



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)

<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>



Araştırma Makalesi (Research Article)

Yerli Turunçta Nuseller Embriyonu ve Oluşum Mekanizmasının İncelenmesi**

Şenay KARABIYIK*¹, Sinan ETİ²

^{1,2}Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 01330, Adana, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-8579-6228> ²<https://orcid.org/0000-0001-7705-0856>

*Sorumlu yazar e-posta: senaybehlul@gmail.com

Makale Bilgileri

Geliş: 23.05.2020
Kabul: 09.07.2020
Online Yayınlanma 31.12.2020
DOI: 10.29133/yyutbd.741804

Anahtar kelimeler

Anaç,
Apomiksis,
Citrus,
Embriyo,
İslah,
Tozlama.

Öz: Bu çalışmada, Yerli turunç anacında farklı tozlama uygulamaları sonucunda meyve, tohum ve embriyo gelişimi ile nuseller embriyo oluşum mekanizmasına ilişkin incelemelerin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada; Yerli turunç anacında İzolasyon, Serbest tozlanma, Yabancı tozlama ve Kendileme uygulamaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda nuseller embriyo köken hücre (NEKH)'lerinin; tohum taslağının kalaza kısmındaki nusellus dokusundan olmak üzere tozlanmaya bağlı olarak döllenme sonrasında oluştukları, gelişimlerinin ilk aşamasında nusellus hücrelerinden beslendikleri, embriyo kesesine giriş yaptıktan sonra ise endospermi tüketerek gelişmelerine devam ettikleri belirlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Yerli turunç anacında Yerli üç yapraklı ile yabancı tozlama yapılması durumunda çiçek tozu çim borusu gelişiminin yavaş ve az sayıda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yabancı tozlama uygulaması sonucunda gelişen sınırlı sayıdaki tohum taslaklarında da endosperm gelişiminin yeterli düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamalarında ise bu tip durumlar oluşmamıştır. Sonuçta, Yerli turunç anacının Yerli üç yapraklı ile tozlanması durumunda, yeterli eşeyssel uyuşmanın gerçekleşmemesi nedeniyle başlangıçta oluşan NEKH'lerinin olgun birer embriyoya dönüşebilmesinin sınırlı olduğu, ayrıca embriyo kurtarma için kritik dönemin tozlanmadan sonra 65. ve 75. günler arasında olduğu belirlenmiştir.

Nucellar Embryony and Formation Mechanism in Sour Orange

Article Info

Received: 23.05.2020
Accepted: 09.07.2020
Online Published 31.12.2020
DOI: 10.29133/yyutbd.741804

Keywords

Rootstock,
Apomixis,
Citrus,
Embryo,
Breeding,
Pollination.

Abstract: This study aims to determine fruit, seed and embryo development with nucellar embryo formation mechanism in the case of different pollination types in Sour orange var. Yerli. In the study, 'Isolation', 'Open-pollination', 'Self-pollination' and 'Cross-pollination' treatments were evaluated. The results showed that, nucellar embryo initial cell (NEIC)s firstly formed from chalazal part of nucellus depending on fertilization. They use the nucellus for their first development and after reaching to embryo sac, start to use up endosperm in order to develop. When the Sour orange var. Yerli was cross pollinated with *Poncirus trifoliata*, pollen tube growth rate becomes slower and lower in number. At the same time, the limited number of cross pollinated ovules did not develop sufficient endosperm inside the embryo sac. These cases were not seen in Open-pollination and Self-pollination treatments. Consequently, the formed NEICs after cross-pollination with *Poncirus trifoliata* cannot develop a mature embryo because of the insufficient compatibility and the critical period for embryo rescue of Sour orange is determined between 65th and 75th days after pollination.

**Bu çalışma 'Önemli Turunçgil Anaçlarında Nuseller Embriyonu ve Oluşum Mekanizmasının Araştırılması' isimli Doktora tezinden üretilmiştir.

1. Giriş

'Poliembriyoni' terimi, bir tohum kabuğu içerisinde birden fazla sayıda embriyo bulunması şeklinde tanımlanmakta olup, ilk kez 1719 yılında Leeuwenhoek tarafından ortaya atılmıştır. Turunçgillerde görülen poliembriyoni, 'Apomiksis' olayı sonucunda oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2018). Apomiksis ise döllenme olmadan tohum oluşumunu ifade etmekte ve tarımda çok önemli bir özellik olan bir sonraki kuşakta ana birey ile tamamen aynı genetik özelliklere sahip yavru bireylerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu durum, elma ve turunçgiller dışında tarımsal açıdan önemli olan bitkilerde çok yaygın olmamakla birlikte, söz konusu türlerde de genellikle sporofitik apomiksisin nuseller embriyoni tipi görülmektedir (Koltunow, 1993).

Turunçgillerin tohumlarında bulunan poliembriyoni özelliğinden dolayı, anaç bitki üretiminde daha çok, tohumla çoğaltma yöntemi kullanılmaktadır (Turgutoğlu ve ark., 2009). Bu durum anaç üretiminde avantaj sağlarken, ıslah çalışmalarında ise bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, nuseller embriyoni oluşum ve gelişimi turunçgil tür ve çeşitlerine göre de oldukça farklı durumlar sergilemesi nedeniyle literatürde karmaşıklığa neden olmaktadır. Tüm bu durumlardan dolayı Zhang ve ark. (2018) da yeni ve kaliteli turunçgiller ıslah edebilmek için kullanılacak olan bir çeşidin nuseller embriyoni ve eşeysel uyumsuzluk özelliklerinin önceden bilinmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada, ülkemizde büyük ölçüde ekonomik öneme sahip olan Yerli turunç anacında tozlanmanın engellendiği 'İzolasyon', dalların serbest koşullara bırakıldığı 'Serbest tozlanma', Yerli üç yapraklı anacı ile 'Yabancı tozlama' ve kendi çiçek tozları ile 'Kendileme' uygulamaları sonucunda nuseller embriyo oluşturma yetenekleri, eşeysel uyumsuzluk durumları ve kritik embriyo gelişme safhalarının belirlenmesi yanında meyve döküm zamanlarının bu parametreleri ne şekilde etkilediği de incelenmiştir. Bu şekilde, konu hakkındaki literatürde karmaşıklığa neden olan hususların açığa kavuşturulmasına ve ayrıca Yerli turunçta melezleme ıslahı yapacak araştırmacılara yol gösterici bazı sonuçlara ulaşılmasına çalışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Deneme 2014-2016 yılları arasında Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsüne ait turunçgil anaç parselinde ve Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümünde bulunan Sitoloji ve Histoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Denemede ana bitki olarak Yerli turunç, yabancı tozlayıcı olarak ise Yerli üç yapraklı anaçları kullanılmıştır.

Deneme; bahçe denemeleri, laboratuvar incelemeleri ve tohum ile ilgili çalışmalar olmak üzere üç bölümde yürütülmüştür.

2.1. Bahçe denemeleri

Bahçe denemeleri kapsamında; Yerli turunç anacında erkek organların emasküle edilerek tozlanmanın engellendiği 'İzolasyon' uygulaması, çiçeklerin doğal koşullarda tozlanmaya bırakıldığı 'Serbest tozlanma' uygulaması, Yerli üç yapraklı anacına ait çiçek tozları ile 'Yabancı tozlama' uygulaması ve Yerli turunç'un kendi çiçek tozları ile 'Kendileme' uygulaması yapılmıştır. Tozlama uygulamaları üçer ağaçta ve her ağaç için en az 100 çiçek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, histolojik incelemelere materyal sağlamak amacıyla meyve tutumu çalışmalarına paralel olacak şekilde yine 'İzolasyon', 'Serbest tozlanma', 'Kendileme' ve 'Yabancı tozlama' uygulamaları yapılarak belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınmıştır.

2.2. Laboratuvar çalışmaları

Laboratuvar çalışmaları kapsamında ilk olarak Yerli turunç ve Yerli üç yapraklı anaçlarına ait çiçek tozu canlılık ve çimlenme düzeyleri belirlenmiştir. Çiçek tozu canlılık testi için Norton (1966)'a göre %1'lik 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) ile canlılık testi yapılmıştır. Çiçek tozu çimlendirme denemeleri için ise 'Petride Agar' yöntemine göre %1 agar + %15 sakkaroz içeren çimlendirme ortamı kullanılmıştır (Seday ve Eti, 2011). Çiçek tozu canlılık ve çimlenme düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara materyal sağlamak amacıyla balon aşamasında bulunan en az 150

çiçek üzerinde çalışılmıştır. Bu kapsamda her anaç için üçer yineleme ve her yinelemede beşer alanda sayımlar yapılmıştır.

Çiçek tozu çalışmalarına ek olarak ayrıca Kendileme ve Yabancı tozlama koşullarında tozlamadan sonraki 1. günden başlanarak 15. güne kadar her iki günde bir örnekler alınarak çiçek tozu çim borusu uzama hızları ezme preparat yöntemi (Preil, 1970; Eti, 1987) ile belirlenmiştir. İnceleme Olympus BX 51 floresan mikroskobu ile yapılmıştır.

Yerli turunç anacında nuseller embriyoni oluşum mekanizmasının araştırılabilmesi için ise farklı boyutlardaki tomurcuklar ile tozlama çalışmaları sonrasında ilk 5 gün süreyle günlük, daha sonra 15. güne kadar iki günde bir, 85. güne kadar haftalık ve 85. günden sonra hasata kadar 15 günlük zaman aralıklarıyla çiçek ve meyve örnekleri alınmıştır. Elde edilen örnekler incelenene dek FPA 70 tespit sıvısı içerisine aktarılmıştır. Yerli turunç anacına ait tomurcuk, çiçek, küçük meyve ve tohum örneklerinin parafine gömme yöntemi ile kesitleri alınmıştır (Karabiyik ve ark., 2018). Elde edilen kesitlerde nuseller embriyoların oluşum ve gelişimlerinin mikroskopik incelemeleri Olympus BX 51 floresan-ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

2.3. Meyve ve tohumla ilgili çalışmalar

Yapılan farklı tozlama uygulamaları sonucunda elde edilen meyveler aylık zaman aralıklarıyla ve hasat sırasında sayılarak “aylık ve hasat sırasındaki meyve tutma düzeyleri” belirlenmiştir. Bunun yanında, hasat sırasında elde edilen meyvelerde normal, abortif ve toplam tohum sayıları saptanmıştır. Ayrıca, her meyveden elde edilen tohumlarda embriyo sayısı belirlenerek bir meyveden elde edilen tohumların embriyo sayılarına göre dağılım oranları da tespit edilmiştir.

2.4. İstatistiksel analiz

Deneme, 3 yinelemeli olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmıştır. Elde edilen değerlere JMP 5.0.1 paket programında tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklar LSD testine göre %5 önem düzeyinde sınıflandırılmıştır. Yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmıştır.

3. Bulgular

3.1. Çiçek tozu özellikleri

Denemede Yerli turunç anacı için kendilemede kullanılan Yerli turunç ve yabancı tozlamada kullanılan Yerli üç yapraklı anaçlarının tozlayıcılık özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çiçek tozu canlılık ve çimlenme düzeyleri incelenmiştir (Çizelge 1). Kullanılan anaçlar çiçek tozu canlılık düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, çiçek tozu canlılık oranlarının Yerli üç yapraklı anacında (%70.8) Yerli turunç anacına (%65.2) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çiçek tozu çimlenme düzeyleri açısından ise değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve yine Yerli üç yapraklı anacından (%47.3) Yerli turunç anacına (%12.3) oranla daha yüksek çiçek tozu çimlenme düzeyleri elde edilmiştir.

Çizelge 1. Yerli turunç ve Yerli üç yapraklı anacına ait çiçek tozu kalitesi

Anaçlar	Canlılık (%)	Çimlenme (%)
Yerli turunç	65.2	12.3 b
Yerli üç yapraklı	70.8	47.3 a
D	Ö.D.	***

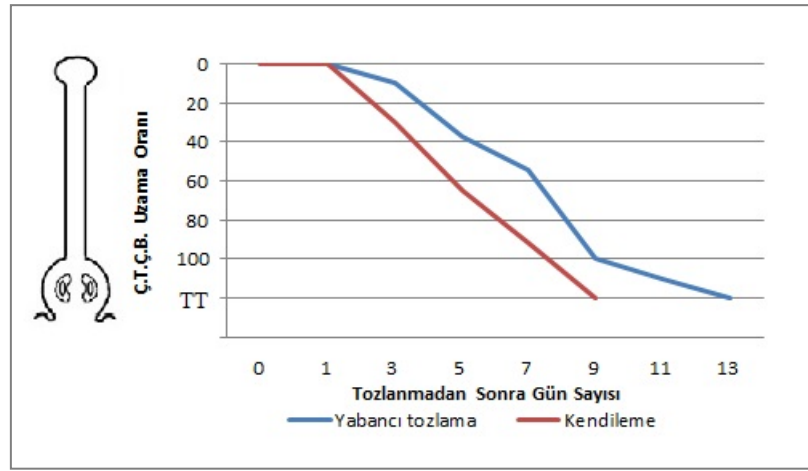
(1) Yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmıştır.

(2) Aynı sütunda ayrı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

(3) Ö.D.: Önemli değil; ***, $p < 0.001$ 'i ifade etmektedir.

3.2. Çiçek tozu çim borusu uzama oranı

Denemede yapılmış olan Kendileme ve Yabancı tozlama uygulamalarında çiçek tozu çim borusu uzama oranları belirlenmiş olup, değerlere ait grafik, Şekil 1’de verilmiştir. Yerli turunç anacının kendilenmesi ve Yerli üç yapraklı ile yabancı tozlanması sonucunda 1. günde çiçek tozu çim borularının her iki uygulamada da stigma üzerinde çimlenmeye başladığı belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra çiçek tozu çim boruları 3. günden itibaren Kendileme uygulamasında stil içerisinde hızlı bir şekilde ilerlerken, Yabancı tozlama uygulamasında daha yavaş bir ilerlemenin gerçekleştiği görülmektedir. Kendileme uygulamasında çiçek tozu çim borularının 7. günde stil sonuna, 9. günde ise tohum taslaklarına ulaşmış oldukları belirlenirken; Yabancı tozlama uygulamasında 9. günde stil sonuna ulaşan çim borularının, tohum taslaklarına ancak 13. günde ulaştıkları tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca, Yerli turunç anacında Kendileme uygulaması sonucunda stil içerisinde ilerleyerek tohum taslaklarına ulaşabilen çiçek tozu çim borularının oldukça yoğun olmalarına karşın, Yabancı tozlama uygulamasında çok az sayıda oldukları belirlenmiştir.



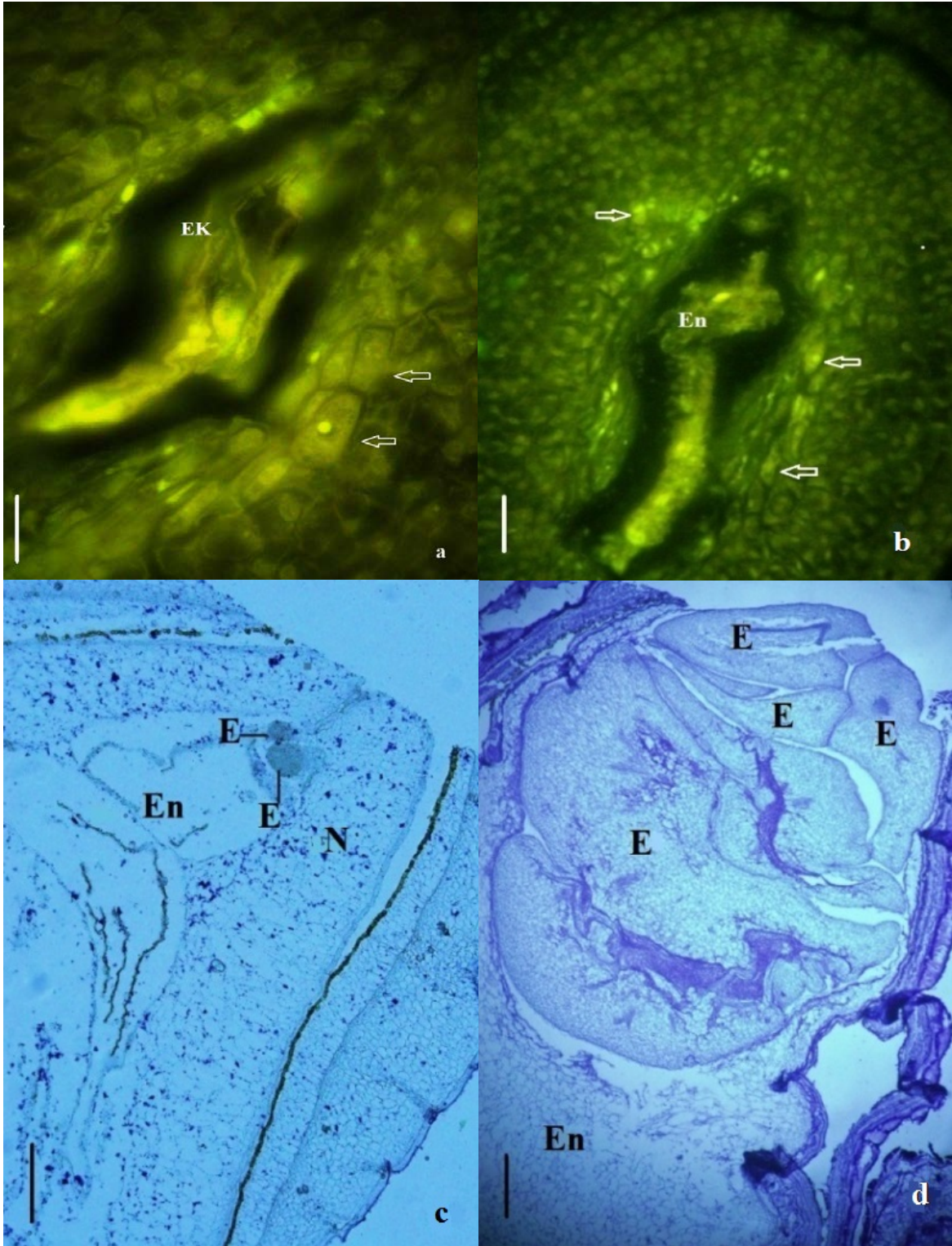
Şekil 1. Yerli turunç anacında yapılan Kendileme ve Yabancı tozlama uygulamaları sonrasında çiçek tozu çim borusu uzama oranları (Ç.T.Ç.B: Çiçek Tozu Çim Borusu, TT: Tohum Taslağı).

3.3. Nuseller embriyo oluşum ve gelişimi

Yerli turunç anacında tomurcuk aşamasındaki küçük çiçek örneklerinden ve ayrıca, yapılan farklı tozlama uygulamaları sonrasında çiçek ve küçük meyvelerdeki farklı aşamalarda bulunan tohum taslakları ile tohum örneklerinden alınmış kesitlerden elde edilen görüntüler Şekil 2’de verilmiştir. Yerli turunç anacına ait tomurcuk örnekleri incelendiğinde, tohum taslaklarında nusellus dokusunda antezisten hemen öncesine kadar herhangi bir şekilde farklılaşmış bir hücrenin görülmediği belirlenmiştir. Yerli turunç anacına ait tohum taslaklarının bu aşamaya kadar embriyo kesesinin 1. veya 2. mitotik bölünmeyi gerçekleştirerek, 2-4 hücreli aşamaya ulaştığı belirlenmiştir.

Yapılan İzolasyon uygulamaları sonrasında çiçekler dökülene kadar örnek toplanabilmiştir. Bu örneklerde de daha sonra nuseller embriyo oluşturabilecek herhangi bir farklılaşmış hücrenin bulunmadığı; hatta tohum taslaklarının, tozlanmanın olmadığı koşullarda hızlı bir şekilde yıkıma uğradıkları belirlenmiştir. Yerli turunç anacında nuseller embriyo köken hücreleri (NEKH) ilk olarak Kendileme ve Serbest tozlanma uygulamalarında 13. günde, Yabancı tozlama uygulamalarında ise 22. günde oluşmaya başlamıştır (Şekil 2a). Söz konusu hücreler, nusellus dokusundaki diğer hücrelerden daha yoğun sitoplazmaya sahip olmaları ve daha iri hücre çekirdekleri ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 2a). Bu hücrelerin tozlanmanın engellenmediği koşullarda embriyo kesesini çevreleyen nusellus dokusunun ilk 2.-3. hücre katmanında buldukları belirlenmiştir. Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamalarından elde edilen örneklerde, 15. günde embriyo kesesi içerisinde oluşan zigotun yanında endospermin de geliştiği, embriyo kesesinin genişlerken etrafındaki nusellus dokularının da yıkıma uğramaya başladığı saptanmıştır. Yabancı tozlama koşullarında ise benzer aşamalar, birkaç gün gecikerek gerçekleşmeye başlamıştır. Bu durumda, Yerli turunç anacında

NEKH'lerinin, çiçek tozu çim borularının tohum taslaklarına ulaşmasından sonra oluşmaya başladığı tespit edilmiştir.



Şekil 2. Yerli turunç tohum taslakları ve olgunlaşmamış tohumlarında nuseller embriyo oluşum ve gelişimi.

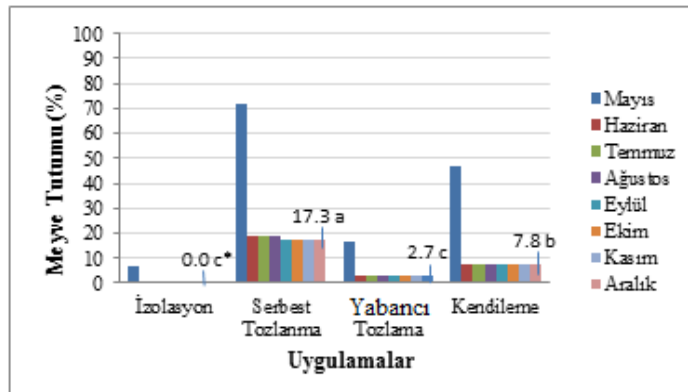
a. Serbest tozlanma koşullarında tozlanmadan sonraki 15. güne ait tohum taslağı. Ölçek çubuğu= 10 μ . EK, Embriyo kesesi; Beyaz oklar= NEKH'leri. **b.** Yabancı tozlama sonrasında 43. güne ait tohum taslağında endosperm gelişimi. Ölçek çubuğu= 20 μ . En, Endosperm. **c.** Antezisten yaklaşık 64 gün sonra oluşmuş globular embriyolar. Ölçek Çubuğu=100 μ . E: Embriyo; N, Nusellus. **d.** Serbest tozlanma koşullarında 85. güne ait tohumlar içerisinde sıkışık halde gelişmekte olan çok sayıda embriyo. Ölçek Çubuğu= 200 μ .

Yerli turunç anacında tozlanmadan sonraki 43. günden itibaren NEKH'lerinin (Şekil 2b), 50. günde ise tohum taslağının mikropil kısmında zigot olduğu düşünülen hücrenin bölünmeye başladığı görülmüştür. Bölünmeye başlayan NEKH'lerinin öncelikle etraflarındaki nusellus dokusundan beslenerek bu hücreleri tükettikleri (Şekil 2c), daha sonra embriyo kesesine ulaşabilen NEKH'lerin endosperminden beslenmeye başlayarak irileştikleri (Şekil 2d) belirlenmiştir. Bu bakımdan, Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamalarında meyveler içerisinde birbirine daha yakın irilikte tohum taslakları olduğu gözlenmiştir. Ancak, özellikle Yabancı tozlama uygulamaları sonucunda 78. gün ve sonrasına ait örneklerden elde edilen küçük meyveler içerisinde gelişmeye devam eden tohum taslaklarının birbirinden oldukça farklı boyutlarda oldukları dikkati çekmiştir. Bu tip tohumların çok azında endosperm normal bir şekilde gelişmesine devam ederken, birçoğunda endospermin ya hiç oluşmadığı ya da bir süre sonra yıkıma uğradığı saptanmıştır. Endospermi tam gelişmiş olan Serbest tozlanma, Kendileme ve az da olsa Yabancı tozlama örneklerinden elde edilen tohumlarda embriyoların, tohum taslağının mikropil tarafında gelişmelerine devam ettikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu tohumlarda tozlanmadan yaklaşık 140 gün sonra embriyoların, gelişmekte olan tohumun içini önemli ölçüde doldurduğu gözlenmiştir. Endospermi sorunlu olan tohum taslaklarında ise embriyoların gelişimini sağlayacak besin kaynakları olmaması nedeniyle oluşan embriyoların, tohumun çeşitli yerlerinde bulunabildikleri ve bu şekilde de abortif tohum oluşumuna sebep oldukları belirlenmiştir.

3.4. Meyve ve tohum ile ilgili çalışmalar

3.4.1. Aylık ve hasat dönemindeki meyve tutma düzeyleri

Yerli turunç anacında yapılan farklı tozlama uygulamaları sonucunda elde edilen aylık meyve tutma düzeyleri Şekil 3'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, İzolasyon uygulamasında Mayıs ayında %7 oranında meyve tutumunun gerçekleşmiş olduğu, ancak bu meyvelerin de haziran ayında dökülerek hasat sırasında hiç meyve elde edilemediği görülmektedir. İzolasyon dışındaki uygulamalarda ise tozlanmadan sonraki ilk iki ayda dökümlerin oldukça yüksek olmasına rağmen, temmuz ayından itibaren kayda değer dökümlerin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Özellikle ilk iki ayda gerçekleşen dökümün en fazla İzolasyon uygulamasında olduğu görülürken, bunu sırasıyla Yabancı tozlama ve Kendileme uygulamalarının izlediği tespit edilmiştir. Bunun yanında, Yabancı tozlama, Kendileme ve Serbest tozlanma uygulamalarında haziran ayından sonra önemli dökümlerin gerçekleşmediği saptanmıştır.



Şekil 3. Yerli turunç anacında yapılan farklı tozlama uygulamaları sonucunda elde edilen aylık ve hasat dönemindeki meyve tutma düzeyleri.

(*) Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar $p < 0.001$ düzeyinde önemlidir.

Hasat sırasındaki meyve tutma değerleri de yine Şekil 3'de verilmiş olup, değerler arasındaki farklılıkların $p < 0.001$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Bu bakımdan en yüksek değer % 17.3 ile Serbest tozlanmadan elde edilmiş, bunu % 7.8 ile Kendileme uygulamasının izlediği tespit edilmiştir. Yabancı tozlama uygulamasında hasat sırasında oldukça düşük meyve tutumu (% 2.7) olduğu saptanırken, İzolasyon uygulamaları sonucunda ise hiç meyve elde edilememiştir.

Yapılan bu çalışmada, Serbest tozlanma uygulamalarında genelde tohum sayıları daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Bu bakımdan Serbest tozlanma uygulamasından 34.0 adet, Kendileme ve

Yabancı tozlama uygulamalarında ise sırasıyla 20.9 adet ve 20.7 adet tohum elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Elde edilen meyvelerdeki normal tohum oranı bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamakla birlikte, söz konusu değerlerin Serbest tozlanma uygulamasında % 67.63 ve Kendileme uygulamasında % 72.61 iken, Yabancı tozlama uygulamaları sonucunda elde edilen tohumların ancak yarısı kadarının (% 49.75) normal geliştiği görülmüştür (Çizelge 2). Yabancı tozlama uygulamasında diğer uygulamalara oranla daha az normal gelişmiş tohum elde edilmesinin ise Yabancı tozlama sonucu endosperm oluşumunda yaşanan sıkıntılardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, Yerli üç yapraklı anacının Yerli turunç için yeterince uygun bir tozlayıcı olmadığı net bir şekilde ifade edilebilir.

Çizelge 2. Farklı tozlama uygulamaları sonucunda elde edilen meyve, tohum ve embriyolara ait veriler

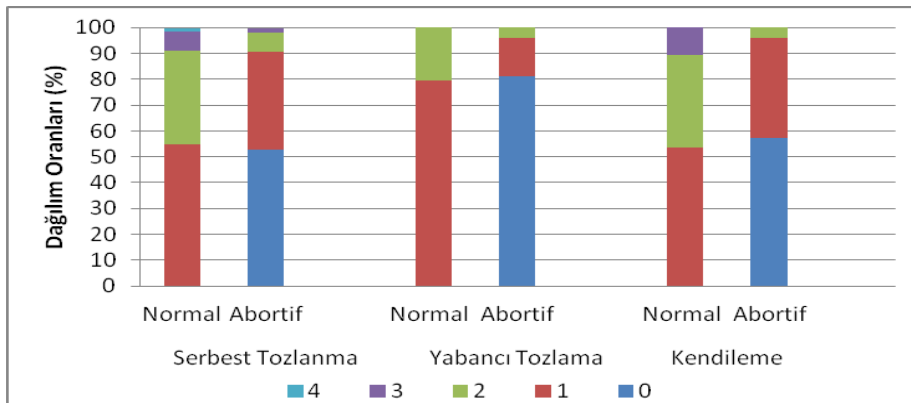
Uygulama	Toplam Tohum Sayısı (adet)	Normal Tohum Oranı (%)	Normal tohumda embriyo sayısı (adet)	Abortif tohumda embriyo sayısı (adet)
İzolasyon	-	-	-	-
Serbest tozlanma	34.0 a	67.63	1.5	0.7
Kendileme	20.9 b	72.61	1.6	0.4
Yabancı tozlama	20.7 b	49.75	2.1	0.2
P	***	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.

- (1) Yüzde değerlere aç transformasyonu uygulanmıştır.
- (2) Aynı sütunda ayrı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.
- (3) Ö.D.: Önemli değil; ***, $p < 0.001$ 'i ifade etmektedir.

Normal gelişmiş tohumlardaki ortalama embriyo sayıları bakımından uygulama ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Söz konusu anaçta normal gelişmiş tohumlardaki en yüksek ortalama embriyo sayısının 2.1 adet ile Yabancı tozlama uygulamasında olduğu ve bu değer diğer uygulamalardan farklı bir istatistiksel grupta yer aldığı belirlenmiştir. Yabancı tozlama uygulamasını, ortalama 1.6 adet ile Kendileme ve 1.5 adet ile de Serbest tozlanma uygulamalarının izlediği tespit edilmiştir.

Yerli turunç anacına ait abortif bir tohumdaki embriyo sayısı açısından ise uygulamalara ait ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamakla birlikte, uygulama ortalamalarının 0.2 adet (Yabancı tozlama) ile 0.7 adet (Serbest tozlanma) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Bir meyvedeki normal gelişmiş tohumların embriyo sayılarına göre dağılım oranları incelendiğinde; Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamalarında birbirine benzer sonuçlara ulaşıırken, özellikle Yabancı tozlama uygulamalarında monoembriyonik tohumların yüksek oranda oldukları görülmektedir (Şekil 4). Abortif tohumlarda ise bu bakımdan daha çok, embriyosuz tohumların olduğu ve bunu 1 embriyolu tohumların izlediği görülmektedir. Uygulama ortalamaları açısından Kendileme ve Serbest tozlanma uygulamalarından benzer değerler elde edilmesine rağmen, Yabancı tozlama uygulamasında daha yüksek oranda embriyosuz tohumun oluşması da dikkat çekici olmuştur (Şekil 4).



Şekil 4. Bir meyveden elde edilen tohumların embriyo sayılarına göre dağılım oranları

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada Yerli turunç anacında yapılan İzolasyon, Kendileme, Yabancı tozlama ve Serbest tozlanma uygulamalarının nuseller embriyo oluşum ve gelişimi üzerine etkisi histolojik olarak incelenmiştir.

Bu kapsamda öncelikle, kullanılan Yerli turunç ve Yerli üç yapraklı anaçlarına ait çiçek tozlarının canlılık düzeyleri tozlayıcılık potansiyeli açısından yeterli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Ancak, Yerli üç yapraklı anacına ait çiçek tozlarında yeterli çimlenme düzeyine ulaşılmıştır. Yerli turunç anacına ait çiçek tozlarının düşük çimlenme oranına sahip olduğu saptanmıştır. Yamamoto ve ark. (2006), farklı turunç çeşit ve klonlarında çiçek tozu canlılık düzeylerinin %46.5 ile %96.3 arasında geniş bir aralıkta belirlendiğini bildirmişlerdir. Seday ve Eti (2011) de farklı turunçgil tür ve çeşitlerinde çiçek tozu canlılık ve çimlenme düzeylerinin önemli düzeyde farklılık gösterebileceğini ifade etmişlerdir.

Denemede kontrollü koşullarda Yerli turunç anacına ait çiçeklerde Yabancı tozlama ve Kendileme uygulamaları yapılmış olup, dışicik borusu içinde çiçek tozu çim borusu uzama oranları da belirlenmiştir. Bu kapsamda, Yabancı tozlama uygulamalarında Kendileme uygulamalarına oranla oldukça az sayıda çiçek tozu çim borusunun daha yavaş bir şekilde ilerleme gösterdiği dikkati çekmiştir. Benzer şekilde, Yamamoto ve ark. (2006) ve Distefano ve ark. (2012) tarafından da bazı durumlarda çiçek tozu çim borularının stil sonuna az sayıda ve yavaş bir şekilde ulaşabileceği ve bu durumun yavaş gelişen bir tür eşeysel uyumsuzluk olarak ifade edilebileceği bildirilmiştir. Nitekim Zhang ve ark. (2018) da yaptıkları çalışmada, turunçgillerde gametofitik uyumsuzluğun söz konusu olduğunu ve bu uyumsuzluk tipinde çiçek tozu çim borularının stigmada değil stil içerisinde engellendiğini yani oluşacak olan uyumsuzluğun stil içerisinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu görüşlere paralel olarak Yabancı tozlama uygulamalarında çiçek tozu çim borusu uzamasında sorun yaşanması ve meyve tutumunun düşük olması, Yerli turunç × Yerli üç yapraklı anaçları arasında yeterli düzeyde eşeysel bir uyuşmanın bulunmadığını işaret etmektedir.

NEKH'lerinin oluşum ve gelişimi ile ilgili yapılan incelemeler sonucunda, Yerli turunç anacında tomurcuk aşamasında nuseller dokusu içerisinde NEKH'lerine rastlanmamıştır. NEKH'lerinin tomurcuk döneminde de oluşabileceği daha önce Koltunow ve ark. (1995), Kepiro ve Roose (2007) ve Kumar ve ark. (2014) tarafından savunulurken; Wakana ve Uemoto (1988) söz konusu hücrelerin antezisten sonra oluşmaya başladıklarını bildirmişlerdir. Yerli turunç anacına ait tohum taslakları geç gelişim gösteren tohum taslakları kapsamında olup (Bacchi, 1943), antezis aşamasında embriyo keselerinin çoğunun ancak 1. veya 2. mitotik bölünmeyi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Turunçgillerde bu tip durumlar daha önce Bacchi (1943), Frost ve Soost (1968) ile Koltunow ve ark. (1995) tarafından da bildirilmiştir.

Yerli turunç anacında tozlanmanın engellendiği İzolasyon uygulamaları sonucunda elde edilen tohum taslaklarında da NEKH'lerine rastlanmamış ve bu koşullarda tohum taslaklarının gelişmeye devam edemeyerek, hızlı bir şekilde dejenere oldukları gözlenmiştir. Söz konusu hücrelerin Yabancı tozlama, Kendileme ve Serbest tozlanma koşullarında tozlanma ve döllemeyi takiben oluşabildikleri belirlenmiştir. Oluşmaya başlayan NEKH'lerinin yoğun sitoplazmalarından dolayı mikroskop altında daha koyu renkli göründükleri ve daha iri hücre çekirdeklerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Nuseller embriyonu konusunda çalışan birçok araştırmacı da NEKH'lerinin görünümü ile ilgili benzer ifadeler kullanmışlardır (Strasburger, 1878; Esen ve Soost, 1977; Kobayashi ve ark., 1979; Wilms ve ark., 1983; Wakana ve Uemoto, 1988; Naumova, 1993; Koltunow ve ark., 1995; Zhang ve ark., 2018).

Çiçek tozunun olmadığı 'İzolasyon' koşullarında veya tomurcuk aşamasında da NEKH'lerinin oluşmadığı göz önünde bulundurulduğunda; söz konusu hücrelerin oluşabilmesi için mutlaka tozlanma olayının gerçekleşmesi gerektiği görülmektedir. Daha önce yapılmış olan birçok çalışmada ise NEKH'lerinin tozlanmaya gereksinim duymadan ya antezisten önce (Koltunow ve ark., 1995; Wakana ve Uemoto, 1987; Şimşek ve ark., 2019) veya antezisten hemen sonra (Bacchi, 1943; Mendes-Rodrigues ve ark., 2005) oluşmaya başladıkları bildirilmiştir. Ayrıca, oluşan NEKH'lerinin gelişmeye devam edebilmeleri için mutlaka aynı tohum taslağında dölleme sonucu oluşmuş olan endosperme ihtiyaç duydukları belirtilmiştir (Esen ve Soost, 1977; Wakana ve Uemoto, 1988; Koltunow ve ark., 1995; Kepiro ve Roose, 2007). Buna karşın, Wakana ve Uemoto (1988) ve Karabiyik ve ark. (2017) partenokarpik meyve oluşturma eğiliminde olan Washington Navel portakalında döllemenin olmadığı koşullarda az sayıda da olsa normal gelişmiş tohum oluşabildiğini ve bunların da poliembriyonik

olduklarını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışma kapsamında, Yerli turunç anacında NEKH'si oluşumunun; tozlanma ve dölleme olmasına bağlı olarak gerçekleştiği kanısına varılmıştır.

Farklı tozlama uygulamaları sonucunda Yerli turunç anacında oluşan NEKH'lerinin zigotun bölünmeye başlamasından hemen sonra bölünmeye başladıkları belirlenmiştir. Bu aşamanın da tozlanmadan sonraki 65.-75. günler arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Daha önce Bacchi (1943)'nin yaptığı denemede yapay tozlama uygulamaları sonucunda Foster altıtopu ve Turunç'ta NEKH'lerinin tozlanmadan 67 gün sonra zigot ile eş zamanlı olarak bölünmeye başladığı bildirilmiştir. Wakana ve Uemoto (1988) da benzer şekilde Satsuma mandarinlerinde NEKH'lerinin zigotun bölünmesi ile birlikte bölünmeye başladığını belirtmişlerdir. Buna karşın, Esen ve Soost (1977) ise bu konuda zigotun bir süre bölünmeden beklerken, NEKH'lerinin önceden bölünmeye başladıklarını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada bölünmeye başlayan NEKH'lerinin ilk aşamalarda nusellus dokusundan beslendikleri ve daha sonra embriyo kesesine giriş yaptıkları tespit edilmiştir. Yerli turunç'un Yerli üç yapraklı çiçek tozları ile yabancı tozlanması durumunda birçok tohum taslağında endosperm gelişiminde sıkıntılar olduğu ve bu nedenle, oluşan embriyoların da beslenemeyerek tohumun çeşitli yerlerinde küçük halde kaldıkları belirlenmiştir. Birçok araştırmacı da bu durumu destekleyici yönde bildirimlerde bulunmuşlardır (Esen ve Soost, 1977; Wakana ve Uemoto 1988; Koltunow ve ark., 1995; Mendes-Rodrigues ve ark., 2005). Yerli turunç anacında yapılan Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamalarında, Yabancı tozlama sonrasında endosperm dejenerasyonuna bağlı olarak embriyo gelişiminde belirlenen yetersizliklerin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu durum, bölünerek embriyo oluşturmaya başlayan NEKH'lerinin gelişmeye devam edebilmeleri için mutlaka endosperme ihtiyaç duyduklarını ortaya koymakla birlikte, daha önce belirtilmiş olan Yerli turunç × Yerli üç yapraklı kombinasyonunun da yeterli düzeyde bir eşeysel uyuma durumu göstermediği sonucunu desteklemektedir. Koltunow ve ark. (1995) döllememiş tohum taslaklarında oluşan NEKH'lerinin ilk olarak nusellus dokusundan beslendiğini; ancak nusellus dokusunun tükenmesi ile birlikte, endospermin de oluşmamasına bağlı olarak, embriyo gelişiminin globular veya erken yürek safhalarında durduğunu bildirmişlerdir. Wakana ve Uemoto'nun 1988 yılında yaptıkları bir çalışmada ise dejenere olmuş endosperme sahip 28 tohumun 18'inde kalaza kısmında nuseller embriyoların olduğu ve bu embriyoların mikropildekilerden daha fazla gelişebildiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada da NEKH'lerinin endospermin geliştiği koşullarda mikropil kısmında sıkışık halde buldukları ve normal gelişmiş dolgun tohumlar oluşturduğunu, endospermin olmadığı koşullarda ise embriyoların tohumun çeşitli yerlerinde küçük halde kalarak abortif tohum oluşumuna neden oldukları belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda aylık ve hasat sırasındaki meyve tutma değerlerinin farklı tozlama uygulamalarından etkilendiği belirlenmiştir. Bu bakımdan, Serbest tozlanma ve Kendileme uygulamaları sonucunda meyve tutumunda önemli bir sorun görülmemiştir. Ancak, Yabancı tozlama uygulamalarından oldukça düşük oranda meyve tutumu gerçekleştiği, İzolasyon uygulamalarından ise hiç meyvenin elde edilmediği tespit edilmiştir. Meyve dökümleri açısından ise tüm uygulamalarda dökümlerin genelde ilk 2 ayda yoğun olduğu tespit edilmiştir. Wakana ve Uemoto (1987) partenokarpik meyve oluşturma eğilimi düşük olan Valencia portakalında tozlanmamış olan tüm meyvelerin ilk 7 hafta içerisinde döküldüğünü bildirmişlerdir. Ben-Cheikh ve ark. (1997) ise Pinapple portakalında yaptıkları çalışmada emaskülasyon sonrasında yumurtalıkların %99'unun antezisten 14 gün sonra döküldüğünü, tozlanmanın engellenmediği serbest tozlanma koşullarında ise dökümlerin %50-75 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, Yerli turunç anacında partenokarpiye eğiliminin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, Yerli üç yapraklı ile yabancı tozlama uygulamalarında düşük meyve tutumuna ek olarak, tozlanmadan sonra az sayıda çiçek tozu çim borusunun stil içerisinde ilerlemesi, döllemenin gerçekleştiği koşullarda ise endospermin ya hiç oluşmaması veya dejenere olması nedeniyle yetersiz eşeysel uyuma durumunun da yaşandığı görüşü bir kez daha desteklenmiştir.

Yapılan tozlama uygulamalarının aylık ve hasat sırasındaki meyve tutma değerleri NEKH'si oluşumu ile birlikte değerlendirildiğinde, kritik döküm safhalarının NEKH'lerinin oluşumu ve bölünmeye başladıkları dönemlere denk geldiği de tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında da tozlama uygulamalarının meyve iriliği, tohum ve embriyo oluşumunu etkilediği, ayrıca Yapay tozlama uygulamalarında söz konusu parametrelerin de daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Bir meyveden elde edilen toplam tohum sayısı yanında, bu tohumların normal gelişim gösterip göstermedikleri de önemlidir. Nitekim, Koltunow ve ark. (1993) da bir meyve içerisinde dölleme ile

normal gelişmiş tohumların, döllemenin gerçekleşmediği koşullarda ise stigmada oluşan uyartımın etkisiyle içi boş tohum kabuklarının oluşabileceğini belirtmişlerdir.

Bir tohumdan elde edilen embriyo sayısı incelemelerinde ise embriyo sayısının da farklı tozlama uygulamalarından etkilendiği ve bir tohumdaki embriyo sayısının 1 ile 5 adet arasında değiştiği belirlenmiştir. Şimşek ve ark. (2019) da yaptıkları çalışmada Orlando tangelo turunçgil çeşidinde bir tohumdaki ortalama embriyo sayısının 4.3 adet olduğunu ve embriyo sayılarının 2 ile 6 adet arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada bir tohumdaki embriyo sayısı arttıkça, tohum içerisindeki sıkışıklıktan dolayı birbirinin gelişimini belirli ölçüde kısıtlamış embriyoların olduğu gözlenmiştir. Perez-Tornero ve Porras (2008)'ın limonlarda yaptıkları başka bir çalışmada da bir tohumda 1-6 adet arasında embriyo olduğu, bu tohumların 2'den fazla sayıda olmasının kotiledonlarda şekil bozukluğu görülmesine neden olurken, tek embriyoların iyi gelişmiş oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, bu tip deforme olmuş embriyoların gelişemeyerek küçük kaldıkları da bildirilmiştir. Bu çalışma ile birlikte daha önce yapılmış çalışmalar tohum oluşumu ve gelişimi açısından endospermin önemli olduğu ve sağlıklı gelişim olmadığı sürece yeterli düzeyde embriyo gelişiminin sağlanamayacağı ortaya koyulmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; Yerli turunç anacında NEKH'si oluşumunun tozlanma ve dölleme olayları sonrasında olduğu, söz konusu hücrelerin de zigotun bölünmesinden sonra bölünmeye başladığı tespit edilmiştir. Ancak, oluşan NEKH'lerinin olgun birer embriyo oluşturabilmeleri için mutlaka çift dölleme sonrası oluşacak olan endosperme ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Oysa Yerli turunç anacının Yerli üç yapraklı anacı ile yabancı tozlandığı durumda, döllemedeki sorunlara bağlı olarak endosperm gelişiminin sekteye uğraması nedeniyle embriyo gelişiminin de yetersiz kaldığı ve az sayıda tohum taslağının normal gelişmeye devam ettiği belirlenmiştir. Yapılan çalışma ile Yerli turunç anacında nuseller embriyo oluşum ve gelişim aşamalarının farklı tozlayıcı kullanımına bağlı olarak değişik şekillerde gerçekleştiği ortaya koyulmuştur. Yerli turunç anacında yapılan melezleme çalışmaları sonrasında embriyoların tozlanmadan sonraki 65. ve 75. günler arasında gelişmeye başladığı belirlenmiş olup, bu dönemde yapılacak olan embriyo kurtarma çalışmaları ile bitki elde etme şansının artırılacağı söylenebilir. Bu durum, özellikle melezleme ıslahı çalışmalarında kullanılan çeşitlere bağlı olarak değişebilen nuseller embriyo oluşum mekanizmasının önceden bilinmesi gerektiğini açık bir şekilde göstermektedir.

Teşekkür

Araştırmacılar çalışmayı finanse eden Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: FDK-2014-86) ve çalışmanın materyalini sağlayan Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürlerini sunmaktadırlar.

Kaynakça

- Bacchi, O. (1943). Cytological observations in Citrus: III. Megasporogenesis, fertilization and polyembryony. *Botanical gazete*. 105(2), 221-225.
- Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F. R., Talon, M. & Primo-Millo, E. (1997). Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties. *Plant Physiol*. 114, 557-564.
- Distefano, G., Hedhly, A., Casas, G. L., Malfa, S., Herrero, M. & Gentile, A. (2012). Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in Citrus. *Scientia Horticulturae*. 140, 1-7.
- Esen, A. & Soost, R. K. (1977). Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. *Amer. J. Bot.* 64(6), 607-614.
- Eti, S. (1987). Über das Pollenschlauchwachstum und die Entwicklung der Samenlagen in Beziehung zum Fruchtausatz und zur Frucht qualitaet bei der Manderinensorte "Clementine" (*Citrus reticulata* Blanco). Dissertation Univ. Hohenheim, Germany. 127 p.
- Frost, H. B. & Soost, R. K. (1968). *Seed Reproduction: Development of Gametes and Embryos*. In: *The Citrus Industry*. pp: 290-234. California University Press.
- Karabiyik, Ş., Eti, S., Yılmaz, B. & Sağır, F. S. (2017). Göbekli Portakal Çeşitlerinde Tozlamamın Meyve Tutumu ve Bazı Meyve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. *Alatarım*. 16(1), 11-18.

- Karabıyık, Ş., Gündeşli, M. A., Eti, S., Kafkas, S., Güney, M., Zarifikhoroşahi, M. & Kafkas N. E. (2018). *Detection of bud abscission of pistachio via histological analysis*. Paper presented at Proc. VII. International Symposium on Almonds and Pistachios. Adelaide/Australia.
- Kepiro, J. L. & Roose, M. L. (2007). Nucellar Embryony. (pp, 141-149). In: I. A. Khan (Ed), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CAB International, USA.
- Kobayashi, S., Ieda, I. & Nakatani, M. (1979). Studies on the nucellar embryogenesis in Citrus. II. Formation of the primordium cell of the nucellar embryo in the ovule of the flower bud and its meristematic activity. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 48, 179-185.
- Koltunow, A. M. (1993). Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*. 5, 1425-1437.
- Koltunow, A. M., Soltys, K., Nito, N. & McClure, S., 1995. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Can. J. Bot.* 73,1567-1582.
- Kumar, V., Malik, S. K., Pal, D., Srinivasan, R., & Bhat, S. R. (2014). Comparative transcriptome analysis of ovules reveals stress related genes associated with nucellar polyembryony in citrus. *Tree genetics & genomes*, 10(3), 449-464.
- Mendes-Rodrigues, C., Carmo-Oliveira, R., Talavera, S., Arista M., Ortiz, P. L. & Oliveira, P. E. (2005). Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biol.* 7, 533-540.
- Naumova, T. N. (1993). *Apomixis in Angiosperms. Nucellar and Integumentary Embryony*. CRC Press, Boca Raton. 420 p.
- Norton, J. D. (1966). Testing of plumpollenviabilitywithtetrazoliumsals. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 89,132-134.
- Perez-Tornero, O. & Porras, I., 2008. Assessment of polyembryony in lemon: rescue and *in vitro* culture of immature embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93, 173-180.
- Seday, S. & Eti, S. (2011). Seleksiyonla elde edilen bazı klemantin mandarin tiplerinin kendine verimlilik durumlarının ve uygun tozlayıcıların belirlenmesi. *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(5), 172-179.
- Strasburger, E. (1878). Über Polyembryonie. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft.* 12, 647–667.
- Şimşek, Ö., Dönmez, D., Eti, S., Yeşiloğlu, T. & Aka Kaçar, Y. (2019). Comparative Transcriptome Sequencing to Determine Genes Related to the Nucellar Embryony Mechanism in Citrus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 43, 58-68.
- Turgutoğlu, E., Kurt, Ş. & Demir, G. (2009). Yerli turunç Anacında Ekim Öncesi Bazı Uygulamaların Çimlenme Üzerine Etkileri. *Derim Dergisi*, 26(2),11-19.
- Wakana, A. & Uemoto, S. (1987). Adventive embryogenesis in Citrus. I. Occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Amer. J. Bot.* 74,517-530.
- Wakana, A. & Uemoto, S. (1988). Adventive embryogenesis in Citrus (Rutaceae). II. Postfertilization development. *Amer. J. Bot.* 75, 1031-1047.
- Wilms, H. J. Went, J. L. Cresti, M. & Ciampolini, F. (1983). Adventive Embryogenesis in Citrus. *Caryologia.* 36(1), 65-78.
- Yamamoto, M. Kubo, T. & Tominaga, S. (2006). Self and cross incompatibility of various Citrus accessions. *Journal of Japanese Society*, 75(5), 372-378.
- Zhang, S., Liang, M., Wang, N., Xu, Q., Deng, X. & Chai, L. (2018). Reproduction in woody perennial Citrus: An update on nucellar embryony and self-incompatibility. *Plant Reproduction*, 31(1), 43-57.