

BAZI TURUNÇGİL TÜRLERİNE UYGUN RAPD MARKÖRLERİN BELİRLENMESİ

MÜNEVVER GÖCMEN* CAHİT ÇAKIR** İLKNUR POLAT*

* Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, 07100, Antalya/TÜRKİYE

**Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Antalya/TÜRKİYE

ÖZET

Citrus cinsine ait farklı türler ile poncirus cinsi arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek ve bu cins ve türlere ait moleküler markörler oluşturmak amacı ile yapılan bu çalışmada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) moleküler tekniği kullanılmıştır. Çalışmada, 'Pixie' mandarini (*Citrus reticulata* Blanco), 'Navelina' portakalı (*Citrus sinensis* Osb.), 'Star Ruby' altın topu (*Citrus paradisi* Maef) ile Flying Dragon (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf) materyal olarak kullanılmıştır. Yirmi farklı tesadüfi nükleotid diziliminden oluşan 10 mer'lik (bazlık) RAPD primerlerinin (Operon F) kullanıldığı çalışmada, primerlerin 4 tanesinde (OF-17, OF-18, OF-19 ve OF-20) hiç DNA amplifikasyonu gerçekleşmemiş, diğer 16 primerde ise monomorfik ve polimorfik bant sayısı sırasıyla 40 ve 125 olarak bulunmuştur. Özellikle anaç olarak kullanılan Flying Dragon farklı olarak oluşturduğu çok sayıdaki polimorfik DNA bantları ile diğer turunçgil türlerinden kolaylıkla ayrılmıştır. Araştırma bulguları, elde edilen polimorfik DNA bantlarının tekrarlanabilir olduğunu, *Citrus* cinsine ait türlerde ve *Poncirus* cinsinde RAPD tekniğinin kolaylıkla uygulanabileceğini göstermiştir. Benzerlik oranı indeksine göre birbirine en uzak (%21) 'Pixie' mandarin çeşidi ile Flying Dragon bulunurken, en yakın (%56) 'Pixie' mandarin çeşidi ile 'Navelina' portakal çeşidi bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, RAPD, Moleküler Markörler

DETERMINATION OF RAPDS MOLECULAR MARKERS FOR CITRUS SPECIES

ABSTRACT

In this study, RAPD molecular technique was used in order to determine genetic similarity and obtain molecular markers for some citrus species (mandarin, orange, grapefruit and Flying Dragon (a kind of *Poncirus* spp.)). For this aim, 20 RAPD primers (OP-F), each of which consisted of 10 nucleotide bases, were used. While a total of 125 polymorphic DNA bands were obtained by 16 primers, 40 monomorphic bands were found by 4 primers and no DNA synthesis was materialized by 4 of that. Each of four species was established as different at the DNA level. The rate of the less genetic similarity was found as 21% between Flying Dragon and 'Pixie' species while the rate of the most genetic similarity was determined as 56% between 'Pixie' (mandarin) and 'Navelina' (orange).

Keywords: Citrus, RAPD, Molecular Markers

1.GİRİŞ

Çok geniş bir familyaya sahip olan turunçgiller, tür ve çeşit bazında birbirleri ile genetik olarak çok yakın akrabalık ilişkilerine sahiptirler. Bazı önemli meyve özellikleri mutasyonlar ile kolaylıkla değişebilmektedir. Birçok değişik faktörler ile kolaylıkla çeşit farklılığı oluşabilen turunçgillerde, morfolojik özellikler kullanılarak birçok turunçgil tür ve çeşidini ayırmak zor ve zaman almaktadır. Çünkü turunçgiller, dikimden 2-3 yıl sonra meyve vermeye

başlamaktadır. Turunçgillerde tür ve çeşitlerin kısa sürede tanımlanması, turunçgil ıslahçısına, üreticisine ve yetiştiricisine merak ettiği konularda bilgi vermesi yönünden oldukça önem arz etmektedir. PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniğinin kullanılması ile küçük miktardaki yaprak ya da doku örneği ile DNA düzeyinde analiz yapılarak istenilen bilgiler kolaylıkla elde edilebilmektedir. Ayrıca turunçgil ıslahçısının, patent hakları da DNA analizleri ile korunmuş olacaktır.

Turunçgil tür ve çeşitlerini DNA düzeyinde belirlemek için bir çok moleküler yöntem kullanılmıştır (Roose, 1988; Deng ve ark., 1995; Kijas ve ark., 1995; Luro ve ark., 1995; Göçmen ve ark., 1999). Tür ve çeşit ayrımlarında, önceleri izoenzim analizleri kullanılmış, fakat bu yöntem mutasyon ile oluşan farklılıkları belirlemede yetersiz kalmıştır (Roose, 1988; Herrero ve ark., 1996). RFLP, turunçgillerde tür ve çeşit ayrımında genom haritalamalarında uzun yıllar oldukça etkili bir yöntem olarak uygulanmıştır (Roose, 1988). Ancak RFLP'de DNA'ların enzim ile kesilme gerekliliği, radyoaktif esaslı olması, uygulamadaki zorluğu ve pahalılığı alternatif bir metot olan PCR esaslı RAPD moleküler tekniğinin geliştirilmesine neden olmuştur (Williams ve ark., 1990). RAPD turunçgillerde tür ve çeşit ayrımlarında RFLP'ye göre daha kısa sürede etkili sonuçlar verebilmektedir (Rajapakse ve ark., 1995).

Bu çalışmada, *Citrus* cinsine ait 3 farklı tür ile *Poncirus* cinsine ait 1 türde RAPD markörler oluşturulmuş ve turunçgiller için uygun primerler belirlenmiştir.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Bitkisel materyal

Yaprak örnekleri, Antalya Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü koleksiyon parselinde bulunan 'Pixie', 'Navelina', 'Star Ruby' çeşitlerinden taze yaprak örnekleri alınmıştır. Flying Dragon anacına ait DNA ise Wye College Moleküler Biyoloji laboratuvarından alınmıştır

2.2.DNA izolasyonu

0.5-1.0 g'lık taze yaprak örnekleri sıvı azotta ezilmiş ve izolasyon, Ainsworth ve ark. (1996)'nın yöntemine göre yapılmıştır. İzole edilen DNA'lara 150 µl TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0) eklenmiş ve kullanma aşamasına kadar +4 °C'de bekletilmiştir. DNA konsantrasyonu %0.8'lik agaroz jelde ayrıştırılmıştır.

2.3.DNA sentezlenmesi

PCR ile DNA sentezlenmesi Williams ve ark. (1990)'a göre modifiye edilerek yapılmıştır. PCR işleminde tesadüfi nükleotid diziliminden oluşan 10 mer'lik 20 primer kullanılmıştır (OP-F). DNA sentezleme reaksiyon hacmi 30 µl (25 ng DNA, 10.5 ng primer, 0.2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM PCR buffer ve 1 unite taq polymerase enzimi (promega))'ye ayarlanmıştır. Üç aşamada DNA sentezlenmesi gerçekleşmiştir. Birinci aşamada, 96°C 'de 6 dak., ikinci aşamada, 95°C'de 30 sn., 35°C'de 30 sn. ve 72°C'de 60 sn. 45 döngü, üçüncü aşamada, 72 °C'de 10 dak.'dır. PCR ürünleri, %1.5 agaroz jelde ayrıştırılmıştır ve ethidium bromid ile boyanarak UV ışık kaynağında resimlenmiştir.

2.4.DNA bantlarının değerlendirilmesi

Turunçgil türlerini temsilen alınan 3 turunçgil çeşidi ile Flying Dragon anacında, farklı RAPD primerlerinde ortaya çıkan DNA bantları birbirleri ile karşılaştırılmış mono ve polimorfik DNA bantları belirlenmiştir. Çeşitlerin oluşturduğu bant desenleri birbirleri ile karşılaştırılarak benzerlik indeksi yüzde olarak çıkartılmış ve UPGMA (Unweighted pair-group method of the arithmetic average) metodu esas alınarak dendogram oluşturulmuştur. RAPDs için PCR çalışması 3 kez

tekrarlanarak bantların tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir.

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

Üç farklı turunçgil türüne ait çeşitler ile bodur anaç özelliği gösteren Flying Dragon, tesadüfi nükleotid diziliminden oluşan 10 mer'lik RAPD primerleri ile genom taraması yapılmıştır. Dört primerde (OF-17, OF-18, OF-19 ve OF-20) DNA amplifikasyonu gerçekleşmemiş, diğer 16 primerde ise toplam 165 DNA bandı elde edilmiş, monomorfik ve polimorfik bant sayısı sırasıyla, 40 ve 125 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 1, Şekil 1). Polimorfik bant sayısının, monomorfik bant sayısına göre 1/3 oranında fazla olması bu üç turunçgil türü ile Flying Dragonun genetik olarak birbirlerinden uzak olduğunu göstermektedir

Türler arası genetik benzerlik oranı %21.13–56.00 arasında değişim göstermiştir. Özellikle 'Pixie' mandarin çeşidi ile Flying Dragon arasında benzerlik oranı en uzak bulunmuştur (%21) (Çizelge 2). Moleküler belirteçler kullanılarak analiz edilen organizmalarda tür içi genetik benzerlik oranı %80-100, türler arası benzerlik oranı da %0-30 arasında bildirilmiştir (Perring ve ark., 1993). Bu çalışmada, üç tür arasında genetik benzerlik oranı %39-56 arasında, Flying Dragon ile üç tür arasında ise daha düşük değerlerde (%21-40) bulunmuştur.

Çizelge 1. Farklı RAPD primerlerinin 4 turunçgil türünde oluşturduğu mono ve polimorfik DNA bant sayıları

Primer	Monomorfik	Polimorfik
OF-1	3	6
OF-2	3	9
OF-3	3	7
OF-4	1	8
OF-5	1	9

OF-6	6	9
OF-7	2	7
OF-8	3	7
OF-9	1	12
OF-10	2	11
OF-11	1	7
OF-12	3	11
OF-13	6	3
OF-14	1	9
OF-15	2	5
OF-16	2	5
Toplam	40	125

Çizelge 2. Turunçgil türlerinin oluşturduğu genetik benzerlik indeksi (%)

	Pixie	Navelina	S.Ruby	F.Dragon
Pixie	-			
Navelina	56,00	-		
S.Ruby	39,66	43,40	-	
F.Dragon	21,13	40,00	33,28	-

Araştırmada kullanılan 3 farklı turunçgil türüne ait çeşitler ile Flying Dragon anacının oluşturduğu dendogram Şekil 2 gösterilmiştir. Bu şekil incelendiğinde, türler arasında %32-56'lık bir genetiksel ilişkinin var olduğu görülmektedir. 'Pixie' mandarin çeşidi ile 'Navelina' portakal çeşidi arasında yaklaşık %56'lık bir genetiksel ilişki bulunurken, bir mutant çeşit olan 'Star Ruby' altıtopu ile mandarin ve portakallar arasında yaklaşık %33'lük bir genetiksel ilişkinin var olduğu belirlenmiştir. Flying Dragon diğer tüm türlerle %32'lik gibi bir genetiksel ilişki göstermiştir.

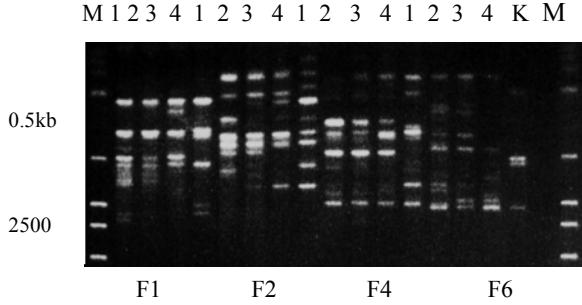
Farklı primerlerden elde edilen DNA bant uzunlukları 300-2600 bp arasında değişmiştir (Şekil 1).

Ülke ekonomisi için büyük önem arz eden meyve yetiştiriciliğinde turunçgillerin tür ve çeşit tespiti, ıslah çalışması aşamasından başlayıp üretici bazına kadar gereksinim duyulan bir durumdur.

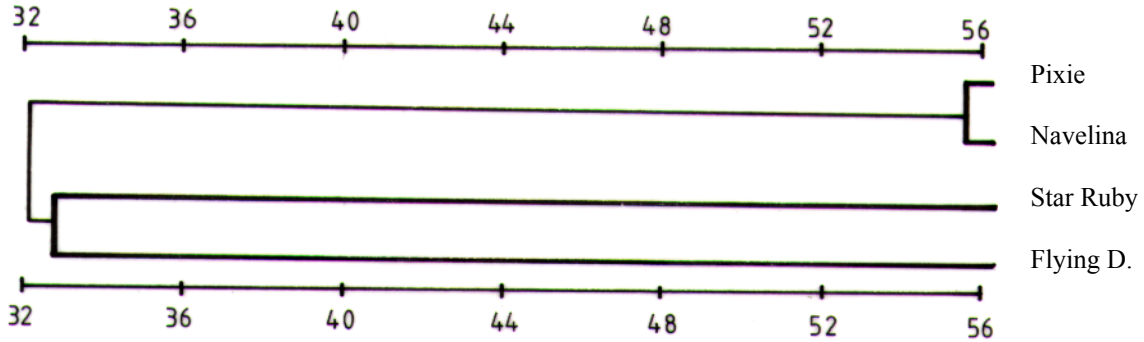
Yapılan bu çalışma sonucunda da üç farklı turunçgil türlerine ait ve bodur

anaç özelliği gösteren Flying Dragona uygun RAPD moleküler belirteçler (markörler) belirlenmiş ve

turunçgiller için uygun RAPD primerler tespit edilmiştir.



Şekil 1. Farklı RAPD primerlerinde elde edilen DNA bantları(1; 'Pixie', 2; 'Navelina', 3; 'Star Ruby', 4; Flying Dragon, K:Kontrol, M:Markör 1kb, F1:OP-F1, F2: OP-F2, F4: OP-F4, F6: OP-F6 Primerleri)



Şekil 2. Turunçgil türlerinde oluşturulan dendrogram (Cluster analizine göre)

KAYNAKLAR

Ainsworth C., J. Beynon., and V. Buchanan-Wallaston.1996.Tecniques in Plant Molecular Biology. The Practical Manual, Wye College, University of London, 148 pp.

Deng, Z.N., A.Gentile, E.Nicolosi, A.Vardi, and E.Tribulato.1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. J. Hort. Sci, 70:117-125.

Herrero, R., M.J. Asins, E.A. Carbonel, and L.Navarro, 1996. Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantioideae*.

I. Intraspecies and intragenusgenetic variability. Theor. Appl. Genet, 92:599-609.

Göçmen , M., C. Çakır, M. Tör, ve İ. Polat, 1999. Karalimon ve İtalyan memeli limon çeşitlerinin RAPD markörler ile genetik farklılığının tespiti. Türkiye 3. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 1-5.

Kijas, J.M.H, J:C.S., Fowler, and M.R., Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatelite site markers for genetics analysis within *Citrus* and related species. Genome. 38:349-355.

- Luro, F., F. Laigret, J.M. Bove, and P. Ollitraut, 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*, HortScience. 30:1063-1067.
- Rajakpakse, S., L.E. Belthoff, G. He, A.E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet, and A.G. Abbott. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological RFLP and RAPD markers Theor. Appl. Genet., 90:503-510.
- Roose M L. 1988. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. In: Goren R, Mendel K. Proc.6th Int Citrus Congr. Balaban Publishers, Rehovot, Israil, vol 1, pp 155-165.
- Perring T.M., A.D. Cooper, C.A. Farrar, and T.S. Bellows, 1993. Determining whitefly species. Science, 261:1133-1135.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18:6531-6535.