-29.

- WEBER, J.L. 1990. Informativeness of Human (dC-dA)*n*.(dG-dT)*n* Polymorphisms. *Genomics*, 7: 524–530.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFAELSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acid Res.* 18(22): 6531-6535,
- YAMAMOTO, M., KOBAYASHI, S., and NAKAMURA, Y., 1993. Phylogenetic Relationships of Citrus Revealed by RFLP Analysis of Mitochondrial and Chroloplast DNA. *Japanese Journal of Breeding*, 43(3): 355-365,
- YESILOGLU, T., 2002. Turunçgil Cins, Tür ve Akrabalarının RAPD Markırlarıyla Tanımlanması. TARP-2010 nolu TÜBİTAK Projesi Sonuç Raporu. (Yayınlanmamış).

## **ÖZGEÇMİŞ**

29 Ekim 1979 Adana’da doğdum, ilk,orta ve lise eğitimimi Adana’da tamamladıktan sonra 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim. 2002 yılında bu fakülteden mezun olduktan sonra 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümün’de yüksek lisans eğitimine başladım. 2005 yılında Biyoteknoloji Anabilimdalına geçiş yaptım halen bu bölümde yüksek lisans öğrencisiyim.