

TURUNÇGİL ISLAHI: EMBRİYO KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI¹

Şenay KURT^{2*}, Fatma KOYUNCU³

²Dr., Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya; ORCID: 0000-0002-2921-063X

³Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Isparta; ORCID: 0000-0001-5803-6944

Geliş Tarihi / Received: 19.03.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 03.09.2020

ÖZ

Çalışmada, turunçgil ıslahında kullanılan geleneksel yöntemlerden seleksiyon, melezleme ve mutasyon teknikleri ile birlikte veya tek başına kullanılarak daha kısa zamanda ve daha hızlı ilerleme sağlayan biyoteknolojik yöntemlerden, ploidi ıslahı, izoenzim analizleri, moleküler teknikler, genetik transformasyon, somatik melezleme ve özellikle embriyo kültürü ile bu tekniğe etki eden faktörler irdelenmiştir. Geleneksel turunçgil ıslahı; uyumsuzluk, heterozigoti, apomiksis, poliembriyoni ve uzun süren gençlik kısırlığına bağlı olarak zahmetli, maliyetli ve zaman alıcı bir uğraştır. Islah çalışmalarında ister geleneksel ister modern teknikler olsun hedefe ulaşmak için uygun ebeveynlerin ve uygun tekniklerin seçimi önemlidir. Ebeveynler arasındaki genetik ilişkiler ile hedeflenen karakterlerin kalıtımı hakkında elde edilen bilgiler, ıslah çalışmalarının doğru yönlendirilmesi ve daha kısa sürede başarı sağlanması için oldukça önemlidir. Poliembriyoni nedeniyle yeni melez bireylerin oluşumu sınırlı olmasına rağmen melezleme ıslahı, turunçgillerde çeşit geliştirmenin temelini oluşturmaktadır. Poliembriyonik turunçgillerde zigotik embriyo, nuseller embriyolarla besin maddesi ve gelişim alanı için yarışmak zorundadır ve nuseller embriyolar, zigotik embriyoların gelişimini baskılamaktadır. Embriyo kurtarma tekniği, kontrollü melezlemeler ve somatik melezlemelerde bu sorunun çözümü için gerekli ve yararlı bir metottur. Bu tekniğin başarısını; embriyo gelişim aşaması, kültür ortamının bileşimi, embriyo alım tekniği ve genotip etkilemektedir. *In vitro* yöntemler ve moleküler tekniklerdeki yeni gelişmeler ve bunların ıslah programlarında kullanımının yaygınlaşması turunçgillerde yeni çeşitlerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Citrus, ıslah, biyoteknoloji, doku kültürü, embriyo kurtarma

CITRUS BREEDING: EMBRYO CULTURE STUDIES

ABSTRACT

In this study, it was evaluated important factors for conventional breeding techniques (selection, hybridization artificial mutation) and biotechnological methods (ploidy breeding, isoenzyme analysis, molecular techniques, genetic transformation, somatic hybridization and especially embryo culture) in citrus breeding. Conventional citrus breeding is laborious, costly and time-consuming due to incompatibility, heterozygous, apomixis, polyembryony and prolonged juvenility. It is important to choose suitable parents and suitable techniques to achieve the goal in breeding studies whether traditional or modern techniques. Obtained knowledge about the genetic relationships between parents and the inheritance of the targeted characters is important for the manipulated of breeding studies and achievement in a shorter time. Hybridization breeding is the basis of developing cultivars in citrus, although the obtained of new hybrid genotypes is limited because of polyembryony. The zygotic embryo must compete with the nucellar embryos for nutrient and growth area in polyembryonic citrus cultivars and the nucellar embryos suppress the development of the zygotic embryos. Embryo rescue technique is a necessary and useful method for solving this problem in controlled hybridization and somatic hybridization. The success of this technique is affected by the embryo development stage, composition of the culture medium, embryo excise technique and genotype. New developments in *in vitro* methods and molecular techniques and the widespread use of these in breeding programs will provide an opportunity breeding new cultivars in Citrus.

Keywords: Citrus, breeding, biotechnology, tissue culture, embryo rescue

*Sorumlu yazar / Corresponding author: senayanilir@gmail.com

¹Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda kabul edilen doktora tezinden hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Turunçgiller, meyvelerinden farklı şekillerde yararlanılan karışık bir meyve grubudur. Milattan önce başlayan turunçgil tarımı, dünyada 4000 yıldır, ülkemizde ise 2000 yıldır yapılmaktadır. Ülkemizde turunçgil yetiştiriciliği ticari olarak 1930'lu yıllarda başlamış ve 1950'li yıllarda üretimde kendine yeten ve ihracat yapan bir ülke konumuna gelmiştir. Dünya turunçgil üretiminde 2017 yılı verilerine göre Çin, Brezilya ve Hindistan ilk üç sırada olup, 4.769.726 ton üretim ile Türkiye önemli turunçgil üreticisi ülkeler arasında 7. sıradadır [7]. Turunçgiller kendine has özellikleri ve uzun raf ömürleri sayesinde dünya ticaretinde sofralık olarak büyük ölçekte ihracata olanak tanımaktadır. Ülkemizin toplam yaş meyve ve sebze ihracatı içinde turunçgiller 2.022.088 ton ve 893.6 milyon \$'lık bir payla ilk sırada yer almaktadır [8].

Turunçgil türlerinin ait olduğu *Aurantioideae* alt familyası içindeki soy, alt soy, cins ve türlerin taksonomik durumu tartışmalı, karmaşık ve oldukça akıl karıştırıcıdır. Gerçek turunçgiller, üçü ticari önemi sahip olan (*Poncirus*, *Fortunella* ve *Citrus*) toplam altı cinsten oluşan çoğunlukla her dem yeşil bitkilerdir. Turunçgiller ve pek çok yakın cins birbirleriyle kolayca melezlenebilen ve yüzyıllarca doğada spontan olarak bulunan ağaçlardır [117].

Turunçgil ıslah çalışmaları binlerce yıl öncesinde Eski Çin'de yabancı türlerden üstün fenotiplerin seçilmesi şeklinde yapılmaktayken, sistematik ve hedefe yönelik ıslah programları 1893'te Swingle ve Webber ile ilk kez Florida'da başlatılmıştır. Turunçgiller çok farklı toprak ve iklim koşullarında yetiştirilmek istendiğinde üretimi sınırlayan bazı biyotik ve abiyotik stres koşullarında belirli anaç ve çeşitlerin kullanımı gerekmektedir. Gelişmiş ülkelerin pazarlarında, yüksek kalitede ve her dönem meyve talebinden dolayı turunçgillerde meyve kalitesinin artırılması önemli bir önceliktir. İslahçılar, pazar sezonunu genişletmek için erken ve geç olgunlaşan çeşitler seçmeye ya da meyve kalitesini (renk, irilik, çekirdeksizlik vb.) artırmaya yönelik ıslah programlarına yönelmektedirler [92].

Diğer meyve ağaçlarında olduğu gibi turunçgillerde de ıslah, zor ve zaman alıcıdır. Pek çok turunçgil ve akraba türler heterozigottur ve önemli bazı özellikler tek genli kalıtım gösterdiğinden F₁ melezleri farklılık göstermeye eğilimlidirler [102]. Bu nedenle ıslahçılar için oluşan büyük popülasyonlardan istenilen özelliğin seçimi neredeyse olanaksız hale gelmekte [43] ve bu yüzden turunçgil ıslah çalışmalarını daha da zorlaştırmaktadır [36]. İzoenzim işaretlemelerinin kullanılması iyileştirme sağlamasına rağmen uzun gençlik kısırlığı (5-15 yıl), nuseller embriyonu, heterozigoti, eşeyssel uyumsuzluklar gibi özelliklerin ve bunlarla ilişkili özel belirteçlerin olmaması melezlerin seleksiyonunu zorlaştırmakta, turunçgil ıslahını çok uzun zaman gerektiren, maliyetli ve yoğun emek isteyen bir iş haline getirmektedir [85]. Bu nedenle geleneksel ıslah yöntemlerine ilaveten spontan mutasyonlar, yapay ışınlamalar, germplazm taşınması gibi yöntemler ve özellikle süreyi kısaltan etkin yöntem/tekniklerin kullanılması günümüzde daha da öne çıkmaktadır. Bu makalede, turunçgil ıslah metotlarına genel bir bakış ve embriyo kültürünün detaylarıyla ele alınması ve güncel literatürlerin ışığında değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Turunçgil Islah Metotları

Turunçgil ıslahının temelini seleksiyon, melezleme ve mutasyon yöntemleri oluşturmakta, ancak daha kısa zamanda ve daha büyük gelişme sağlanması için biyoteknolojik yöntemlerle (doku kültürü, somatik hibridizasyon, ploidi ıslahı, genetik transformasyon vb.) birleştirilmesi gerekmektedir.

1. Seleksiyon

Doğal mutasyon frekansı yüksek olan turunçgillerde ıslah çalışmalarının ilk yıllarından beri kullanılan seleksiyon metodu, günümüzde halen üretilen ve ticarete önem taşıyan çeşitlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır [129]. Turunçgillerde seleksiyon ıslahı konusunda ilk çalışma 1936'da Friend ve Yarnell [33] tarafından altıntoplar üzerinde yapılmıştır. Hastalıklara ve soğuğa dayanım gibi amaçlar dışında seleksiyon çalışmaları giderek azalmaktadır.

Ülkemizde 1979 yılında başlayan “Turunçgillerde Aşığıözü Seleksiyon-Sertifikasyonu ve Çeşit Geliştirme” projesinin I. diliminde üstün özellikli toplam 36 birey seçilmiştir [86]. Bu proje sonucunda Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde 2011 yılında farklı turunçgil türlerinden toplamda 8 adet çeşit [125], Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü’nde 2014 yılında 4 adet çeşit ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde 2 adet çeşit tescil edilmiştir [9].

2. Melezleme

Turunçgiller, türlerin kompleks döllenme biyolojileri nedeniyle melezlemelerde önemli kısıtlamalara sahiptir. Kendine uyumsuzluk ve apomiksis ya da diğer deyişle poliembriyoni nedeniyle melezlemelerde sorun yaşanmaktadır. Çoğu meyve türü monoembriyonik olmasına rağmen turunçgiller monoembriyonik ya da poliembriyonik olduklarından sıra dışıdır [11]. Poliembriyonik tohumlarda ana ebeveyn ile aynı özellikte olan nüseller embriyolar zigotik embriyoları baskılayarak melez popülasyonların oluşumunu sınırlamakta ve varyasyon görülmemektedir [92].

Monoembriyonik diploid çeşitler melezlemelerde ana ebeveyn olarak kullanıldıklarında etkilidirler. Ancak az sayıda monoembriyonik ebeveynin olması, portakal ve altıntop gibi türlerde tür içi veya türler arası melezlemelerde soruna neden olmaktadır. Bu sorun, ıslah çalışmaları ile monoembriyonik çeşitlerin elde edilmesi ile kısmen azalmış [114] ve somatik melezlemeler ile yeni bireylerin elde edilmesine bağlı olarak halen gelişmektedir.

Anaç ıslahında, zor ve uzun vadede maliyetli olmasına rağmen en fazla kullanılan yöntem melezleme ıslahıdır [21]. Anaçlar için genetik olarak homojen bitkilerin üretimi açısından önemli olan nuseller embriyoni ıslahta büyük bir sorundur [102, 128]. Turunçgil anaç ıslahı günümüzde de, genetik kaynak olarak önemli bir tür olan *Poncirus trifolita* ile seçilen başka bir ebeveynin melezlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır [17]. İstenilen çeşit ve anaç uyumuna sahip ve genetik haritalama popülasyonlarının sağlanması için *Citrus*, *Poncirus* ve *Fortunella* türleri arasında yapılan melezlemelerde fertil

melezler kolaylıkla elde edilebilmektedir [112, 107].

3. Mutasyon

Turunçgil çeşitlerinin çoğu doğal mutasyonlar sonucu meydana gelmiştir. Mutasyonun şiddeti türlere göre değişmesine rağmen, turunçgiller ve akraba cinsler diğer türlere kıyasla mutasyona oldukça eğilimlidir. Örneğin Washington Navel portakalı, 18. yüzyıl sonunda *Selecta* çeşidinden doğal mutasyon ile oluşmuştur. Washington Navel portakalından tomurcuk mutasyonu sonucu oluşmuş birçok çeşit vardır [41, 129].

Mutasyonlarla; erken olgunlaşma, yüksek verimlilik, yüksek kaliteli meyve, kırmızısı kabuk rengi, pürüzsüz kabuk yüzeyi, çekirdek sayısında azalma veya çekirdeksizlik ve bodurluk gibi birçok farklı özellik elde edilmiştir [113]. Ülkemizde, Kobalt 60 akut gama ışını uygulamasında; Fremont mandarininde çekirdeksizlik, Valencia portakalında geççilik, Redblush altıntopunda daha koyu renklenme, Kütdiken limonunda uçkurutana dayanıklı bireylerin elde edilmesi amaçlanmıştır [127]. Nitekim, Kütdiken limonundan bu yöntemle Alata, Gülşen ve Uzun isimleri ile üç adet çekirdeksiz limon tescil edilmiştir [133]. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA)’nda kayıtlı *Citrus* cinsi içerisinde 14 mutant çeşit tescil ettirilmiştir [50].

4. Biyoteknolojik yöntemler

Klasik ıslah metotlarında karşılaşılan sorunları çözmek ve süreyi kısaltarak daha başarılı sonuçlara ulaşmak için *in vitro* teknikler ve genetik uygulamalardan yararlanılmaktadır. İslahta hedefe ulaşmak için, ebeveynlerin önemli özelliklerinin kalıtımının optimize edilmesi gerekmektedir. Bu da heterozigotinin yönetimine ve seçilen karakterlerin kalıtımına dayanmaktadır. Seleksiyona yardımcı markerlerin varlığı, özellikle erken dönemde fenotiplerde görülen özellikler için önemlidir [145].

4.1. Ploidi ıslahı

Turunçgillerde kromozomların görüntülenmesini sağlayan tekniklerle çoğu turunçgil türünün diploid ($2x=2n=18$) olduğu belirlenmiştir [59, 99]. Bununla birlikte triploid ve tetraploid gibi poliploid bitkiler

diploid popülasyonlar içerisinde bulunabilmektedir [14, 24].

Poliploidler özellikle triploid ve tetraploid bitkiler, çeşitlerin meyve kalitesi ve verimini artırmakta, bodurluk sağlamanın yanında değişik biyotik ve abiyotik stres koşullarına toleransı arttırmaktadırlar. Tetraploidler, özellikle anaçlık olarak değerlendirilmeleri ve ıslah programları için geniş gen kaynağı oluşturmalarından dolayı önem taşımaktadırlar [122,123, 84, 109]. Turunçgillerde triploid bitkiler iki farklı diploid ebeveynin melezlenmesiyle [28, 65] ya da diploid ve tetraploid ebeveyn bitkilerin melezlenmesi yoluyla elde edilebilmektedir [28, 83, 75, 65]. Tetraploid bireyler aynı zamanda kolhisin kullanılarak ve protoplast füzyonu ile elde edilmektedir. Kolhisin ile kromozom sayısı ikiye katlanan bitkiler doğrudan çeşit olarak kullanılmakla beraber, özellikle çekirdeksizlik hedefli ıslah programlarında üstün ebeveyn olarak da oldukça önem taşımaktadır. Tetraploidler ticari olarak değerli olmasalar da, triploidlerin eldesi için ebeveyn olarak önemlidirler [83].

Poliploid turunçgilleri tanımlamak için kromozomların çok küçük yapıda olmaları nedeniyle zor ve yoğun emek gerektirmesine rağmen kromozom sayımı yöntemi halen kullanılmaktadır [59, 132]. Ancak bu yöntem, son zamanlarda yerini ploidi seviyelerini tanımlamak için daha kolay bir teknoloji olan flow sitometri yöntemine bırakmıştır [26, 119, 3, 5, 6, 15, 124]. Bununla birlikte, hem kromozom sayımı hem de flow sitometri kendiliğinden oluşan triploidlerde ekstra haploid genomların kökenini açıklayamamaktadır. Bu durum, çöğürlerin orijinleri ve ploidi seviyeleri ile birlikte heterozigoti, polimorfik ve kodominant markırlar tarafından açıklanabilmektedir [20].

4.2. İzoenzim analizleri

Turunçgillerde çeşitlere göre farklı oranlarda gerçekleşen nuseller embriyonu melezleme ıslahında önemli bir problemdir ve nuseller bitkilerle melez bitkileri birbirinden ayırmak için karakteristik morfolojik markırlar olmadığından bu sorun izoenzim analizleri ile aşılıma çalışılmıştır [57, 67]. Aynı biyokimyasal reaksiyonu katalizlemelerine rağmen farklı molekül yapıda olan izoenzimler, elektroforetik olarak

ayrıştırıldıktan sonra elde edilen bantlar yardımı ile bitkilerin genetik benzerlik ve farklılıklarının ortaya konulmasında, seleksiyon süresinin kısaltılmasında, çeşit ayırımında, taksonomik çalışmalarda ve dayanıklılık ıslahı çalışmalarında önem arz etmektedirler [64, 121]. Tür ve çeşit ayırımlarında, önceleri kullanılan bu metot, morfolojik seçime göre çok güvenilir olmasına karşın birbirine çok yakın çeşitlerde nuseller bitkileri ayırmakta ve mutasyon ile oluşan farklılıkları belirlemede yetersiz kalmaktadır [106, 40].

4.3. Moleküler teknikler

Islah çalışmalarından elde edilen bireylerde çekirdekliklik, kalın kabuk gibi istenmeyen özellikleri tespit ederek çalışmanın başında bunların elenmesi para, emek ve zamanın boşa harcanmasını engelleyecektir. Ayrıca bu bitkilerde erkencilik, geçcilik, hastalıklara dayanıklılık vb. özelliklerin erken aşamada belirlenmesi ıslah sürecini hızlandıracaktır. Temelde iki farklı moleküler teknik mevcuttur. Birincisi, DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP tekniği ve ikincisi ise PCR'a dayalı SSR, RAPD, AFLP, SRAP, SCAR, CAPS, InDel ve SNP gibi teknikleri içermektedir [46, 1, 29]. RFLP metodu ile turunçgil genom haritaları da oluşturulabilmektedir. Ancak bu tekniğin oldukça zaman alması nedeniyle melez bitkilerin belirlenmesinde CAPS metodu da kullanılmaya başlanmıştır. RAPD metodu turunçgillerde ve birçok bitkide genetik haritalamada, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ve bireyin DNA parmak izlerinin tespitinde kullanılmaktadır [81, 69]. SSR markırları genetik haritalama ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır [46, 2, 95]. SRAP markırları daha tutarlı sonuçlar vermekte ve AFLP tekniğine göre daha ucuz ve daha kolaydır [134, 66]. RFLP ya da PCR kaynaklı markırlardan polimorfizm gösterenler kaydedilerek veri dosyası hazırlanmakta ve bunlar kullanılarak mevcut bilgisayar programları ile genetik haritalama yapılmaktadır [106]. InDel markırlar, turunçgillerde spesifik türlerin karakterizasyonunda [47], popülasyon genetik analizinde [135], genetik haritalama ile genetik çeşitlilik analizinde [87] ve filogenetik analizlerde [29] kullanılmaktadır.

4.4. Genetik transformasyon

Turunçgil çeşitlerine yeni genler aktararak, istenilen özellikler kazandırılarak üstün özellikte yeni çeşitler elde edilebilmektedir. Bu yöntemin başarısı önemli özellikleri kodlayan genlerin tespitine ve bu genlerin turunçgil genomuna aktarılmasına bağlıdır [23]. Genetik transformasyon zor olmasına karşın, belirlenen hedeflere yönelik yapılan bazı çalışmalarda istenen özelliklere sahip transgenik bitkiler elde edilmiştir [63, 31, 149].

Hedeflenen genom düzenleme teknolojilerindeki son gelişmeler, transgenik olmayan genetiği değiştirilmiş çeşitlerin oluşturulmasını kolaylaştırmıştır. CRISPR teknolojisi kullanılarak birçok bitkinin genomu modifiye edilebilmektedir [27]. CRISPR-Cas sistemleri, CRISPR-ilişkili genleri ve bu genlere karşılık gelen CRISPR dizilerini içermektedir. Palindromik olan bu kısa DNA bölgeleri her iki yönde de aynı şekilde okunan dizilerdir [76]. Etkili bir genom düzenleme aracı olan CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak turunçgillerde de başarılı sonuçlar elde edilmiştir [53, 54]. Turunçgil genetik mühendisliği çalışmalarında farklı Cas9 temelli gen düzenlemeleriyle uygulamaların artacağı öngörülmektedir.

4.5. Somatik melezleme

Melezleme çalışmalarını sınırlayan eşeyssel uyumsuzluk sorunu somatik melezlemelerle hücre düzeyinde aşılmaya çalışılmıştır. Turunçgillerde protoplast füzyon çalışmaları olumlu sonuçlar vermiş ve gerçek turunçgillere yakın bazı akraba cinslere ait protoplastlar turunçgillere aktarıldığında istenilen özelliklere sahip oldukları görülmüştür [78, 42]. Protoplast füzyonu, klasik arazi ıslahı gibi uzun zaman alan bir işlem olmasına rağmen turunçgillerdeki uyumsuzluk problemine alternatif bir yol olarak önerilmektedir [77, 45]. Bunun yanında somatik melezleme ile çekirdeksizlik [56], hastalık ve zararlılara dayanıklılık [82, 44] konularında da başarı sağlanmıştır.

4.6. Embriyo kültürü

In vitro kültürün ilk çalışmalarından olan embriyo kültürü pratikteki problemler için uygulanan ve ıslahçılar için değeri kanıtlanmış önemli bir doku kültürü tekniğidir. Embriyo

kültürü (embriyo kurtarma olarak da adlandırılır), aseptik koşullar altında embriyoların morfogenezisi, farklılaşması ve gelişiminin devamı için önemli gereksinimlerinin belirlenerek kimyasal içerikleri bilinen ortamda tohum ve ovüllerden çıkarılan zigotik embriyoları kurtarmak için kullanılan *in vitro* tekniktir [110, 98, 30]. Bu teknik, embriyonun zarar görmeden izole edilmesini, uygun bir besi ortamının oluşturulmasını ve embriyogenik gelişim ile çöğür oluşumunun devam etmesini sağlamak esasına dayanmaktadır [12, 103].

Embriyo kültürü 1940'lı yılların başından beri tohum dormansisinin üstesinden gelmek, ıslah süresini kısaltmak, tohum canlılığının tespiti, mikroçoğaltım için materyal sağlamak, uyumsuzluk görülen melezleme kombinasyonlarından olgunlaşmamış embriyoların ve nuseller embriyonu nedeniyle gelişemeyen zigotik embriyonun kurtarılması, embriyogenik gelişim için besin içeriği ve fiziksel gereksinimlerinin anlaşılması için artarak kullanılmaktadır [146, 39, 58]. Melezlemeler sonucunda zigotik embriyoların daha fazla gelişen nuseller embriyolarla yarışmak zorunda kalması ve sonuçta gelişmemesi [112] nedeniyle turunçgillerde embriyo kurtarma tekniği, en fazla türler arası melezlemelerde erken olgunlaşma döneminde embriyo aborsiyonunun önlenmesi ve ıslah sürecinin kısılmasının yanında yeni triploid bireylerin elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır [80, 147, 73].

Turunçgillerde 20. yüzyılın başlarında başlayan embriyo kurtarma çalışmaları, cinsler arası melezlemeler ile elde edilen triploid çöğürler ve turunçgil melezlerinde gelişemeyen zigotik embriyonun geliştirilmesi için çok yararlı bir yöntemdir [51, 101]. Embriyo kurtarma, yoğun kesip ayırma işlemi ve karmaşık besi ortamı ihtiyacı nedeniyle zordur. Çoğu turunçgil çeşidi poliembriyoniktir ve tohum kaynağı olarak kullanıldığında genellikle gelişmemiş zigotik embriyolar abortif veya canlı olmadığı için, genetik olarak ana ebeveynle aynı yapıda olan nuseller embriyolar daha güçlü bitkiler oluşturmaktadır [14]. Farklı ploidi seviyesindeki türler ve özellikle cinsler arası melezlemelerde endospermin genellikle zayıf geliştiği veya hiç gelişmediğinin gözlemlendiği ve besi ortamları sayesinde bu eksikliğin telafi

edilerek embriyonun gelişiminin sağlandığı bildirilmiştir [38, 114]. Soost ve Roose [112], melezlemeler sonucunda zigotik embriyoların, genellikle daha fazla gelişen nuseller embriyolarla yarışmak zorunda kaldığını ve sonuçta gelişemediklerini belirtmişlerdir. Özellikle interplooid melezlemeler dahil poliembriyonik turunçgil melezlemelerinde endosperm yetersizliği ve sonrasında embriyo aborsiyonunu teşvik eden uyumsuzluklara bağlı olarak canlı melez birey sayısı azalmıştır [144, 137].

Embriyonun başarılı bir şekilde gelişimi birçok faktöre bağlıdır. Bu teknikte başarı, büyük ölçüde izole edilen embriyonun gelişim aşamasına ve kültür ortamı tarafından sağlanan bitki büyüme düzenleyicileri ve besin maddelerine bağlıdır [110, 137]. Diğer süreçlerin çoğunda olduğu gibi, bitki genotipi başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Bazı turunçgil türlerinin embriyoları kültür ortamında diğerlerinden daha kolay gelişmekte ve bazen çeşitler arasında da farklılıklar ortaya çıkabilmektedir [22, 52].

Embriyo kültüründe farklı besi ortamları kullanılmasına rağmen gelişmiş embriyoların kültürüne oranla olgunlaşmamış melez embriyoların kültüründe daha karmaşık ortamların gerekli olduğu bildirilmiştir [22, 80, 108]. Embriyo gelişimi, heterotrofik ve ototrofik olmak üzere iki aşamalıdır. Heterotrofik fazda genç embriyo; endosperm ve onu çevreleyen dokulara bağlıdır ve daha yaşlı embriyolardan daha karmaşık bir ortam ve daha yüksek ozmotik basınca ihtiyaç duyar. Genç embriyoların gelişimi için vitamin kombinasyonları, aminoasit, büyüme hormonları ve bazı durumlarda domates suyu ve hindistan cevizi sütü gibi doğal ekstratler eklenmiş kompleks ortamların kullanımını gerektirmektedir. Ototrofik fazda embriyo, gelişimi için gerekli olan maddeleri tuz ve şekerden sentezleyebilir. Bu aşamada, embriyolar sakaroz gibi bir karbon kaynağı ile takviye edilmiş basit bir inorganik ortam üzerinde çimlenebilmekte ve büyüebilmektedir [102]. Amonyum nitrat ve potasyum nitrat, embriyo kültüründe en sık kullanılan inorganik azot kaynaklarıdır. Ortamdaki amonyum, olgunlaşmamış embriyoların farklılaşması ve gelişmesi için zorunlu ve önemlidir [72, 136].

Kazein hidrolizat, embriyo kültürü ortamına büyüme için yaygın olarak kullanılan 18 amino asitlik bir karışımdır [52]. Biotin, tiamin, pantotenik asit, nikotinik asit, askorbik asit, inositol ve piroksidin gibi vitaminler ise yaygın olarak ortama eklenmektedir [10]. Ortamda vitaminlerin yokluğunda kazein hidrolizat ve malt ekstraktın kültüre alınan embriyoların yaşaması için önemli olduğu belirtilmiştir [151, 16, 40]. Turunçgillerde embriyo kurtarma için besi ortamı denemelerinde; MS [76], MT [77] ve farklı ortamlar ile konsantrasyonları, bitki büyüme düzenleyicileri, sakaroz, agar, pH, aktif kömür gibi farklı faktörlerin etkileri çalışılmıştır [39, 104, 89, 90, 18].

Ortama sakaroz ilavesinin, kültüre alınan embriyolarda, kök gelişimini [105] veya hem kök gelişimi hem de sürgün taslağını [13] teşvik ettiği ve çimlenme oranını artırdığı bildirilmiştir [118]. Özellikle oksin, gibberellin ve sitokinin gibi bitki büyüme düzenleyicilerin bulunmasıyla kültüre alınmış embriyoların morfogenezisi ve gelişimi üzerine etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur [97, 25, 55]. Çalışılan türe, çeşide ve melezleme kombinasyonlarına göre değişmekle beraber ortama farklı dozlarda gibberellin asit (GA_3) ilavesinin gerektiği pek çok çalışmada bildirilmiştir [16, 138, 83, 61]. Bunun yanında, sitokininler ortamda tek başına kullanıldığında etkisizdir veya sadece genç embriyo gelişimini hafifçe artırmaktadır, oksinler ile birlikte kullanıldıklarında ise embriyoların büyümesini ve farklılaşmasını destekledikleri belirtilmiştir [136]. Turunçgillerde embriyo kültüründe tür ve çeşide göre ortama farklı dozlarda GA_3 ilave edilmesine yönelik yapılan çalışmalardan bazılarında; $0.01 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [104]; $0.1 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [88]; $1 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [60, 16, 25, 138, 61]; $1.5 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [93, 111]; $2 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [148] veya $5 \text{ mgL}^{-1} GA_3$ [16] ilave edilmesinin uygun bulunduğu bildirilmiştir.

Turunçgillerde yapılan embriyo kurtarma çalışmalarında önemli bir faktör olan kültür ortamı olarak en yaygın MS [51, 93] ve MT [126, 51, 62] besi ortamları ve modifikasyonları kullanılmıştır. Bununla beraber, Ohta ve Furusato [79] tarafından White [140] ortamında, Perez-Tornero ve Porras [93] ve Soni ve ark. [111] tarafından

Gamborg's B5 [34] ortamından başarılı sonuçlar alındığı belirtilmiştir.

Embriyo kültürü çalışmalarında ışık ve sıcaklık etkili olan iki çevresel faktördür. Embriyoların çoğunlukla tohumlardan daha geniş bir sıcaklık aralığında çimlendiği ve bitki türüne bağlı olarak çimlenme için optimum sıcaklığın genellikle 25°C ila 30°C arasında olduğu bildirilmiştir [74]. Ponca Mandarin ve Pera Portakalı melezlemelerinden alınan olgunlaşmamış embriyoların kültüründe ışıklandırma süresinin etkili olduğu ve 8, 10, 12, 14, 18 ve 24 saat süreyle ışıkta tutulan kültürlerde en iyi sonuçların alındığı bildirilmiştir [91].

Embriyo gelişim zamanı önemli diğer bir faktör olup, bu konu üzerine yapılan çalışmalarda embriyo büyüklüğü ve şekline göre, 3 mm'den daha büyük embriyolar [79], küresel embriyolar [115], kalp şekilli embriyolar [100] ile tam çiçeklenmeden 3-4 ay sonra hem küresel hem de kalp şekilli embriyolar [116] ve 3 mm'den daha küçük embriyolar [70] kültüre alınmıştır.

Turunçgillerde elde edilen melezlerde embriyoların kurtarılma zamanı konusunda; tozlamadan 50 gün [19, 139], 80 gün [120], 85 gün [143], 100 gün [80, 118, 126], 105 gün [16, 32], 118 gün [18], 120 gün [100, 94, 61, 62] ve 130-140 gün sonra [111] yapılan çalışmalarda iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Bununla birlikte limonda yapılan bir çalışmada tam çiçeklenmeden 135-150 gün sonra [93], mandarinde yapılan bir çalışmada ise tam çiçeklenmeden 50, 65, 80, 100, 135, 150 ve 165 gün sonra [35], Citrus × Poncirus kombinasyonu ile yapılan melezleme çalışmasında ise tozlamadan 110, 120, 130 gün sonra olgunlaşmamış embriyoları [62] kültüre aldıklarını bildirmişlerdir. Bazı melezleme çalışmalarında ise embriyolar, tozlamadan 10-14 hafta sonra [48], 12-15 hafta sonra [131, 4] ve 12-14 hafta ile 7 ay sonra [51], 14-16 hafta sonra [109] kültüre alınmışlardır. Zhu ve ark. [150], meyvelerin olgunlaşmasını tamamladığı dönemde alınan embriyoların, Aleza ve ark. [3] meyvelerin olgunlaşma zamanında küçük tohumlardan aldıkları embriyoların, Thuy ve ark. [123] ise melezlemeler sonucunda abortif ve küçük tohumlara ait embriyoların kültüre alınmasının uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Aseptik koşullarda mikroskop altında yapılan embriyo kurtarma tekniği, el becerisi

isteyen, zahmetli ve zaman alıcı bir uygulama olup, embriyonun dikkatli bir şekilde çıkarılması başarı için kritik öneme sahiptir. Embriyoların karmaşık besin maddesi gereksinimleri, embriyoyu çıkarma sırasındaki zararlanma riskinin yüksek olması ve embriyoların çok küçük boyutta olması nedeniyle daha genç embriyoların kültürü daha zordur ve başarı şansını artırmak için embriyo ve endosperm birlikte de kültür ortamına konulabilmektedir [141, 52]. Bunun yanında son yıllarda özellikle triploidi ıslahı çalışmalarında embriyo kurtarma tekniği rutin olarak kullanılmakta olup triploidi olma özelliği daha fazla olan daha küçük embriyolar kültüre alınmaktadır [3]. Embriyoları çıkarma işlemi türlere göre değişmekle beraber genellikle ovüllerin mikropil ucundan kesim yapılarak embriyonun çıkarılması için karşı tarafından baskı uygulanmaktadır. Dikkatli olunmazsa özellikle daha genç ve kalp şekilli embriyoların çıkarılmasında sıvı endosperm ile çevrili hassas embriyogenik dokuya zarar verilebileceği bildirilmiştir [103]. Bu tekniğin yanında eksplant olarak eksize edilen embriyolar yerine yarım ovüllerle çalışılmış, ancak melezlemelerin çoğunda ovüllerin çimlenme oranının çok düşük olduğu saptanmıştır [142]. Protoplast füzyonu ile elde edilen ebeveynlerle yapılan melezleme çalışmasında daha önce uygulanmayan bir teknikle, tohum antipodal ucundan ikiye kesilerek forsepsle ayrılıp embriyo çıkarılmış ve MT kültür ortamında %40.5 çimlenme sağlandığı bildirilmiştir [143]. Triploidi ıslahı çalışmalarında klasik melezlemeler (2x × 2x) sonucu elde edilen bireylerde embriyo kurtarma ve flow sitometri gibi teknikler kullanılarak triploidler seçilmekte ve son 10 yılda yapılan çalışmalardan dört yeni triploid mandarin çeşidi tescil edilmiştir. İspanya'da bu ıslah programı kapsamında geliştirilen çekirdeksiz ve geç olgunlaşan ilk çeşitler Garbi ve Safor mandarinleridir [75].

SONUÇ

Turunçgillerde geleneksel ıslah adımlarını takip ederek yapılan çeşit ve anaç ıslahı; uyuşmazlık, apomiksis, heterozigoti, poliembriyoni, embriyo aborsiyonu, gençlik döneminin uzun sürmesi ve bitki yetiştirme

üzere alan gereksinimi gibi nedenlerden dolayı zor, zaman alıcı, maliyetli ve karmaşık bir çalışmadır. Kalıtım özellikleri birbirinden farklı birkaç hedefi olan ıslah programlarında istenen amaca ulaşmak için ebeveynlere ait karakterlerin kalıtımı ve ebeveynler arasındaki genetik ilişkiler hakkında elde edilen bilginin zenginleşmesi ile uygun ebeveynlerin seçimi ve uygun tekniklerin kullanımı çalışmalara hız ve etkinlik sağlayacaktır. Bununla beraber turunçgil ıslahının temelini melezleme çalışmaları ve seleksiyon oluşturmaktadır. Sağladığı büyük potansiyele rağmen, sterilite, mutasyon eğiliminin fazla olması, kromozomların yapısındaki değişiklikler ve yeniden düzenlemeler gibi bazı dezavantajları da vardır. Ayrıca turunçgillerin çoğu poliembriyoniktir ve nuseller embriyolar besin maddesi ve alan gereksinimi nedeniyle zigotik embriyoları baskılamaktadır. Bu sorunun çözümü için gerekli ve yararlı bir teknik olan embriyo kurtarma; turunçgillerde türler, cinsler ve ploidiler arası melezlemelerde embriyo aborsiyonunun üstesinden gelmek için uygulanan başarılı bir metottur. Embriyo kurtarma, diğer *in vitro* metotlara göre ciddi el becerisi gerektiren, zor ve zaman alan bir tekniktir. Bu tekniğin başarısı; embriyo gelişim aşamasına, kültür ortamının içeriğine, embriyo alım tekniğine ve genotipe bağlıdır.

Turunçgillerde klasik ve genetik ıslah çalışmalarında elde edilen ilerlemelere paralel olarak tercih edilen ve değerli bir metot olan embriyo kültürü, üstün yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ve ıslah süresinin kısaltılmasında önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Geleneksel yöntemlerle beraber *in vitro* yöntemler ve moleküler tekniklerdeki yeni gelişmeler ve bunların ıslah programlarında birlikte kullanımı turunçgillerde yeni çeşitlerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Turunçgil ıslahında protoplast füzyonu ve gen aktarımı gibi yeni tekniklerin kullanımının yaygınlaşması ile önümüzdeki dönemlerde *in vitro* teknikler ve özellikle embriyo kültürü daha da önem kazanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ahmed, S., H.S. Rattanpal, P. Kumari and J. Singh, 2017. Study of genetic variability in Citrus fruit crop by molecular markers. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(1):111-128.
2. Aka-Kaçar, Y., A. Uzun, İ. Polat, T. Yeşiloğlu, B. Yılmaz, O. Gülşen, Ö. Tuzcu, M. Kamiloğlu, Ş. Kurt and U. Seday, 2013. Molecular characterization and genetic diversity analysis of mandarin genotypes by SSR and SRAP markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(1):516-521.
3. Aleza, P., J. Juárez, J. Cuenca, P. Ollitrault and L. Navarro, 2010a. Recovery of Citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridization and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Reports*, 29(9):1023-1034.
4. Aleza, P., J. Juárez, P. Ollitrault and L. Navarro, 2010b. Polyembryony in non-apomictic Citrus genotypes. *Annals of Botany*, 106(4):533-545.
5. Aleza, P., J. Juárez, J. Cuenca, P. Ollitrault and L. Navarro, 2012. Extensive Citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports*, 31:1723-1735.
6. Allario, T., J. Brumos, J.M. Colmenero-Flores, D.J. Iglesias, J.A. Pina, L. Navarro, M. Talon, P. Ollitrault and R. Morillon, 2012. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, Cell and Environment*, 36(4):856-68.
7. Anonim, 2019a. 2017 yılı turunçgil üretim verileri. *Food and Agriculture Organization (FAO)*. (<http://www.fao.org/faostat>; Erişim Tarihi: Mart 2020).
8. Anonim, 2019b. 2018 yılı Türkiye turunçgil üretim verileri. *Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)* (<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>; Erişim Tarihi: Mart 2020).
9. Anonim, 2019c. 2019 yılı tescilli meyve ve asma çeşit listesi. *Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü* (<https://www.tarimorman.gov.tr/bugem/ttsm>; Erişim Tarihi: Mart 2020).
10. Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan, 1983. Plant tissue culture: theory and practice. *Elsevier*, 502p.

11. Bijzet, Z., 2006. Pollination. In: E.A. De Villiers (Ed.): *The Cultivation of Citrus*. ARC-Institute for Tropical and Subtropical Crops, pp:105-122.
12. Bridgen, M.P., 1994. A review of plant embryo culture. *Hort.Science*, 29(11): 1243-1246.
13. Buffard-Morel, J., 1968. Effets du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose sur le développement des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Dura* Bec.) en culture *in vitro*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 267D:185-188.
14. Cameron, J.W. and H.B. Frost, 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (Eds.): *The Citrus Industry. Vol. II. Anatomy, Physiology, Genetics, and Reproduction*. University of California, Division of Agricultural Sciences, pp:325-370.
15. Cardoso, J.C., A.M. Abdelgalel, B. Chiancone, R.R. Latadoc, O. Laine, R. Testoline and M.A. Germana, 2015. Gametic and somatic embryogenesis through *in vitro* anther culture of different Citrus genotypes. *Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(2):304-312.
16. Carimi, F., F. Pasquale and A.M. Puglia, 1998. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breeding*, 117:261-266.
17. Castle, W.S., 2010. A career perspective on Citrus rootstocks, their development and commercialization. *Hort. Science*, 45: 11-15.
18. Chagas, E.A., M. Pasqual, J.D. Ramos, L.A.S. Pio, L.F. Dutra and J.O. Cazetta, 2005. Activated charcoal and gibberellic acid concentrations on immature embryos culture. *Ciencia e Agrotecnologia*, 29(6): 1125-1131.
19. Chen, Z.G. and J.F. Wang, 1986. Plantlets derived from early *in vitro* culture of Citrus zygotic embryo. *Journal of Fujian Agricultural University*, 15(4):271-276.
20. Chen, C., M.T. Lyon, D. O'Malley, C.T. Federici, J. Gmitter, J.W. Grosser, J.X. Chaparro, M.L. Roose and F.G. Gmitter, 2008. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science*, 174:1-8.
21. Cheng, F.S. and M.L. Roose, 1995. Origin and inheritance of dwarfing by the Citrus rootstock *Poncirus trifoliata* flying dragon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2):286-291.
22. Collins, G.B. and J.W. Grosser, 1984. Culture of embryos, cell culture and somatic cell genetics of plants. *Laboratory Procedures and Their Applications*, 1:241-257.
23. Çevik, B. ve M.Ş. Çevik, 2006. Turunçgillerde genetik mühendisliği uygulamaları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(1):74-86.
24. Çimen, B., T. Yeşiloğlu, M. İncesu, B. Yılmaz ve Y.A. Kaçar, 2016. Bazı turunçgil genotiplerinden tetraploid bitki elde edilmesi. *Derim*, 33(2):175-188.
25. Das, A., A.K. Paul and S. Chaudhuri, 2000. Micropropagation of sweet orange *Citrus sinensis* Osbeck for the development of nucellar seedling. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(3): 269-272.
26. De Laat, A.M.M., W. Göhde and M.J.D.C. Vogelzang, 1997. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding*, 99:303-307.
27. Doudna, J.A. and E. Charpentier, 2014. Genome editing, the new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
28. Esen, A. and R.K. Soost, 1971. Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification and possible use. *Journal of Heredity*, 62:329-333.
29. Fang, Q., L. Wang, H. Yu, Y. Huang, X. Jiang, X. Deng and Q. Xu, 2018. Plant development of species-specific InDel markers in Citrus. *Molecular Biology Reporter* (<https://doi.org/10.1007/s11105-018-1111-1>).
30. Fathi, H. and U. Jahani, 2012. Review of embryo culture in fruit trees. *Annals of Biological Research*, 3(9):4276-4281.

31. Febres, V.J., C.L. Niblett, R.F. Lee and G.A. Moore, 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with Citrus Tristeza Closterovirus genes. *Plant Cell Reports*, 21:421-428.
32. Ferrante, S.P., S. Lucretti, S. Reale, A. De Patrizio, L. Abbate, N. Tusa and M.T. Scarano, 2010. Assessment of the origin of new Citrus tetraploid hybrids by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica*, 173:223-233.
33. Friend, W.H. and S.H. Yarnell, 1936. Clonal selection of grapefruit with respect to yield. *Proceedings of American Society for Horticultural Science V*, 38:358-362.
34. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158.
35. Garcia Lidon, A., 2003. La seleccio'n clonal de Limonero 'Fino'. *Incidencia Del Patro'n. Aspectos Morfolo'gicos, Agrono'micos y Bioqu'nicos. (PhD Thesis, Universidad Polite'cnica de Cartagena)*.
36. Germana, M.A., 2007. Haploidy. *In: I. A. Khan (Ed.): Citrus, Genetics, Breeding and Biotechnology, CABI Publ., pp:167-196*.
37. Ghazvini, R.F. and S. Shirani, 2002. Study of the effects of somatic embryogenesis of unfertilized ovules from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* L.) on different media. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6(2):44-52.
38. Gmitter, F.G., X.B. Ling and X.X. Deng, 1990. Induction of triploid Citrus plants from endosperm cali *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80:785-790.
39. Gmitter, F.G. and X.B. Ling, 1991. Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(2): 317-321.
40. Göçmen, M., İ. Polat ve Ç. Çakır, 2003. Turunçgil türlerine uygun RAPDs markörlerin belirlenmesi. *Derim*, 20:43-47.
41. Göral, T., 1987. Turunçgillerde çeşit geliştirme ve olanakları. *Derim*, 4(2):63-77.
42. Grosser, J.W., F.G. Gmitter and J.L. Chandler, 1988. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flaying dragon. *Plant Cell Reports*, 7:5-8.
43. Grosser, J.W., F.G. Gmitter, W.S. Jr. Castle and J.L. Chandler, 1996. Production and evaluation of Citrus somatic hybrid rootstocks. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1246-1250.
44. Grosser, J.W., J.L. Chandler and W.L. Duncan, 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid Citrus rootstocks with potential for improved tolerance/ resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae*, 113(1):33-36.
45. Guo, W.W., S.X. Xiao and X. Deng, 2013. Somatic cybrid production via protoplast fusion for Citrus improvement. *Scientia Horticulturae*, 163:20-26.
46. Gülşen, O. ve N. Mutlu, 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım*, 4(2):27-37.
47. Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa, 2006. Development of PCR-based allele-specific InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theoretical Applied Genetics*, 113:251-260.
48. Honsho, C., K. Tsuruta, K. Ryuto, A. Sakata, S. Kuroki, A. Nishiwaki and T. Tetsumura, 2015. Characterization of seed and embryo abortion during fruit development in several Citrus cultivars pollinated by Nishiuchi Konatsu (*Citrus tamurana*) and preliminary trial of embryo rescue of aborting embryos. *Acta Horticulturae*, 1065:181-186.
49. Hu, C.Y. and A.G. Ferreira, 1998. Cultura de embrioes. *In: Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, 1: 371-393.
50. IAEA, 2018. International Atomic Energy Agency. (<https://www.iaea.org>).
51. Jaskani, M.J., I.A. Khan and M.M. Khan, 2005. Fruit set, seed development and embryo germination in interploid crosses of Citrus. *Scientia Horticulturae*, 107:51-57.

52. Jia, Y.L., 1993. Recovery and characterization of triploid Citrus hybrids following $2x \times 4x$ hybridization. *M.Sc. Thesis, University of California*.
53. Jia, H.G. and N. Wang, 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *Plos One*, 9(4):e93806.
54. Jia, H., Y. Zhang, V. Orbovic, J. Xu, F.F. White, J.B. Jones and N. Wang, 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in Citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15:817-823.
55. Jimenez, V.M., E. Guevara and F. Bangerth, 2001. Endogenous hormone levels in habituated nucellar Citrus callus during the initial stages of regeneration. *Plant Cell Reports*, 20(1):92-100.
56. Kaneyoshi, J., T. Furuta, T. Shioda, S. Akasaka, Y. Yanagimoto and H. Kurihisa, 2014. Appearance of triploids in natural hybrid seedlings of lemon and breeding of new cultivar 'Yellow Bell'. *The Japanese Society of Horticultural Science*, 13:19-26.
57. King, B.J., L.S. Lee and P.T. Scott, 1996. Identification of triploid Citrus by isozyme analysis. *Euphytica*, 90(2):223-231.
58. Kiong, A.L.P., L.S. Wan, S. Hussein and R. Ibrahim, 2008. Induction of somatic embryos from different explants of *Citrus sinensis*. *Journal of Plant Sciences*, 3(1): 18-32.
59. Krug, C.A., 1943. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus Citrus. *Botanical Gazette*, 104:602-611.
60. Kunitake, H., H. Kagami and M. Mii, 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae*, 47:27-33.
61. Kurt, S. and S. Ulger, 2014. Production of Common Sour Orange \times Carrizo Citrange hybrids using embryo rescue. *International Journal of Fruit Science*, 14:42-48.
62. Kurt, Ş., 2020. Turunçgillerde melezleme yoluyla elde edilen bireylerde uygun embriyo kurtarma aşamasının ve melez bireylerin ploidi seviyesinin belirlenmesi (Doktora Tezi). *Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi / Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Isparta, 155s.*
63. Li, D.D., W. Shi and X.X. Deng, 2002. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan Mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports*, 21:153-156.
64. Liu, F., G.L. Sun and B. Salomon, 2001. Distribution of allozymic alleles and genetic diversity in the American Barley Core Collection. *Theoretical Applied Genetics*, 102:606-615.
65. Liu, J.J., K.L. Chen, J. He and B. Guan, 2012. Haploid and polyploid hybrids obtained from cross of diploid Citrus. *12th International Citrus Congress (ICC), Abstract Book*, 51.
66. Lu, Y.B., Y.P. Qi, L.T. Yang, J. Lee, P. Guo, X. Ye, M.Y. Jia, M.L. Li and L.S. Chen, 2015. Long-term boron-deficiency-responsive genes revealed by cDNA-AFLP differ between *Citrus sinensis* roots and leaves. *Frontiers in Plant Science*, 6:585. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2015>)
67. Luro, F., F. Maddy, P. Ollitrault and D. Rist, 2000. Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrids. *Proceedings of 9th International Citrus Congress. International Society of Citriculture*, 168-169.
68. Matsubara, S., 1964. Effect of nitrogen compounds on the growth of isolated young embryos of *Datura*. *Botanical Magazine*, 77:253-259.
69. Maya, M.A., M.G. Rabbani, M.G. Mahboob and Y. Matsubara, 2012. Assessment of genetic relationship among 15 citrus fruits using RAPD. *Asian Journal of Biotechnology*, 4:30-37.
70. Morais-Leno, L.S., A.S. Souza, W.D.S. Soares-Filho and C.A. Silva-Ledo, 2008. Adjustment of nutrients of the MT medium for the cultivation of Cleopatra tangerine immature embryos. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal SP*, 30(1):1-6.
71. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

72. Murashige, T. and P.H. Tucker, 1969. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. *Proceedings 1st International Citrus Symposium*, 3:1155-1161.
73. Mwangangi, I.M., J.K. Muli and J.O. Neondo, 2019. Plant hybridization as an alternative technique in plant breeding improvement. *Asian Journal of Research in Crop Science*, 4(1):1-11.
74. Narayanaswamy, S. and K. Norstog, 1964. Plant embryo culture. *Botanical Review*, 30:587-628.
75. Navarro, L., P. Aleza, J. Cuenca, J. Juárez, J.A. Pina, C. Ortega, A. Navarro and V. Ortega, 2012. The triploid mandarin breeding program in Spain. *12th International Citrus Congress, Abstract Book*, 37.
76. Nishimasu, H., F.A. Ran, P.D. Hsu, S. Konermann, S.I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang and O. Nureki, 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156: 935-949.
77. Nito, N. and T. Akihama, 1990. Prospect of Citrus and related genera for disease resistant rootstocks. *In: Proceeding IV Asia-Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, UNDP-FAO Regional Project RAS/86/022, (pp:39-47), Chiang Mai, Thailand, Hong Kong.*
78. Ohgawara, T., S. Kobayashi, K. Ohgawara, H. Uchimiya and S. Ishii, 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71(1):1-4.
79. Ohta, Y. and K. Furusato, 1957. Embryo culture in Citrus. *Kihara Institute for Biological Research*, 23:49-54.
80. Oiyama, I. and S. Kobayashi, 1990. Poliembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with Citrus tetraploid. *HortScience*, 25: 1276-1277.
81. Oliveira, R.P., C.I. Aguilar-Vildoso, C. Mariangela and M.A. Machado, 2004. Skewed RAPD markers in linkage maps of Citrus. *Genetics Molecular Biology*, 27(3):437-441.
82. Ollitrault, P., D. Dambier, C. Cabasson, C. Teisson and F. Luro, 1994. Protoplast fusion in Citrus. *Fruit*, 49:5-6.
83. Ollitrault, P., Y. Froelicher, D. Dambier, F. Luro and M. Yamamoto, 2007. Seedlessness and ploidy manipulation. *In: I.A. Khan (Ed.): Citrus, Genetics, Breeding and Biotechnology, CABI Publ., pp:197-218.*
84. Ollitrault, P., D. Dambier, F. Luro and Y. Froelicher, 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Reviews*, 20:323-354.
85. Ollitrault, P. and L. Navarro, 2012. Citrus. *in: M.L. Badenes, D.H. Byrne (Eds.). Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding (8), Springer Science Business Media, LLC, New York, USA, pp:623-662.*
86. Özsan, M., Ö. Tuzcu, Ş.A. Aktepe, H.B.K. Çelikel, E. Özdemir ve İ. Çimen, 1986. Turunçgillerde aşığızü seleksiyon-sertifikasyonu ve çeşit geliştirme. *Derim*, 3(3):147-156.
87. Pan, C.H., Z.B. Wang, Y.Y. Ma, Y. Yin, Y.F. Zhang, S.M. Zuo, Z.X. Chen and X.B. Pan, 2008. InDel and SNP markers and their application in mapbased cloning of rice genes. *Rice Science*, 15:251-258.
88. Pasqual, M., V.G. Riberio and J.D. Ramos, 1990. Influencia do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja Natal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasilia*, 25(10):1477-1482.
89. Pasqual, M., D.R. Finotti, L.F. Dutra, E.A. Chagas and L.O. Riberio, 2002a. *In vitro* culture of Ponca mandarin immature embryos: pH × agar concentration. *Revista Brasileira De Agrociencia*, 8(3):199-202.
90. Pasqual, M., G.P. Alves, L.F. Dutra, D.R. Finotti and E.A. Chagas, 2002b. *In vitro* culture of Ponca mandarin immature embryos: MS medium and sucrose concentrations. *Revista Ceres*, 49(282): 181-189.
91. Pasqual, M., G.P. Alves, L.F. Dutra, E.A. Chagas and L.O. Riberio 2003. *In vitro* development of immature embryos from Ponca mandarin × Pera sweet orange in different photoperiods. *Ciencia e Agrotecnologia*, 27(3):535-540.
92. Pena, L., M. Cervera, R. Ghorbel, A. Dominguez, C. Fagoaga, J. Juarez, J.A.

- Pina and L. Navarro, 2007. Genetic transformation. In: I.A. Khan (Ed.): *Citrus, Genetics, Breeding and Biotechnology*, CABI Publ., pp:329-344.
93. Perez-Tornero, O. and I. Porras, 2008. Assessment of polyembryony in lemon: Rescue and *in vitro* culture of immature embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 93:173-180.
94. Perez-Tornero, O., D. Cordoba, M. Moreno, I. Yuste and I. Porras, 2011. Use of classical methods and tools biotecnologicas in the genetic improvement of the lemon tree: Preliminary results. *Horticultura Global*, 296:14-17.
95. Polat, İ., E. Turgutoğlu and Ş. Kurt, 2015. Determination of genomic diversity within mutant lemon (*Citrus limon* L.) and mandarin (*Citrus reticulata*) using molecular markers. *Pakistan Journal of Botany*, 47:1095-1102.
96. Raghavan, V., 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biological Reviews*, 41:1-58.
97. Raghavan, V., 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. *Academic Press*, 187-192.
98. Raghavan, V., 2003. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. In *in vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39:437-442.
99. Raghuvanshi, S.S., 1962. Cytogenetical studies in genus Citrus. IV. *Evolution in Genus Citrus, Cytologia*, 27:172-188.
100. Rangan, T.S., T. Murashige and W.P. Bitters, 1969. *In vitro* study of zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1:225-229.
101. Rao, M.N., J.R. Soneji and L. Sahijram, 2011. Citrus. In: C. Kole (Ed.): *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources-Tropical and Subtropical Fruits*, Springer, pp:43-59.
102. Ray, P.K., 2002. Breeding tropical and subtropical fruits. *Springer Science & Business Media*, pp:84-106.
103. Reed, S.M., 2005. Embryo rescue. *Plant Development and Biotechnology*, 18:235-239.
104. Ribeiro, V.G., D. Sanábio, C.N. Souza, P.S.N. Lopes, M.R. Bocado and M. Pasqual, 2000. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35:27-30.
105. Rietsema, J., S. Satina and A.F. Blakeslee, 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. *American Journal of Botany*, 40:538-545.
106. Roose, M.L., D. Fang, F.S. Cheng, R.I. Tayyar, C.T. Federici and R.S. Kupper, 2000. Mapping the Citrus genome. *Acta Horticulturae*, 535:25-32.
107. Ruiz, C. and M.J. Asins, 2003. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:826-836.
108. Sahijram, L., J.R. Soneji, A. Naren and B.M. Rao, 2013. Hybrid embryo rescue: a non-conventional breeding strategy in horticultural crops. *Journal of Horticultural Science*, 8(1):1-20.
109. Sharif, N., M.J. Jaskani and N. Memon, 2013. Responses of Citrus rootstock ovules to colchicine applications *in vitro*. *International Journal of Agricultural Technology*, 9(1):201-209.
110. Sharman, D.R. and R.K. Kaur, 1996. Embryo rescue in plants a review. *Euphytica*, 89:325-337.
111. Soni, A., A.K. Dubey, A. Gupta, R.M. Sharma, O.P. Awasthi, C. Bharadwaj and N. Sharma, 2019. Optimizing embryo age and media for enhancing hybrid seedling recovery in Sour orange (*Citrus aurantium*) × Sacaton citrumelo (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*) crosses through embryo rescue. *Plant Breeding*, 9p., doi:10.1111/pbr.12690.
112. Soost, R.K. and M.L. Roose, 1996. Citrus. In: J. Janick, J.M. Moore (Eds.): *Fruit Breeding, Vol:1, Tree and Tropical Fruits*, John Wiley, New York, pp:256-323.
113. Spiegel-Roy, P. and J. Kochba, 1973. Mutation breeding in Citrus. *International Atomic Energy Agency (IAEA)*, Vienna, 91p.
114. Spiegel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt, 1996. Biology of Citrus. *Cambridge University Press*, New York, 230p.
115. Starrantino, A. and F. Russo, 1980. Seedlings from underdeveloped ovules of

- ripe fruits of poliembryonic Citrus cultivars. *HortScience*, 15:296-297.
116. Starrantino, A. and G. Reforgiato-Recupero, 1981. Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females × 4x males. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1:31-32.
117. Swingle, W.T. and P.C. Reece, 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (Eds.) *The Citrus Industry, University of California; Revised Edition (January 1, 1967), pp:190-340*.
118. Sykes, S.R. and W.J. Lewis, 1996. Comparing Imperial mandarin and Silverhill Satsuma mandarin as seed parents in a breeding program aimed at developing new seedless Citrus cultivars for Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36:731-738.
119. Şeker, M., O. Tuzcu and P. Ollitrault, 2003. Comparison of nuclear DNA content of Citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. *Plant Breeding*, 122:169-172.
120. Tan, M., J. Song and X. Deng, 2007. Production of two mandarin × trifoliolate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. *Euphytica*, 157:155-160.
121. Taşpınar, M.S. and M. Tosun, 2002. İzoenzim elektroforez tekniğinin bitki ıslahında kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(4):451-456.
122. Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo, 2003. Induction of tetraploids in ornamental alocasia through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 72:19-25.
123. Thuy, H.T., D.N. Vinh, T.T. Hanh, T.N. Thanh, L.Q. Hung, V.A. Tuan and T.D. Khanh, 2014. Integration of biotechnology and conventional breeding to develop Citrus seedless cultivars in Vietnam. *International Journal of Development Research*, 4(10):2091-2093.
124. Tuna, M., 2016. Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. IV. *Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Uygulamalı Eğitim Programı*, 29-30 Ocak, Tekirdağ, 1-24.
125. Turgutoğlu, E., Ş. Kurt, G. Demir ve Z. Eryılmaz, 2012. BATEM’de geliştirilen yeni turunçgil çeşitleri. *Borsanomi Dergisi*, 35:56-58.
126. Tusa, N., S. Fatta Del Bosco, L. Nardi and S. Lucretti, 1996. Obtaining triploid plants by crossing *Citrus lemon* cv. Femminello 2n × 4n allotetraploid somatic hybrids. *Proceedings of the International Society of Citriculture 1:133-136*.
127. Tuzcu, Ö., M. Kaplankıran ve T. Yeşiloğlu, 1988. Turunçgillerde radyasyon uygulaması ile yeni çeşitlerin ıslahı. *Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu 1. Bilim Kongresi Bildirileri*, 1:25-34.
128. Tuzcu, Ö., B. Yıldırım, S. Düzenoğlu ve İ. Bahçeci, 1999. Değişik turunçgil anaçlarının Washington Navel ve Moro kan portakal çeşitlerinin verim ve kalitesi üzerine etkileri. *Journal of Agriculture and Forestry*, 23:213-222.
129. Ulubelde, M., 1989. Turunçgillerde mutasyon. *Derim*, 6(1):38-48.
130. Umbeck, P.F. and K. Norstog, 1979. Effects of abscisic acid and ammonium ion on morphogenesis of cultured barley embryos. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 106:110-116.
131. Usman, M., M. Ramzan, B. Fatıma, M.J. Jaskani and M.M. Khan, 2002. Citrus germplasm enhancement by interploid hybridization. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(2): 208-210.
132. Usman, M., B. Fatıma, W. Abdus Samad and K. Bakhsh, 2012. Embryo culture to enhance efficiency of colchicine induced polyploidization in grapefruit. *Pakistan Journal of Botany*, 44:399-405.
133. Uzun, A., O. Gülşen, G. Kafa and U. Seday, 2008. Alata, Gulsen and Uzun seedless lemons and Eylul early-maturing lemon. *Hortscience*, 43:1920-1921.
134. Uzun, A., 2009. Turunçgillerde genetik çeşitliliğin SRAP markırları ile karakterizasyonu (Doktora Tezi). *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, 384s*.
135. Vali, U., M. Brandstrom, M. Johansson and H. Ellegren, 2008. Insertion-deletion polymorphisms (InDels) as genetic

- markers in natural populations. *BMC Genetics*, 9(1):8. doi:10.1186/1471-2156-9-8.
136. Veen, H., 1963. The effect of various growth-regulators on embryos of *Capsella bursapastoris* growing *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica*, 12:129-171.
137. Vilorio, Z., J.W. Grosser and B. Bracho, 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid Citrus fruit derived from interplod hybridization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82:159-167.
138. Wakana, A., X.N. Binh and M. Iwamasa, 2004. Germinability of embryos during seed development in Citrus (Rutaceae). *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 49(1):49-59.
139. Wang, J.F., Z.G. Chen and T.X. Lin, 1999. Observation on the embryonic development in Citrus after cross pollination. *Chinese Developmental Reproductive Biology Society*, 8(2):57-63.
140. White, P.R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9:585-600.
141. Williams, E.G., I.M. Verry and W.M. Williams, 1982. Use of embryo culture in interspecific hybridization. In: *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*, pp:119-128.
142. Xie, K.D., X.P. Wang, M.K. Biswas, W.J. Liang, Q. Xu, J.W. Grosser and W.W. Guo, 2014. 2n megagametophyte formed via SDR contributes to tetraploidization in polyembryonic 'Nadorcott' tangor crossed by Citrus allotetraploids. *Plant Cell Reports*, 33:1641-1650.
143. Xie, K.D., D.Y. Yuan, W. Wang, Q.M. Xia, X.M. Wu, C.W. Chen, C.L. Chen, J.W. Grosser and W.W. Guo, 2019. Citrus triploid recovery based on 2x × 4x crosses via an optimized embryo rescue approach. *Scientia Horticulturae*, 252:104-109.
144. Yeoman, M.M., 1986. Plant cell culture technology. *Blackwell Scientific Publisher, Botanical Monographs*, 23.
145. Yeşiloğlu, T., 2017. Turunçgil anaçlarının tarihçesi ve yeni anaçların geliştirilmesi. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 22:12-14.
146. Yeung, E.C., T.A. Thorpe and C.J. Jensen, 1981. *In vitro* fertilization and embryo culture. In: T.A. Thorpe (ed.): *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*, Academic Press, pp:253-271.
147. Yi, H., X. Deng and C. Fu, 2001. Application of embryo rescue techniques in fruit crops. *Journal of Fruit Science*, 18(4):224-228.
148. Zdrujkovskaja-Richter, A.I., 1981. Embryo cultures and development of new forms of plants. *University Moscow, Abstract*.
149. Zhang, F., C. LeBlanc, V. Irish and Y. Jacob, 2017. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in Citrus using the YAO promoter. *Plant Cell Reports*, 36(12):1883-1887.
150. Zhu, S., B. Wu, Y. Ma, J. Chen and G. Zhong, 2013. Obtaining Citrus hybrids by *in vitro* culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCR. *Scientia Horticulturae*, 161:300-305.