

**ÜÇ YAPRAKLI (*Poncirus trifoliata* L.) VE ÜÇ YAPRAKLI MELEZLERİ
GRUBU TURUNÇGİLLERİN GENETİK AKRABALIK VE
FARKLILIKLARININ SSR MOLEKÜLER MARKIRLARLA
TANIMLANMASI**

İlknur POLAT

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya, TURKEY

ÖZET

Çalışmada, seleksiyon, introduksiyon ve melezlemelerle elde edilmiş 59 adet üç yaprak tip/çeşidinin genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığı SSR (simple sequence repeat) moleküler markır tekniği kullanılarak incelenmiştir. Kullanmış olduğumuz 26 adet SSR primerinden 14 tanesi (TAA1, CAC19, TAA45, CT21, CAC33, CAC39, TAA33, CCT01, CAG01, CAT01, ATC09, TAA52, TAA15 ve CAGG9) polimorfik bulunmuştur. UPGMA (unweighted-pair group method with arithmetic average) ve PCA (principal component analysis) analizleri sonucu bireylerin birbirleriyle olan genetik yakınlıkları ve uzaklıkları belirlenmiştir. Dice'in benzerlik katsayısına göre benzerlik oranları 0.63-1.00 arasında değişim göstermiş, matriks korelasyon katsayısı 0.84 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranı *Poncirus Krides* SRA 339 ile *Poncirus SEAB B 6C - BB1* (SRA); *Poncirus Town* (SRA) ile *Poncirus Jacobsen B 6C - Z19* (SRA); *Poncirus Dwarf* (SRA) ile *Poncirus Yamaguchi B 6C - Z28* (SRA) arasında ve 1.00 (% 100) oranında olduğu tespit edilmiştir. *Glenn citrangedin* (CRC 3573) ise % 63 oranıyla 60 birey içerisinde en uzak bireyi oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Poncirus trifoliata* L.; SSR; Genetik kaynaklar; Moleküler markır

**DIVERSITY AND RELATIONSHIPS OF PONCIRUS (*Poncirus trifoliata*
L.) AND PONCIRUS HYBRIDS BY SSR MOLECULAR MARKERS**

ABSTRACT

In this study, genetic relationship and diversity were determined by SSR (simple sequence repeat) molecular markers technique among 59 *Poncirus* (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) types/cultivars derived from selections, introduction and hybridization. In this work, 14 SSR primers (TAA1, CAC19, TAA45, CT21, CAC33,

CAC39, TAA33, CCT01, CAG01, CAT01, ATC09, TAA52, TAA15 and CAGG9) of the used 26 SSR primers produced polymorphic fragments. Genetic relationship and distance were determined by using UPGMA (unweighted-pair group method with arithmetic average) and PCA (principal component analysis) analysis. The Dice's similarity coefficient among Poncirus and their hybrids accessions ranged from 0.63 to 1.00 and matrix correlation was 0.84. While Poncirus Krides SRA 339 - M and Poncirus SEAB B 6C - BB1 (SRA) in a group; Poncirus Town (SRA) and Poncirus Jacobsen B 6C - Z19 (SRA) in a different group; Poncirus Dwarf (SRA) and Poncirus Yamaguchi B 6C - Z28 (SRA) in a different group with 100% genetic similarity were determined. On the contrary, *Glenn citrangedin* (CRC 3573) 63% genetic similarity is the farthest among 60 Poncirus.

Keywords: *Poncirus trifoliata* L.; SSR; Genetic resource; Molecular marker

1.GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye'de büyük öneme sahip turunçgiller genellikle tohum, çelik ve diğer vegetatif yöntemlerle kolaylıkla çoğaltılabilirse de, özellikle başta hastalıklar olmak üzere, çeşitli toprak ve iklim koşullarına uyabilmeleri için anaç kullanılması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (Tuzcu vd. 1976). Ayrıca, turunçgillerde çekirdeksiz çeşitlerin tohumla çoğaltılmalarının olanaksızlığı, çeşit muhafazasında mutasyon eğilimleri, monoembriyonik çeşitlerin çok heterojen bir genetik yapıya sahip olmaları sonucu açılımların meydana gelmesi, anaç kullanımını gerektiren diğer etmenlerdir (Tuzcu vd. 2001). 1920'li yıllardaki Tristeza (Göçüren) salgını ve Florida'da meydana gelen don olayları sonunda dünyada turunçgil anaçları üzerine ciddi çalışmalar yapılmaya başlanmış ve değişik özellikte anaçlar ortaya çıkarılmıştır. Hastalık ve çevre şartlarına uyum yanında ağacı erken meyveye yatırmak, ağaç ömrünü uzatmak, verimi artırmak, sık dikim, meyve kalitesini yükseltmek gibi amaçlarla anaç kullanılmaktadır (Uzun, 2002).

Üçyapraklı portakal (trifoliate orange) (*Poncirus trifoliata* Raf.), dünyada en önemli turunçgil anaçlarındanidir. Phytophthora, Citrus Tristeza Virüsü, turunçgil kök ur nematoduna oldukça dayanıklı, düşük sıcaklıklara oldukça toleranslıdır (Jiang vd. 2006). Ülkemizde, Kuzeydoğu Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde üç yapraklı kullanılan tek anaç durumundadır. Ayrıca Geçit Ege bölgesi yani Büyük Menderes vadisinde turunç ve üç yapraklı karışık olarak kullanılmaktadır (Tuzcu vd. 2001).

Turunçgillerde, türler hatta cinsler arası melezlenmeler, poliembriyo, apomiksis oranı oldukça yüksektir. Ayrıca, morfolojik ve bazı kimyasal

özellikler çevre koşullarına ve ağacın gelişim dönemine göre değişiklik gösterebilmekte ve genotipler arasında karakterler bakımından varyasyon düşük olabilmektedir. Bu nedenle, genetik materyallerinin toplanması, toplanan materyallerin morfolojik, pomolojik, fenolojik, biyokimyasal özelliklerinin bilinmesinin yanında genetik özelliklerinin de bilinmesi çok önemlidir (Bretó vd. 2001, Corazza-Nunes vd. 2002, Barkley vd. 2006).

SSR (simple sequence repeats), 1-10 (genellikle 3-6) baz çifti arasında, kısa diziler halinde genomda rastgele dağılmış tekrar dizileridir. SSR markırlar, genomda bol olması, yüksek polimorfizm göstermesi, Mendel kalıtımına uygunluğu, kodominantlık ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olmasından dolayı, yakın akraba grupları içerisinde filogenetik sınıflandırmayı yapmak, parmakizi oluşturmak, gen kaynakları koleksiyonlarında genetik farklılıkları belirlemek amacıyla turunçgillerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Barkley vd. 2006, Jiang vd. 2006, Novelli vd. 2006, Tan vd. 2007).

Fang vd. (1997) 48 üç yaprak (*Poncirus trifoliata* (L.) çeşitlerini ayırt etmek amacıyla izoenzimler, RFLP ve ISSR markırları kullanmıştır. Barkley vd. (2006) turunçgil gen kaynaklarında bulunan 370 adet turunçgil içerisinde 10 adet üç yapraklıyı da değerlendirmişler ve SSR markırları kullanarak popülasyon yapısını ve genetik farklılığı tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, seleksiyon, introduksiyon ve melezlemelerle elde edilmiş 60 adet üç yaprak tip/çeşidinin genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığı SSR (simple sequence repeat) moleküler markır tekniği kullanılarak incelenmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullandığımız üç yapraklı ve üç yapraklı melezleri grubuna ait 59 çeşit/tiplerin DNA örnekleri, TÜBİTAK tarafından desteklenen 106G049 nolu proje kapsamında Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Bu turunçgillerin isimleri, turunçgil grubunun adı ve bulgular ve tartışmada yer alan dendrogram (Şekil 1) ve PCA analizindeki (Şekil 2) numarası Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Üç yapraklı ve üç yapraklı melezi grubu turuncgillerin isim listesi

| Numarası | Turuncgilin Adı | Numarası | Turuncgilin Adı |
|----------|---|----------|---|
| 60 | Rubidoux Ü. Y. (Riverside) | 31 | Montauban sitranji B 6C - BB 11 (SRA) |
| 2 | Yerli Ü. Y. (Rize) | 32 | Yuma sitranji B 6C - BB 19 (SRA) |
| 3 | Benecke Ü. Y. (6566 R) | 33 | Sitranj (Koethen Orange x Rubidoux Ü. Y.) (ABD) |
| 4 | Rubidoux Ü. Y. (3376 R) | 34 | Tuzcu M-2 sitranji |
| 5 | Poncirus Town (SRA) | 35 | 8 C 15.7 sitranji |
| 6 | Poncirus Luisi B 6C - CC 6 (SRA) | 36 | 11 C 80.8 sitranji |
| 7 | Poncirus Dwarf (SRA) | 37 | 8 C 15.5 sitranji |
| 8 | Poncirus Rich (SRA) | 38 | 8 C 15.16 sitranji |
| 9 | Poncirus Pomeroy B6 C - Z19 (SRA) | 39 | 8 C 14.7 sitranji |
| 10 | Poncirus Krides SRA 339 | 40 | 8 C 13.7 sitranji |
| 11 | Poncirus Jacobsen B 6C - Z19 (SRA) | 41 | 11 C 80.7 sitranji |
| 12 | Poncirus English B 6C - Z9 (SRA) | 42 | Uvalde sitranj (Newcomb) 17 a 58212 |
| 13 | Poncirus Christian B 6C - Z17 (SRA) | 43 | Sitranj Coleman (SRA) |
| 14 | Poncirus SEAB B 6C - BB1 (SRA) | 44 | C - 32 sitranji |
| 15 | Poncirus Davis (SRA) | 45 | C - 35 sitranji |
| 16 | Poncirus Ferme Blanche B 6C - BB3 (SRA) | 46 | Carrizo sitranji (3751 T) |
| 17 | Poncirus Flying Dragon (ABD) | 47 | Troyer 8 A 34.5 sitranji |
| 18 | Poncirus Rubidoux (Pln 428 - Lake Alfred) | 48 | Citremon 1449 |
| 19 | Poncirus Jacobsen (Pln 427 - Arec) | 49 | Citremon 1449 B2 - H1 - SRA |
| 20 | Poncirus Yamaguchi B 6C - Z28 (SRA) | 50 | Citremon 1449 (Newcomb) CRC |
| 21 | Yerli Ü. Y. (Rize) | 51 | 1449 SHRS Citremon |
| 22 | Poncirus Menager Carcan B 6C - Z1 (SRA) | 52 | Swingle sitrumelo (California) |
| 23 | Flying Dragon (Guadeloupe) | 53 | Sitrumelo 4475 |
| 24 | Morton sitranji (3510 R) | 54 | Sitrumelo 1452 (3505 R) |
| 25 | Troyer sitranji (3360 R) | 55 | Sacaton sitrumelo W. N. |
| 26 | Savagee sitranji (3512 R) | 56 | Swingle sitrumelo 4475 (Florida - ABD) |
| 27 | Rusk sitranji B 6C - BB 24 (SRA) | 57 | Sacaton sitrumelo (Newcomb) 26 a 5831 |
| 28 | Cunningham sitranji B 6C -BB 19 (SRA) | 58 | Glenn citrangedin (CRC 3573) |
| 29 | Etonia sitranji (B 1b - SRA) | 59 | Winter Heaven SRA Citrumelo |
| 30 | Kindia sitranji B 6C - BB 28 (SRA) | | |

2.2. Simple Sequence Repeats (SSRs) Primerleri

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

Çizelge 2. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri

| No | Lokus | F-Primer | R-Primer | Tekrar Motif |
|----|-------|---------------------------|-------------------------|--------------|
| 1 | TAA1 | GACAACATCAACAACAGCAAGAGC | AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC | TAA |
| 2 | TAA45 | GCACCTTTTATACCTGACTCGG | TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG | TAA |
| 3 | TAA52 | GATCTTGACTGAACTTAAAG | ATGTATTGTGTTGATAACG | TAA |
| 4 | CAC19 | ACAACCTTCAACAAAACCTAGG | AAGACTTGGTGCACAGG | CAC |
| 5 | TAA15 | GAAAGGGTTACTTGACCAGGC | CTTCCCAGCTGCACAAGC | TAA |
| 6 | TAA27 | GGATGAAAAATGCTCAAAATG | TAGTACCCACAGGAAGAGAGC | TAA |
| 7 | TAA41 | AGGTCTACATTGGCATTGTC | ACATGCAGTGTATAATGAATG | TAA |
| 8 | CAC23 | ATCACAATTACTAGCAGCGCC | TTGCCATTGTAGCATGTTGG | CAC |
| 9 | cAGG9 | AATGCTGAAGATAATCCGCG | TGCCTTGCTCTCCACTCC | AGG |
| 10 | TAA3 | AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC | GAGATGGGACTTGGTTCATCACG | TAA |
| 11 | CAC15 | TAAATCTCCACTCTGCAAAAGC | GATAGGAAGCGTCGTAGACCC | CAC |
| 12 | CAC33 | GGTGATGCTGCTACTGATGC | CAATTGTGAATTTGTGATTCCG | CAC |
| 13 | CAC39 | AGAAGCCATCTCTCTGCTGC | AATTCAGTCCCATTCCATTCC | CAC |
| 14 | TAA33 | GGTACTGATAGTACTGCGGCG | GCTAATCGCTACGTCTTCGC | TAA |
| 15 | CCT01 | TCAACACCTCGAACAGAAGG | CCCACATGCTAGCACAAAGA | CCT |
| 16 | GT03 | GCCTTCTTGATTTACCGGAC | TGCTCCGAACCTTCATCATTG | GT |
| 17 | CT02 | ACGGTGCGTTTTGAGGTAAG | TGACTGTTGGATTTGGGATG | CT |
| 18 | AC01 | TTTGACATCAACATAAAACAAGAAA | TTTTAAAATCCCTGACCAGA | AC |
| 19 | CAG01 | AACACTCGCACCAATCCTC | TAAATGGCAACCCAGCTTTG | CAG |
| 20 | CAT01 | GCTTTCGATCCCTCCACATA | GATCCCTACAATCCTTGGTCC | CAT |
| 21 | ATC09 | TTCTTATGTAATTGCTCTTTG | TGTGAGTGTGTTGTGCGTGTG | ATC |
| 22 | AG14 | AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA | CTTCCTCTTGCGGAGTGTTTC | AG |
| 23 | CTT01 | TCAGACATTGAGTTGCTCG | TAACCACTTAGGCTTCGGCA | CTT |
| 24 | CT21 | CGAACTCATTAAAAGCCGAAAC | CAACAACCACCACTCTCACG | CT |
| 25 | TC26 | CTTCCTCTTGCGGAGTGTTTC | GAGGGAAAGCCCTAATCTCA | TC |
| 26 | CT19 | CGCCAAGCTTACCACTCACTAC | GCCACGATTTGTAGGGGATAG | CT |

2.3. PCR reaksiyon ve amplifikasyon koşulları

Bütün PCR reaksiyonları 10 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon koşulları, Barkley vd. (2006)'nın yapmış oldukları çalışmadan bir takım modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Kullandığımız reaksiyon koşulu aşağıda verilmiştir. PCR bileşenleri olarak toplam hacim 10 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenlerden meydana gelecektir.

Reaksiyon koşulu 1.0 µl DNA (20 ng DNA), 1.0 µl dNTP (0.1 mM dNTPs), 1.0 µl MgCl₂ (2.5 mM MgCl₂), 0.2 µl *Taq* (0.6 U *Taq* DNA polymerase), 1.0 µl her bir primer (0.3 µM her bir primer), 1.0 µl (1X) PCR buffer ve 4.8 µl ddH₂O şeklinde olmuştur.

PCR programları da Barkley vd. (2006)'nın yapmış oldukları çalışmadan bir takım modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Primerlerin çalışma durumlarına göre 3 farklı PCR protokolü oluşturulmuştur. I. PCR protokolü, 94 °C'de 3 dk, ardından 35 döngü olacak şekilde, 94 °C'de 30 sn, 50 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1dk ve son olarak 72 °C'de 10 dk şeklindedir.

Bu protokolda TAA1, CAC19, TAA45, TAA3, CT21, CAC33, TAA27, CAC39, AC01, TAA33, CAC23, CCT01, CT19, CAG01, CAT01 ve ATC09 primerleri çalışmıştır. II. PCR protokolünde yapışma (annealing) 40 °C'dir ve TAA52, TAA15 ve CAGG9 primerleri çalışmıştır. III. PCR protokolünde yapışma (annealing) 55 °C'dir ve CAC15 primeri çalışmıştır.

PCR ürünleri % 2.5'lük yüksek çözünürlükteki agaroz jelde yürütülmüş ve 100 bp DNA markırı kullanılmıştır. Jel ethidium bromide ile boyanarak Kodak GelLogic 200 sistemi ile görüntülenmiştir.

2.4. Verilerin analizi

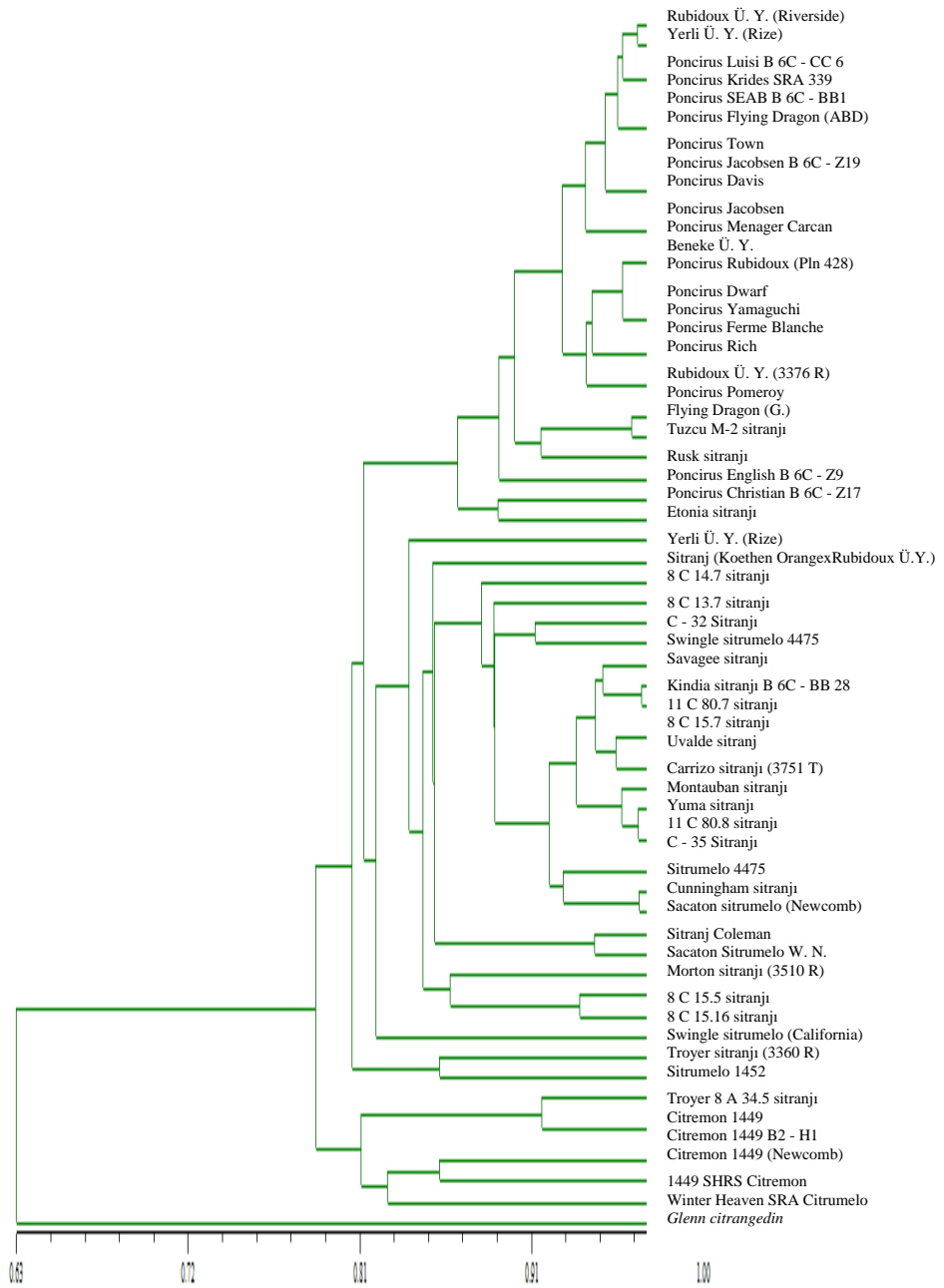
Jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilen görüntüler, bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek skor edildi.

Her bir genotip için oluşturulan SSR verileri NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1 Exeter Software, Setauket, N.Y., USA, Rohlf, 1993) bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlikler elde edilecek dendrogramlara göre belirlenmiştir. Benzerlik indeksleri Dice (1945)'e göre hesaplanmıştır. Ayrıca iki boyutlu grafik üzerinde genotipler arasındaki mesafeleri gösteren Temel Bileşenler Analizi (Principle Component Analysis=PCA) aynı program kullanılarak yapılmıştır.

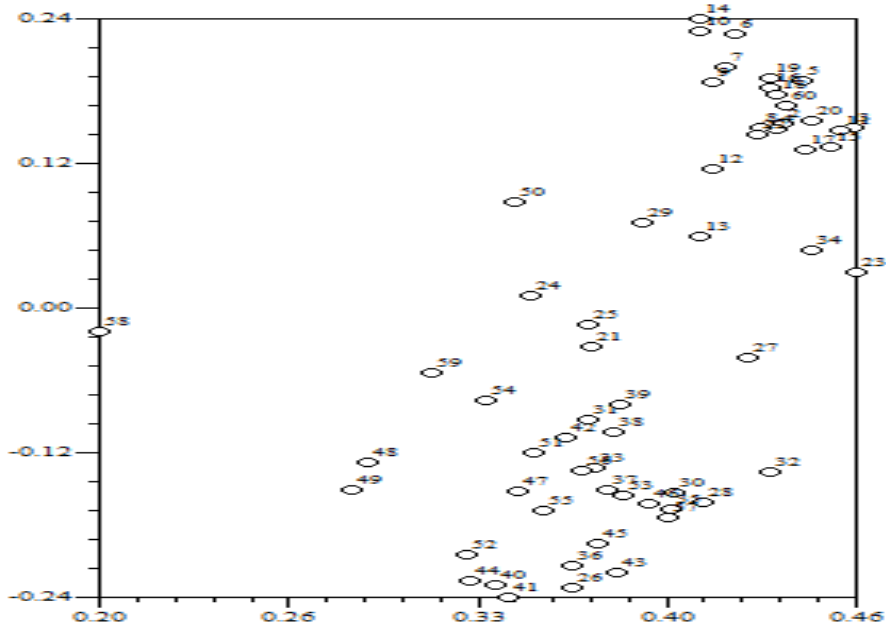
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

20 SSR primerinin 14 tanesinden (TAA1, CAC19, TAA45, CT21, CAC33, CAC39, TAA33, CCT01, CAG01, CAT01, ATC09, TAA52, TAA15 ve CAGG9) polimorfizm sağlanırken 6 tanesinde (TAA3, TAA27, AC01, CAC23, CT19 ve CAC15) monomorfik bant elde edilmiştir.

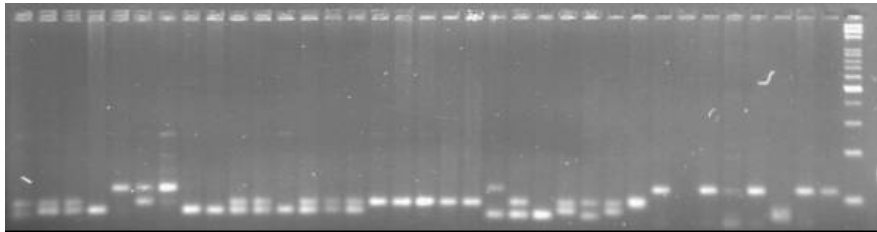
59 bireyin yer aldığı üç yapraklı ve üç yapraklı melezlerinin isimleri Çizelge 1'de verilmiştir. Aynı zamanda bu isimler numaralandırılarak dendrogramda (Şekil 1) ve 2 boyutlu düzlemde (Şekil 2) kullanılmıştır. Dendrogramdan da görüldüğü gibi, çeşitler arasında benzerlik oranı 1.00 ile 0.63 arasında değişim göstermiştir. Benzerlik oranı en yüksek Poncirus Krides SRA 339 ile Poncirus SEAB B 6C - BB1 (SRA) arasında; Poncirus Town (SRA) ile Poncirus Jacobsen B 6C - Z19 (SRA); Poncirus Dwarf (SRA) ile Poncirus Yamaguchi B 6C - Z28 (SRA) arasında ve 1.00 (% 100) oranında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Üç yapraklı grupları içerisinde yer alan 59 turunçgilin birbirleriyle olan % benzerlik oranını gösteren dendrogram (UPGMA)



Şekil 2. Üç Yapraklı Grupları İçerisinde Yer Alan 59 Turunçgilin Principle Component Analizi (PCA) Sonucu Göstermiş Olduğu Desen



Şekil 3. TAA52 primerinin üç yapraklı grupları içerisinde göstermiş olduğu band deseni

Glenn citrangedin (CRC 3573) ise 59 birey içerisinde en uzak bireyi oluşturmaktadır. Çeşitlerin birbiriyle olan yakınlık ve uzaklık durumlarına göre düzlem üzerinde dağılımlarına baktığımızda da bu durum çok net bir şekilde görülmektedir.

Poncirus'larda, *Citrus*'larda görülen tek yapraklılık özelliğinin tersine üç yapraklılık özelliği mevcuttur (Soost ve Cameron, 1975). Melezlemelerde zigotik bireyler, nuseller bireylerden daha kolay ayırt edilmesini sağlar. Yüksek polimorfizm elde edilmesinden dolayı, haritalama çalışmalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Weber vd. 2003, Şahin Çevik ve Moore, 2007, Chen vd. 2008).

Bununla birlikte, *Poncirus*'ün kendi içerisinde varyasyonu oldukça düşüktür. Dolayısıyla genetik yapıyı belirlemek daha zor olmaktadır. Düşük varyasyon gösterdiği, Fang vd. (1997) 48 üçyapraklı çeşidini ele alarak izoenzim, RFLP ve ISSR markır tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmada da tespit edilmiştir. Barkey vd. (2006) yapmış oldukları çalışmada, 370 adet farklı turunçgil gruplarına ait bireyleri SSR moleküler markır yardımıyla, popülasyon yapısını ve genetik farklılığı tespit etmişlerdir. Çalışmada üçyapraklıların (*Poncirus*) diğer turunçgil gruplarına (*Citrus*) göre farklı bir grupta yer aldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, üçyapraklıların kendi içerisinde düşük varyasyon gösterdiklerini belirlemişlerdir. Fakat SSR markırlar oldukça fazla bilgi vericidir ve kodominanttır. Dolayısıyla, genetik koleksiyonda genetik farklılığı belirlemede, parmakizi oluşturmada, akrabaları arasında filogenetik ilişkiyi belirlemede oldukça uygun markır sistemidir.

SSR markırların bu avantajı çalışmamızda da görülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada üçyapraklıların yanısıra melezleri de ele alınmıştır. Üçyapraklılar ile melezleri arasında farklı grup oluşmuştur. Ayrıca, üçyapraklı melezlerinden sitremonlar, sitrumelo ve sitranjlara göre üçyapraklılara daha uzak olarak bulunmuştur.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, moleküler markır sistemlerinden SSR'lar kullanılarak, *Aurantioideae* altfamilyasına ait 59 adet *Poncirus* ve akrabalarının genetik farklılığı ve birbiriyle olan genetik yakınlığı başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Kodominant markır olan SSR'lar, üçyapraklıların tanımlanmasında kullanılabileceği bu çalışmayla da görülmüştür.

Teşekkür

Çalışma, 106G049 nolu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, genetik analizler Dr. Münevver GÖÇMEN tarafından yapılmıştır. Katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T. 2006. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs), *Theor Appl Genet*, 112: 1519–1531.
- Bretó, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A., Asíns, M.J. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21:285-93.
- Chen, C., Bowman, K.D., Choi, Y.A., Dang, P.M., Rao, M.N., Huang S., Soneji, J.R., McCollum, T.G., Gmitter, F.G. 2008. EST-SSR Genetic Maps For Citrus Sinensis And Poncirus Trifoliata. *Tree Genetics & Genomes* 4:1–10
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M., Targon, M.L.P.N. 2002. Assessment of Genetic Variability in Grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and Pummelos (*C. maxima*(Burm.) Merr.) Using RAPD and SSRs Markers. *Euphytica* 126:169-76.
- Dice, L.R., 1945. Measures of The Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 26:297-302.
- Fang, D.Q., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T. 1997. Fingerprinting Trifoliolate Orange Germplasm Accessions with Isozymes, RFLPs, and Inter-simple Sequence Repeat Markers. *Theor Appl Genet* 95:211–219
- Jiang, D., Zhong, G-Y., Hong, Q-B. 2006. Analysis of Microsatellites in Citrus Unigenes. *Acta Genetica Sinica*, 33 (4): 345-353
- Novelli, V.M., Cristofan, M., Souza, A.A., Marcos, A., Machado, M.A. 2006. Development and Characterization of Polymorphic Microsatellite Markers for The Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1, 90-96.
- Rohlf FJ., 1993. NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York.
- Roose, ML., 2009. Use of Molecular Markers to Understand Phylogeny and Genetic Diversity of Citrus. PCR Primers for Citrus Germplasm Characterization. <http://www.plantbiology.ucr.edu/faculty/roose.html>.
- Soost, R.K., Cameron, J.W. 1975. Citrus. In: Janick J, Moore JN (eds) *Advances in fruit breeding*. Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA, 507–540
- Şahin Çevik M., Moore, G.A. 2007. Construction of a Genetic Linkage Map of Citrus with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Using a Progeny Population from a Complex Intergeneric Cross. *Turk J Bot* 31 79-86.
- Tan, M-l., Song, J-K., Deng, X-X. 2007. Production of Two Mandarin Trifoliolate Orange Hybrid Populations Via Embryo Rescue with Verification by SSR Analysis. *Euphytica* 157:155–160.
- Tuzcu, O., Erkan. O., Ozsan, M. 1976. Turunçgil Fidanı Üreten İşletmelerimizin Teknik ve Ekonomik Faaliyetleri Üzerinde Bir Araştırma. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 128, Ankara Üniversitesi Basımevi, Adana. 72 s.

- Tuzcu, Ö., Yesilglu, T., Yildirim B. 2001. Citrus 2001 Reports : Turkey. Florida Grower Annual Edition. Mid.
- Uzun, A. 2002. Turunçgil Anaçları. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, ALATA Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Yayınları.
- Weber, C.A., Moore, G.A., Deng, Z., Gmitter, F.G. 2003. Mapping Freze Tolerance Quantitative Trait Loci in a *Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata* F1 pseudo-testcross Using Molecular Markers. J Amer Soc Hort Sci 128: 508-514.