

TURUNÇGİL ARAŞTIRMALARINDA BİYOTEKNOLOJİ ÇALIŞMALARI

Osman GÜLŞEN * Aydın UZUN

Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Melikgazi 38030, Kayseri

* e-mail: o_gulsen@yahoo.com

Geliş Tarihi: 01.04.2010

Kabul Tarihi: 02.01.2011

ÖZET: Tarımsal alanda abiyotik ve biyotik stresler ve yeni çeşitlere olan taleplerin artması daha etkili araçların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak tarımsal araştırmalar alanında biyoteknolojinin kullanımı son dönemlerde hızla artmış ve bu alana önemli katkılar sunmuştur. Turunçgil araştırmalarında biyoteknoloji yaygın olarak taksonomik çalışmalar, hastalıktan arındırılmış ve hızlı bitki materyali üretimi, genetik çeşitliliğin tespiti, genetik haritalama, transformasyon ve gen kaynaklarının etkili korunması amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada söz konusu konularda yapılan çalışmalar gözden geçirilmekte ve önemli konular vurgulanmaktadır. Ana başlıklar üretim ve ıslah, taksonomi, gen kaynaklarının korunması ve değerlendirilmesi ile sonuç bölümlerinden oluşmaktadır.

Anahtar Sözcükler: turunçgil, taksonomi, genetik haritalama, mikroçoğaltım, gen kaynakları

BIOTECHNOLOGICAL STUDIES IN CITRUS RESEARCH

ABSTRACT: Abiotic and biotic stress and demand to new cultivars force to develop more efficient tools in agricultural industry. Related to these topics, the use of biotechnology in agricultural research have made significant contribution. Biotechnology is commonly used in Citrus research for taxonomic studies, rapid production of disease-free plant material, detection of genetic diversity, genome mapping, transformation and germplasm resources. As a result, biotechnology brought great opportunities to improve citrus fruits. In this review, the results of studies done in this area were reviewed and critical issues were emphasized. Main titles are production and breeding, conservation and utilization of genetic resources, and conclusion.

Key Words: Citrus, taxonomy, mapping, micropropagation, germplasm

1. GİRİŞ

Turunçgil (*Citrus* spp.) meyveleri tarım ve dünya ekonomisinde geniş coğrafyalara dağılan üretim alanları ve büyük miktardaki üretimiyle önemli yer tutmaktadır. Dünyanın 40° kuzey ve güney enlemleri arasında soğuk olmayan alanlarda yetiştirilir. Ancak en önemli bölgeler 20°'nin daha kuzey ve güneyinde kalan bölgelerdir. Toplam üretim alanı yaklaşık 7.45 milyon ha, üretim miktarı ise yıllara göre değişmekle birlikte 110 milyon ton civarındadır (FAO, 2008). Bunun yaklaşık % 62'sini portakallar (*C. sinensis* (L.) Osbeck), geri kalan % 38'ini ise mandarin (*C. reticulata* Blanco), limon (*C. limon* (L.) Burm. F.) ve altıntoplar (*C. paradisi* Macf.) oluşturmaktadır.

Turunçgil meyveleri çok küçükten çok büyüğe kadar farklılık gösterir. Ticari değer taşıyan *Citrus* cinsine ait türler içerisinde en küçük meyveler laymlarda (*C. aurantifolia* (Christm) bulunur ve bazen çapları 3 cm'yi geçmez. En büyük meyveler ise şadok (*C. maxima* (Burm.) Merrill) ve ağaç kavunu (*C. medica* L.)'nda bulunur ve 30 cm'ye kadar ulaşabilir. Turunçgiller diğer karakterler açısından da büyük varyasyon göstermektedir. Meyve kabuğu limon ve laymlardaki gibi yeşilden mandarinlerdeki kırmızımsı turuncuya kadar çeşitli renklerde olabilir. Meyveleri çok asitli veya çok tatlı olabilir. Turunçgil ağaçlarında taç büyüklüğü ile taç yapısında büyük farklılık göstermektedir.

Günümüzde kültürü yapılan turunçgil tür ve çeşitlerinin tamamına yakını diploid kromozom yapısına sahip olup $2n = 18$ kromozom içermektedir. Bunun yanında ıslah yöntemleri kullanılarak triploid yapıda turunçgil çeşitlerinin elde edilmesi ve bu

şekilde çekirdeksizliğin sağlanmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (Kobayashi ve ark., 1997). Turunçgillerde toplam genom uzunluğunun 1500–1700 cM (santimorgan) olduğunu bildirilmiştir (Jarrell ve ark., 1992).

Turunçgillerde ıslahçıların çalışabileceği çok büyük varyasyon ve geniş çaplı gen kaynakları mevcuttur. İslahta amaca uygun özelliklerin veya bireylerin seçilebilmesi için çalışılan populasyonun mutlaka varyasyon göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle ıslah çalışmaları için varyasyon olmazsa olmaz kriterlerden biridir. Ancak bu varyasyonun yararlı bir şekilde kullanılabilmesi için hala bazı engeller bulunmaktadır. Bu engelleri aşmak üzere çok farklı metodlarla çalışılmaktadır ve bunun sonucunda önemli gelişmeler kaydedilmiş; pek çok sorun çözüme kavuşturulmuş, ancak hala bazı sorunlar mevcuttur. Bu çalışmada, bu alanda yapılan çalışmalar gözden geçirilmekte ve özellikle konuyla ilgili literatürler gösterilmektedir.

2. ÜRETİM VE ISLAH

Turunçgiller (*Citrus* spp.) anaç üzerine aşılardan gözlerin uyarılmasıyla çoğaltılır ve bu yöntem uzun yıllardır gerek ıslah programlarında gerekse de yetiştiricilikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında daha küçük bitki dokularının kullanılabilmesine imkan sağlayan doku kültürü teknikleri, klasik yöntemlerle çoğaltmada sorun yaşanan durumlarda seri ve hızlı üretim için kullanılmaktadır. *In vitro* turunçgil çoğaltımı çeşitli açılardan incelenmiştir. Bitki dokusu (ekspant) olarak ise genellikle boğumlardan alınan parçacıklar ana

bitkiye benzer bireyler ortaya çıkarmasına rağmen, boğum arasından alınan parçacıklar daha fazla varyasyon gösterebilmektedir (Barlass ve Skene, 1986). Mandarin ve Meksika laymında genç fidanların sürgünlerinin boğum aralarından uzunlamasına alınan parçalarla başarılı bir şekilde mikroçoğaltım yapılabilmektedir (Perez-Molphe-Balch ve Ochoa-Alejo, 1997). Bu çalışmada boğum aralarının yaralı bölgelerinden alınan parçaların mikroçoğaltımında daha başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Genç fidanlara ait parçacıklar yetişkin ve yaşlı ağaçlardan alınan parçalara göre daha hızlı yeni bitkiler oluşturabilirler. Sürgün ucu ve kök parçacıkları da mikroçoğaltımda kullanılır (Sim ve ark., 1989). Nesli tükenmekte olan bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltılmasında mikroçoğaltım son derece başarılı bir şekilde kullanılabilir (Grewal ve ark., 1994). Ticari olarak yetiştiriciliği yapılmayan turunçgil türlerinden *C. assamensis*, *C. latipes* ve *C. indica* mikroçoğaltım yöntemiyle çoğaltılabilmektedir (Baruah ve ark., 1996). Almeida ve ark. (2002), portakal ve 'Rangpur' laymında epikotil kısımlarını kullanarak organogenesis yoluyla *in vitro* çoğaltımı başarıyla uygulamışlardır. Ali ve Mirza (2006), kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.) eksplantlarından mikroçoğaltım çalışmalarında kallus oluşumu için en uygun ortamı 1.5 mg/l 2,4 D içeren Murashige ve Skoog (MS), köklenme için ise 3 mg/l BA içeren MS ortamı olarak saptamışlardır.

Somatik embriyogenesis turunçgillerde genellikle daha avantajlıdır, çünkü pek çok turunçgil türü nuseller embriyonu gösterme eğilimindedir. Bu yüzden ovuller öyle bir yapıya sahiptir ki embriyogenesis için gerekli pek çok özellik nuseller embriyonu gösteren genotiplerde çoktan oluşmuştur. Bununla birlikte, endosperm kallusları (Gmitter ve ark., 1990), usare kesecikleri ve gelişmemiş ovuller (Coelho ve ark., 1998), gövde parçaları (Chatuvedi ve Mitra, 1975) mikroçoğaltımda kullanılmaktadır.

Turunçgillerde her ne kadar klonal varyasyon görülse de ağırlıklı olarak ana bitkiye benzer bitkicikler elde edilebilmektedir (Tapati ve ark., 1995). *In vitro* tekniklerde kullanılan ortamlar son derece detaylı çalışılmış ve ideal ortamda bulunması gerekli maddeler ve konsantrasyonlar belirlenmiştir (Wu ve ark., 2008). Örneğin, ovülden elde edilen kalluslardan somatik embriyo elde edilmesi amacıyla en uygun gliserol konsantrasyonu % 4-5 olarak bildirilmiştir (Kayim ve Koç, 2006). Ayrıca, pratik olarak hızlı ve sağlıklı turunçgil fidanı üretmeye yönelik olarak *in vitro* aşılama tekniği mandarinlerde başarıyla uygulanmaktadır (Parthasarathy ve ark., 1997).

2.1. Genetik haritalama

Turunçgillerde genetik haritalar pek çok üniversite ve araştırma enstitülerinde geliştirilmeye çalışılmaktadır. Genetik bağlantı (linkage) haritaları moleküler markırların kalıtımı temeline dayanır. İlk amaç ilgilenilen bitkisel özelliği temsil eden markırları

geliştirmek ve ikinci olarak belki de uzun vadeli amacı bu haritalara dayalı olarak önemli bitkisel karakterleri kontrol eden genleri klonlamaktır. Roose (2007) bugüne kadar turunçgillerde yürütülen genetik haritalama çalışmalarını incelemiştir. Bugüne kadar elde edilen genetik haritalama çalışmalarında haritalanan markır sayısı yetersiz, haritalar eksik, markır yoğunluğu düşüktür. Markır olarak daha çok izoenzimler, RFLP, RAPD ve SSR markırları kullanılmaktadır. Çalışılabilen ve haritalarda kullanılan izoenzim sistemi sayısı oldukça sınırlıdır. SSR markırları açısından da benzer bir durum söz konusudur. Çünkü SSR primerlerini geliştirmek oldukça masraflıdır, uzun zaman ve çok dikkatli çalışmayı gerektirir. RFLP ve RAPD markırları ise sayısal açıdan bir problem teşkil etmez. Ancak, RFLP markırlarında farklı populasyonlarda kullanılan problemler birden fazla sayıda lokusa yapışabilmektedir ki bu o markırın değerlendirilmesini imkansız hale getirmektedir (Roose, 1993). Ülkemizde de turunçgillerde genetik haritalama çalışmaları yapılmakta olup, son çalışmalarda altı farklı markır sistemi kullanılarak Klemantin mandarini X Orlando tanelo melezlerinde genetik haritalama çalışmaları yapılmış ve şimdiye kadar elde edilen haritalara göre daha yoğun bir şekilde genom taranarak haritalar elde edilmiştir (Gülşen ve ark., 2010). Genellikle farklı laboratuvarlar tarafından geliştirilen haritalar arasında farklılıklar bulunmasına rağmen büyük oranda benzerlik bulunmaktadır. Farklı laboratuvarlarda geliştirilen turunçgil genetik haritaları. Farklı laboratuvarlarda geliştirilen haritalar bir bilgisayar programı olan JOINMAP ile tek bir linkage haritasına dönüştürülebilmektedir (Stam, 1993). Ancak burada en büyük sorun farklı haritaların ortak markırlar içermemesidir.

Önemli karakterleri kontrol eden birkaç turunçgil geni klonlanmış ve izole edilmiş durumdadır (Deng ve ark., 1997; Canel ve ark., 1996; Fang ve ark., 1997; Garcia ve ark., 1999). Turunçgil genomu hem kromozom sayısı bakımından hem de DNA miktarı bakımından yüksek bitkiler arasında en küçüklerden birisidir (Guerra, 1984). Bu nedenle spesifik genleri gen kütüphanelerinden izole etmek eğer prob varsa oldukça kolaydır. Önemli karakterlerin kalıtımının bilinmemesi klonlama ve karakterizasyonun önündeki en büyük engeldir.

Eğer ilgilenilen gen bölgelerine ait klon mevcutsa, ki bu daha önceden çeşitli bitkilerde çalışılmıştır, bu durumda çalışılacak bitkinin RNAları izole edilerek ters transkripsiyon ile cDNA kütüphaneleri hazırlanır ve bu kütüphane içerisinden daha önceden temin edilmiş klon veya prob ile söz konusu gen veya genler kütüphane içerisinde tespit edilir (Komatsu ve ark. 1996).

Turunçgillerde en yaygın görülen Tristeza (CTV) virüsüne karşı dayanıklılığı sağlayan gen SCAR markırlarıyla tanınmıştır (Deng ve ark. 1997). Özellikle bulk segregant analiziyle 20 dayanıklı bitkide görülen markırlar kullanılarak daha uzun

primerler üretilmiş ve bunlarda daha güvenilir markırlar olan SCAR markırlarına dönüştürülmüştür. SCAR markırları markır yardımıyla seleksiyonda etkili bir şekilde kullanılabilir. Tanımlanan genlere ait DNA dizinler kullanılarak o gen veya genlerin yeni formları tespit edilebilmektedir (Cepeda-Nieto ve Barera-Soldana ve ark., 1997). Bu çalışma için kullanılan PCR reaksiyonlarında primerle tespit edilmeye çalışılan DNA dizininin mutlak surette aynı olması gerekmediğinden yeni formlar tespit edilebilir. Diğer markır metodu olan AFLP (amplified fragment length polymorphism) markırlarının bulk segregant analizi yöntemiyle turunçgillerde poliembriyoninin mekanizması tespit edilmiş ve dominant tek bir gen ile küçük etkiye sahip modifiye edici genlerin olabileceğİ belirtilmiştir (Kepiro ve Roose, 2010).

Turunçgillerde asitlik son derece önemli bir konudur. Genelde şeker/asit oranı son derece önemli olmakla birlikte limonlarda olduğu gibi tek başına asit konsantrasyonunda son derece önemlidir. Bulk segregant analiziyle elde edilen asitliği belirleyen 3 RAPD markırı tespit edilmiş ve daha etkili markır olan SCAR markırlarına dönüştürülmüştür (Fang ve ark., 1997).

Son yıllarda genomik araştırmaların bilgiye ulaşmada kısmen yetersiz kaldığı durumlarda proteomik çalışmaları öne çıkmış durumdadır. Genom, aynı organizmanın tüm hücrelerinde sabitken, proteom nitelik ve nicelik bakımından bir hücre tipinden diğerine ve hatta aynı hücre tipinin değişik metabolik safhaları veya koşulları için farklılık gösterebilmektedir. Genlerin nihai ürünlerinin proteinler olduğu ve sentez sonrası protein modifikasyonları göz önüne alındığında kantitatif proteomik, gen ifadesi çalışmaları için çok önemli bir araçtır (Gauss ve ark. 1999; Gygi ve ark., 2000). Görüldüğü gibi proteom çalışmaları diğer genomik araştırmalarla alınamayan sonuçların alınabilmesine imkan vermektedir. Bu yöntem, turunçgillerde meyve eti kırmızı ve sarı portakallar arasındaki protein farklılıklarının belirlenmesi (Muccilli ve ark., 2009), stres koşulları altında protein düzeyinde değişimleri saptanması (Shi ve ark., 2008) ve somatik embriyogenesis çalışmalarında (Pan ve ark., 2009) kullanılmıştır.

2.2. Doku kültürü çalışmaları

Nuseller kalluslardan üretilen turunçgil bitkilerinde nadir olsa da somaklonal varyasyon görülmektedir (Vardi ve Gallun, 1988). Spigel-Roy ve Ben-Hayyim (1985) ve Ben-Hayyim ve Goffer (1989) tarafından yapılan çalışmalarda kültür ortamında oluşan kalluslarda bazı hücre hatları tuza tolerans açısından seçilmiş ve daha sonra bitkiciklere dönüştürülmüştür. Ancak, elde edilen bitkicikler boğum arasına sahip olmadığından daha sonra çoğaltılamamıştır. Öte yandan, uçkurutan etmenine karşı limon kalluslardan seleksiyon yapılmış ve dayanıklı hatlar izole edilmiştir (Nadel ve Spigel-Roy 1987). Hatlardan birisi üç kültürde de arka arkaya

dayanıklılık göstermiş ancak bu kallus hatlarından elde edilen bitkiciklerde dayanıklılığa raslanmamıştır. *Phytophthora citrophora*'ya dayanıklılıkla ilgili yapılan bir çalışmada herhangi bir hücre hattına raslanmamıştır (Vardi ve ark., 1986).

Çalışılan pek çok turunçgil tipi ve birkaç akraba cinsine ait bitkiler protoplaslarla çoğaltılabilmüştür (Oliveira ve ark., 1994; Kaneyoshi ve ark., 1994; Grosser ve ark., 1996). Çoğunlukla ovullardan elde edilen protoplastlar kullanılmasına rağmen yapraklardan elde edilen protoplastlardan da bitkicikler elde edilebilmiştir (Moriguchi ve ark., 1996).

Çok yıllık bitkilerde ışlah programları çok uzun olduğundan ve hastalıkla beraber diğer stres koşullarına dayanıklılık gibi önemli karakterleri kontrol eden genlerin hızlı bir şekilde yabancı formlardan kültür formlarına transferi biyolojik olarak kromozom çiftleşmesindeki bariyerler nedeniyle zor olduğundan somatik hibridizasyon gittikçe önem kazanmaktadır. Turunçgiller, kamkatlar, üç yapraklılar ve diğer 4 akraba cinsi içeren bitki protoplastlarının füzyonuyla canlı allotetraploid bitkiler üretebilmiştir (Grosser ve ark., 1996). Bir diğer benzer çalışma mandarin, altıntop ve portakal arasında gerçekleştirilmiştir (Mourao ve ark., 1996). Somatik hibridizasyonda kullanılan en yaygın stratejiler embriyogenik olmayan yaprak ve genç fidan protoplastlarıyla embriyojenik kallusların PEG (polyethylene glicol) kullanılarak füzyonunu içerir. Füzyon sonucu elde edilen bitkiler tamamen veya kısmen somatik hibrit olabilir. Eğer elde edilen bireylerin hepsi somatik hibrit değilse bu durumda gözlem suretiyle seleksiyon yapılabilir (Grosser ve Gmitter, 1990) veya bir kültür ortamında füzyon olmamış bir parente embriyogenesisi ve çoğalmayı engelleyen bir metod kullanılarak seçilebilir (Ohgawara ve ark., 1985). Elde edilen yeni bireylerin hibrit olup olmadığı kromozom sayıları, izoenzim testleri, ribozomal DNA ve morfoloji analizleriyle anlaşılabilir. Moriguchi ve ark. (1996) ise füzyon yapılacak genotiplerin somatik hibridizasyonun başarısını etkilediğini bulmuşlardır. Örneğin turunçgillere akraba cins olan *Severinia* turunçgil nematodlarına karşı bağışıklılığa sahiptir ve *Phytophthora*'ya dayanıklıdır. Somatik hibritlerin melezleme ışlahında kullanımı ise kromozom sayılarındaki ve her çekirdekdeki DNA miktarındaki farklılıklar nedeniyle sınırlayıcı bir etken oluşturabilecektir.

Somatik hibridizasyon çalışmaları ile çekirdeksiz turunçgil çeşitlerinin elde edilmesi amacıyla Satsuma mandarini (*Citrus unshiu* Marc.) stoplazması ile Murcott mandarini protoplastı füzyon yoluyla birleştirilmiş ve başarılı bir şekilde somatik hibrit kalluslar elde edilmiştir (Xu ve ark., 2006a). Kaneyoshi ve ark. (1997) diploid Satsuma mandarini ile tetraploid Ponkan mandarini melezleyerek elde ettikleri çekirdeksiz meyve verebilecek triploid embriyoyu *in vitro* olarak çoğaltılabilmüşlerdir. Somatik

hibridizasyon çalışmaları aynı zamanda hastalıklık ve zararlılara dayanıklı yeni çeşit ve anaçların elde edilmesi amacıyla da kullanılmıştır. Bu yolla turunçgil kanseri (*Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces pv. *Citri*) ve turunçgil varigated klorosis-CVC (*Xylella fastidiosa*) hastalıklarına dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır (Pavan ve ark., 2007). Öte yandan mandarin ve şadok protoplastları füzyon yoluyla birleştirilerek nematoda dayanıklı yani anaçların geliştirilmesi çalışmaları yapılmış ve dört adet ümitvar somatik hibrit elde edilmiştir (Grosser ve ark., 2007).

Bir diğer genetik iyileştirmede kullanılan metod da haploid bitkilerin üretimidir. Jain ve ark. (1997) turunçgillerinde içinde bulunduğu Aurantioideae familyasıyla beraber pek çok bitki familyasında haploid bitki dokularından yeni bitkiler elde edebilmiştir. Bilindiği gibi anter veya pollen gibi haploid sayıda kromozom bulunduran bitki dokularından yeni bitki elde edilmekte ve bu yolla elde edilen saf hatlar ebeveyn olarak kullanıldığında gerek melezleme ıslahında gerek genetik haritalama çalışmalarında büyük avantajlar sağlamaktadır. Öte yandan anter kültürü çalışmaları ile Nules klemantininde tri haploid bitkiler de elde edilebilmiştir (Chiancone ve ark., 2006). Tri haploid çeşitler çekirdeksiz olduklarından bu yöntem çekirdeksiz çeşit ıslahında kullanılabilir önemli bir uygulamadır.

Turunçgillerde doku kültürü yolu ile elimine edilebilen pek çok virüs ve mikoplazma benzeri organizma görülür. Bu patojenlerin bazıları tohumla taşınmaz ve bu yüzden nuseller orijine sahip genotipler yaygın olarak kullanılır. Son yıllarda bunun yerine sağlıklı anaçlar üzerine mikro aşılama suretiyle elde edilen virüslerden ari bitkiler kullanılmaktadır. Turunçgillerde virüs hastalıklarının kontrolü çok zor hatta genellikle imkansız olduğundan hastalıktan ari fidanlarla üretimin yapılması büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında virüslerle bulaşık materyallerden bir sonraki üretim aşaması için temiz materyal sağlanması da virüslerin elimine edilmesi ile mümkün olabilmektedir. Bu konuda en çok kullanılan yöntem sürgün ucu aşılama yöntemidir. Zarei ve Rahimian (1997)'nin yaptığı çalışmada Tristeza virüsünden ari Satsuma (*C. unshiu* Marc.) mandarini bir üç yapraklı melez anacı üzerine başarıyla mikro aşı yöntemiyle aşılanmıştır. Yine 'Mosambi' çeşidi portakalda hastalıklı bitkiler kullanılarak sürgün ucu aşılama yöntemi ile virüsten ari bitkiler elde edilmiştir (Abbas ve ark., 2006). Ayrıca, termoterapi de alternatif metod olarak kullanılmaktadır. Sharma ve ark. (2007), 'Kinnow' mandarininde *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) hastalığından ari bitkilerin elde edilmesi için sürgün ucu aşılama tekniğini kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bunun yanında ovullardan veya nuseller orijinli kalluslardan elde edilen bitkicikler virüslerin elimine edilmesi konusunda alternatif metodlar sunmaktadır (Huang ve ark., 1988). Ayrıca turunçgil psorosis virüsü ile bulaşık mandarin, portakal ve tangorda

somatik embriyogenesis yöntemi ile virüs eliminasyonu yapılmıştır. Bu türlerde hastalıklı stigma ve dışık borusu dokularından rejenerasyon ile elde edilen bitkiciklerde sonra hastalık bulunmadığı tespit edilmiştir (D'Onghia ve ark., 2001).

2.3. Transformasyon

Genetik transformasyon, klasik yöntemlerin eksik yönlerini tamamlayıcı olarak istenen yönde materyal ıslahı sağlayan ümitvar bir metod olarak görülmektedir (Singh ve Rajam, 2009). Transformasyon bir organizmada bulunmayan ve istenen bir özelliği sağlayan genin başka bir organizmadan farklı yöntemler kullanılarak hedef organizmaya aktarılmasıdır. Turunçgillerde yüksek düzeydeki heterozigoti oranı ve nuseller embriyonu klasik yöntemlerin uygulandığı ıslah programlarındaki başarı şansını azaltmaktadır. Transformasyon çalışmaları bu konuda istenen karakterlerin elde edilmesi adına önemli avantajlar sunabilmektedir (Yang ve ark., 2000). Bu konudaki ilk çalışmalarda odunsu bitkilerde metodoloji oluşturmak amacıyla 'Trovita' portakalından elde edilen protoplastlar kanamisin dayanıklılık geni ve bakteriden izole edilen yabancı gen [(aminoglycoside phosphotransferase II [APH(3'')II] içeren DNA konstraktı ile transforme edilmiş ve transformasyon Southern Hibridizasyonu ile doğrulanmıştır (Kobayashi ve Uchimiya, 1989). Transforme edilen turunçgillerin üretimi üç farklı araştırmacı grup tarafından gerçekleştirilmiştir. Vardi ve ark. (1990) kaba limon protoplastlarına PEG ortamı direk DNA alımıyla NPT II geni aktarmış ve NPT II geni içeren iki bitkicik elde etmiştir. Hidaka ve ark. (1990) tatlı portakala ait embriyojenik kallus süspansiyon kültürlerini *Agrobacterium* kullanarak transforme etmiş ve bir bitki üretmiştir. Embriyojenik turunçgil kalluslarında partikül bombardımanı yolu ile tranformasyon gerçekleştirmiştir (Kayım ve ark., 1994; Yao ve ark., 1996). Metodoloji üzerinde yapılan çalışmalardan biriside Gutierrez ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışma ile *Agrobacterium* ortamı transformasyon üzerine etki eden faktörler tespit edilmeye çalışılmıştır. Partikül bombardımanı sırasında oluşturulan yaralar transformasyonu etkilememesine rağmen *in vitro* ortamda kullanılan benzil adenin konsantrasyonu elde edilen sürgün sayısını ve köklenmeyi etkilemiştir. Pena ve ark. (1997) tarafından yapılan metodoloji ile ilgili bir başka çalışmada bitki eksplantlarının karanlıkta bir süre bırakılmasının transformasyon başarısını etkilediğini tespit edilmiştir. Son dönemlere kadar yapılan transformasyon çalışmaları ile daha çok metodoloji üzerinde durulmuş transformasyon yolu ile bitki elde edilmesi uzun bir süreç almıştır. Bunun nedeni olarak da turunçgillerin *Agrobacterium* için doğal bir konukçu olmaması gösterilmiştir (Pena ve ark., 2004).

Transformasyon çalışmaları ile son yıllarda turunçgillerde transgenik bitkiler elde edilebilmiştir. Portakal, laym, limon, turunç ve Kleopatra mandarinin

de başarılı bir şekilde transgenik bitkiler elde edilmiştir (Pena ve ark., 2004). Gençlik kısırlığı döneminin kısaltılması amacıyla Cervera ve ark. (2008) tarafından bu metod kullanılmıştır. Transformasyon yöntemi turunçgillerde daha çok hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında kullanılmaktadır. (evik ve ark., 2006; Ananthkrishnan ve ark., 2007; Febres ve ark., 2008; Zaneck ve ark., 2008; Barbosa-Mendes ve ark., 2009). Bu çalışmalarda ümitvar bitkiler elde edilmiş ve sonraki denemelere alınmışlardır. Turunçgillerde transformasyon amacıyla pek çok bitki eksplanti kullanılmış ve en başarılı bulunan eksplant *in vitro* imlendirilen tohumlardan elde edilen epikotil parçaları olarak saptanmıştır (Singh ve Rajam, 2009). Bu çalışmaların yanında turunçgillerde daha başarılı bir transformasyon amacıyla metodun optimizasyonu çalışmaları devam etmektedir (Mendes ve ark., 2008; Dutt ve Grosser, 2009).

3. TAKSONOMİ

Turunçgillerde en yaygın olarak kullanılan iki taksonomik sistem tarafından ağaçların bazı morfolojik ve çok az sayıda kimyasal özellikleri kullanarak tür sayısının 16 (Swingle ve Reece, 1967) veya 162 (Tanaka, 1977) olduğu kabul edilmesine rağmen, Barret ve Rhodes (1976) sayısal taksonomi metoduyla 48 turunçgil türü ve akrabasıyla yaptıkları çalışma sonucu turunçgillerde gerçek tür sayısının sadece 3 olduğunu, diğer turungillerinde bu 3 türün ikili veya cl melezlemesi sonucunda oluşmuş olabileceğini ortaya atmıştır. Gerçekten de moleküler (Federici ve ark., 1998; Gülşen ve Roose, 2001a, Seker, 1999; Nicolosi ve ark., 2000, Barkley ve ark., 2006; Pang ve ark., 2007; Uzun ve ark., 2009) ve biyokimyasal markırlar (Fang ve ark., 1993; Herrero ve ark., 1996) kullanılarak yapılan çalışmalarda bu tez desteklenmiştir. Limon, portakal ve altıntop gibi kültürü yapılan pek çok turunçgil türünün gerçek tür olarak önerilen şadok (*Citrus maxima*), mandarin (*C. reticulata*) ve ağaç kavunu (*C. medica*) ile üç yapraklı (*Poncirus spp.*), kamkat (*Fortunella spp.*) ve bazı yakın cinslerden doğal hibridizasyonlar veya bazı hibritlerden nusellar embriyoni yoluyla ortaya çıkan bazı küçük fenotipik farklılıklarla oluştuğu tespit edilmiştir.

Gülşen ve Roose (2001a) nükleer markırlar olan ISSR (inter-simple sequence repeats), SSR (simple sequence repeats) ve izoenzimleri kullanarak çoğu ticari açıdan önemli 58 adet limon, 25 mandarin, portakal, tatlı limon, şadok, ağaç kavunu ve üç akraba cins arasındaki çeşitlilik ve bunların birbirleriyle ilişkisini saptamıştır. Çalışılan limonların 2/3' arasında çok düşük oranda varyasyon bulunurken, 5 kaba limon (*C. jambhiri*) arasında da yüksek düzeyde benzerlik bulunmuştur. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) oğu İtalyan orijinli *in vivo* ve *in vitro* ortaya çıkarılan 15 tip limonda genetik çeşitliliği ortaya çıkarmak amacıyla çalışılmıştır (Deng ve ark.,

1995). Otuzaltı adet 10-baz primerlerle yapılan PCR (polymerase chain reaction) sonucu 22 primerin polimorfik bantlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Genel olarak varyasyon çok düşük bulunmuştur. Benzer sonuçlar, çalışılan 6 ticari limon eşitdi arasında da tespit edilmiştir (Fang ve Roose, 1997).

Spesifik markır olan RFLP (restriction fragment length polymorphism) markırlar cDNA problemleriyle turunçgil ve yakın akraba cinsler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla çalışılmıştır (Liou ve ark., 1996). Bu araştırmada genel olarak laym, limon ve kaba limonlar ağaç kavunlarıyla aynı gurupta yer alırken mandarin ve şadokların bu gruptan çok farklı oldukları tespit edilmiştir. Bu alışmalar aynı zamanda polimorfizm veren prob kaynakları konusunda da turunçgil araştırmacılarına imkanlar hazırlamıştır.

Ana ve babadan geçen karakterlerin aksine, sadece ya anadan ya da babadan geçen karakterlerle (uniparental) yapılan çalışmalar çok daha farklı sonuçlar ortaya koymuştur (Green ve ark., 1986; Yamamoto ve ark., 1993; Gülşen ve Roose, 2001b; Cheng ve ark., 2005). Ana-baba tarafından kalıtılan karakterlerle mitokondri ve kloroplast gibi genellikle sadece anadan geçen karakterlerin taksonomi çalışmalarında kombinasyon halinde kullanımı muhtemel hibrit orijinli türlerin ortaya çıkarılabilmesi için daha etkili bir metod olmaktadır. Kloroplast SSR çalışmalarında elde edilen sonuçlarda, nükleer DNA çalışmalarında birbirlerinden ayırt edilebilen portakal, altıntop ve şadok tamamen aynı kloroplast yapısına sahip bulunmuş olup bu durum portakal ve altıntopun hibrit orijinli ve ebeveynlerinden birinin şadok olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada mandarinler aynı kloroplast yapısına sahip bulunmuşlardır (Cheng ve ark., 2005). Bu organellere ait DNA'lar iki yolla çalışılabilir. İlk metod ile toplam DNA (total) 'niversal' yani fotosentez yapan bütün bitkilerde çalışan primerlerle PCR ve ardından, güçlendirilen DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesinden sonra elektroforezle polimorfizm tespit edilir (Cipriani ve ark., 1998). İkinci metod ile daha önce enzimle kesilerek elektroforezle boylarına göre ayrılmış DNA'ların spesifik radyoaktif problemlerle hibridizasyonu ile polimorfizm tespit edilmektedir (Yamamoto ve ark., 1993). İki metodu karşılaştıracak olursak, birinci metod çok az miktarda DNA gerektirirken ikincisi çok büyük DNA'yı gerektirir ki bu önemli bir olumsuz özelliktir.

Özellikle orijini kesin olarak bilinmeyen hibrid genotiplerde ebeveynlerin belirlenmesi amacıyla ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleri için geliştirilen markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metod kullanılarak doğal bir hibrid olan Huyou (*C. changshanensis*) için ebeveynler turunç ve şadok olarak belirlenmiştir (Xu ve ark., 2006b).

4. GEN KAYNAKLARININ KORUNMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Monokültür sonucunda önemli gen kaynakları zamanla kaybedilmekte ıslah açısından önemli olan karakterlerin kolayca kültürü yapılan çeşitlere aktarılmasında sorunlar çıkabilmektedir. Bu nedenle hastalık ve çevresel stres nedeniyle oluşabilecek olumsuz koşullara dayanıklı bitkiler elde edebilmek için gerekli ebeveynler korunmalıdır. Bu amaçla çok çeşitli bitki dokuları ve metodlar geliştirilmiştir. Dondurarak koruma ki genellikle tohumlar bu yolla muhafaza edilir (Normah ve ark., 1997) bitkiciklerin *in vitro* muhafazası (Quan ve ark., 1996) ve *in vitro* kallus kültürlerinin dondurularak muhafazası (Chen-Zhen ve ark., 1995; Deka ve Thakur, 1996; Perez ve ark., 1997) en yaygın kullanılan metodlardır. Bunların yanında embriyo olarak ultra soğuk koşullarda (cryopreservation) saklama yöntemi de başarılı olarak uygulanmıştır (Malik ve Chaudhury, 2006). Gerek kallus kültüründe gerekse de doku kültürü kullanılarak yapılan çalışmalarda en önemli sorun muhafazaya alınan bitkilerde oluşan varyasyondur.

C. aurantifolia, *C. halimi* ve *C. hytrix* tohumlarının su içerikleri %12'lere düşürülerek dondurularak muhafaza edilebilmişlerdir. Ancak, su içerikleri ile dondurulduktan sonra yaşayabilen bitki sayısı turunçgil genotipleri arasında farklılık gösterebilmektedir (Normah ve ark., 1997). *C. hytrix* tohumlarında kurutmaya karşı aşırı hassasiyet gözlenmiş ve azalan su oranıyla birlikte azalan sayıda canlı bitki elde edilmiştir. Portakalın embriyogenik kallusları dondurularak muhafaza edilebilmiştir. Dondurarak muhafaza yönteminde ön soğutma ve zeatin gibi bazı kimyasal maddelerle ön muamele işleminin bazı Kore turunçgil tiplerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Oh, 1997). Varyasyon koruma altına alındıkça yeni varyasyonlar oluşmaya devam etmekte, sonuç olarak koleksiyon bahçelerinde artan maliyetlere neden olmaktadır. Bunu engellemek için çekirdek koleksiyon üzerinde durulması gelecekte kaçınılmaz olacaktır. Uzakdoğu ve Latin Amerika'nın değişik turunçgil bölgelerinden getirilmiş 300 civarında turunçgil tipinin ISSR markırlarıyla incelenmesi sonucunda gerçekte ancak 1/3'nün farklı genetik yapılar da olduğu tespit edilebilmiş, dolayısıyla koleksiyonda muhafaza edilmesi gerekli tip sayısı 1/3'e düşürülmüş, bu yolla önemli oranda tasarruf sağlanabilmiştir (Kruger ve ark., 2000). Çekirdek koleksiyonlarda mümkün olduğunca az sayıda bitki korunurken bütün farklı genlerin korunması hedeflenir. Ancak gen bankası oluşturulması için her bitkinin detaylı gen haritalarının ve DNA dizinlerinin ortaya çıkarılması gereklidir. Bu da büyük mali harcamaları gerektirir. Bu nedenle şimdilik bu kavramın yakın gelecekte gerçekleşmesi mümkün görülmemektedir.

5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Klasik metodların eksik yönlerini tamamlama, süreci hızlandırma ve yeni teknolojilerin ortaya konulması adına tarımsal çalışmalarda yaygın olarak

kullanılan biyoteknolojik yöntemler araştırmacılara önemli fırsatlar sunmaktadır. Turunçgiller alanında, materyallerin çoğaltılması, yeni çeşitlerin ıslah edilmesi, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklılığı sağlamak ve genetik kaynakların muhafazası ve değerlendirilmesi konularında geniş bir şekilde kullanılan bu teknolojiler istenen sonuçlara ulaşma noktasında bundan sonra da araştırmacıların başvuracakları başlıca yöntemlerden biri olmayı sürdürecektir. Şimdiye kadar bu alanda sonuçlar alınmamış olmasına rağmen önemli oranda bilgi birikimi sağlanmıştır. Ekonomik açıdan önemli limon, mandarin, portakal ve altıntop gibi turunçgil gruplarının genetik orijinleri tespit edilmiş olup bu bilgilerden günümüzde ıslah programlarında yararlanılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, M., Khan, M.M., Mughal, S.M., Jaskani, M.J., Abbas, H., 2006. Propagation of ctv-free sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] plants through microbudding technique. Pak. J. Bot., 38: 583-587.
- Ali, S., Mirza, B., 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. Acta Bot. Croat., 65:137-146.
- Almeida, W.A.B., Filho, F.A.A.M., Mendes, B.M.J., Rodriguez, A.P.M., 2002. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. Sci. Agric., 59:35-40.
- Ananthkrishnan, G., Orbovic, V., Pasquali, G., Calovic, M., Grosser, J.W., Newton, R.J., 2007. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through Agrobacterium-mediated genetic transformation. *In vitro* Cell & Dev. Biology-Plant, 43:593-601.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor. Appl. Genet., 112: 1519-1531.
- Barbosa-Mendes, Jm., Filho, F.A.A.M., Filho, A.B., Harakava, R., Beer, S.V., Mendes, B.M.J., 2009. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. Sci. Hort., 122:109-115.
- Barlass, M., Skene, G.M., 1986. *Citrus* (*Citrus* species). P. 207-219. In: Y.P.S. Bajaj (eds.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 1: trees I. Springer.Berlin.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. Sys. Bot. 1:105-136.
- Baruah, A., Nagaraju, V., Parthasaraty, V.A., 1996. Micropropagation of three endangered *Citrus* species. 1. Shoot proliferation *in vitro*. Annals Plant Physiology 10:124-128.
- Ben-Hayyim, G., Goffer, Y., 1989. Plantlet regeneration from a NaCl-selected salt-tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). Plant Cell. Rep., 7: 680-683.
- Canel, C., Bailey-Serres, J.N., Roose, M.L., 1996. Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of an acidless pummelo (*Citrus maxima*). Plant Molecular Biology, 31: 143-147.

- Cepeda-Nieto, A.C., Barera-Saldana, H.A., 1997. Cloning and sequencing of the coat protein gene of a new isolate of citrus tristeza virus from Mexico. *Plant Disease* 81: 693.
- Cervera, M., Juárez, J., Navarro, L., Pena, L., 2008. Genetic transformation of mature *Citrus* plants. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 286: 177-187.
- Chaturvedi, H.C., Mitra, G.C., 1975. A shift in morphogenetic pattern in *Citrus* callus tissue during prolonged culture. *Ann. Bot.*, 39: 683-687.
- Chen-Zhen, G., Jia, F.W., Chen, Z., Wang, J.F., 1995. Study on storage of *Citrus* germplasm in vitro (brief report). *J. Fujian Agricultural Univ.*, 24: 376.
- Cheng, Y., De Vicente, M.C., Meng, H., Guo, W., Tao, N., Deng, X.X., 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiology*, 25: 661-672.
- Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N., Germana, M.A., 2006. Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *J. Plant Biotech.*, 87:145-153.
- Cipriani, G., Testolin, R., Gardner, R., 1998. Restriction-site variation of PCR-amplified chloroplast DNA regions and its implication for the evolution and taxonomy of *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 389-396.
- Coelho, S., Da, A.F., De, D.L., Siqueira-Bruckner, C.L., De Oliveira, A.B., Cardoso, A.A., Da Silva-Coelho, A.F., De Siqueira, D.L., De Oliveira, A.B., 1998. Plant regeneration from ovule culture of *Citrus reticulata* cv. Dancy. 33: 29-35.
- Çevik, B., Lee, R.F., Niblett, C.L., 2006. Genetic Transformation of Citrus paradisi with Antisense and Untranslatable RNA-dependent RNA Polymerase Genes of Citrus tristeza closterovirus. *Turk. J. Agric. For.*, 30: 173-182.
- Deka, P.C., Thakur, A.C., 1996. Tissue culture techniques for improvement and conservation of genetic resources. *Proc Seminar Problems and Prospects Agric Res Development in North-East India, Assam Agricultural University, Jorhat, India* pp 27-28.
- Deng, Z.N., Gentile, A., Nicolosi, E., Vardi, A., Tribulato, E., 1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. *J. Hort. Sci.*, 7: 117-125.
- Deng, Z.N., Shu, H., Shun, Y.X., Gmitter, F.G., Deng, Z.N., Shu, H., Xiao, S.Y., 1997. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome* 40: 697-704.
- D'Onghia, A.M., Carimi, F., De Pasquale, F., Djelouah, K., Martelli, G.P., 2001. Elimination of Citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. *Plant Pathol.*, 50: 266-269.
- Dutt, M., Grosser, J.W., 2009. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98: 331-340.
- Fang, D.Q., Zhang, W.C., Xiao, S.Y., 1993. Studies on taxonomy and evolution of *Citrus* and its related genera by isozyme analysis (in Chinese with English abstract). *Acta Phytotaxon Sin* 31: 329-352.
- Fang, D.Q., Federici, C.T., Roose, M.L., 1997. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in *Citrus*. *Genome*, 40: 841-849.
- FAO. 2008. Food and Agricultural Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org>
- Febres, V.J., Lee, R.F., Moore, G.A., 2008. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. *Genetic Transformation and Hybridization*, 27:93-104.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. App. Genet.*, 96: 812-822.
- Garcia, A., Asins, A.J., Forner, J., Carbonell, E.A., 1999. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 511-518.
- Gauss, C., Kalkum, M., Löwe, M., Lehrach, H., Klose, J., 1999. Analysis of the mouse proteome (I) Brain proteins: Separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis*, 20: 575-600.
- Gmitter, F.G., Ling, X.B., Deng, X.X., 1990. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 785-790.
- Grewal, H.S., Dhatt, A.S., Gosal, S.S., 1994. In vitro shoot-tip grafting in Citrus. *Annals Biology Ludhiana*, 10: 1-6.
- Green, R.M., Vardi, A., Galun, E., 1986. The plastome of *Citrus*, physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 170-177.
- Grosser, J.W., Gmitter Jr., F.G., 1990. Protoplast fusion and citrus improvement, *Plant Breed. Rev.*, 8:339-374.
- Grosser, J.W., Mourao, F.A.A., Gmitter, F.G., Louzada, E.S., Jiang, J., Baergen, K., Quiros, A., Cabasson, C., Schell, J.L., Chandler, J.L., 1996. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 577-582.
- Grosser, J.W., Chandler, J.L., Duncan, L.W., 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Sci. Hort.*, 113: 33-36.
- Guerra, M.S., 1984. Cytogenetics of *Rutaceae*, II: nuclear DNA content. *Caryologia*, 37: 219-226.
- Gülşen, O., Roose, M.L., 2001a. Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126: 309-317.
- Gülşen, O., Roose, M.L., 2001b. Chloroplast and Nuclear Genome Analysis of the Parentage of Lemons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126:210-215.
- Gülşen, O., Uzun, A., Canan, I., Seday, U., Canihos, E., 2010. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica* 173: 265-277.
- Gutierrez, E.M.A., Luth, D., Moore, G.A., 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell. Reports*, 16: 745-753.
- Gygi, S.P., Rist, B., Aebersold, R., 2000. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis, *Curr Opin Biotechnol.*, 11: 396- 401.
- Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E.A., Navarro, L., 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 599-609.
- Hidaka, T., Omaru, M., Ugaki, M., Tomiyama, M., Kato, A., Oshima, M., Motoyoshi, F., 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. From suspension cells. *Jpn. Breed.*, 40: 199-207.

- Huang, L.C., Chen, W.L., Chiu, D.S., 1988. In vitro graft-enhanced nucellar plant development in the monoembryogenic *Citrus grandis* L. J. Hort. Science, 63: 705-709.
- Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E., 1997. In vitro haploid production in higher plants. Volume 5: oil, ornamental and miscellaneous plants. Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds.) Curr. Plant Science Technology in Agric., 29:256.
- Jarrell, D.C., Roose, M.L., Traugh, S.N., Kupper, R.S., 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. Theor. Appl. Genet., 84: 49-56.
- Kaneyoshi, J., Kanou, T., Kuwata, Y., Hirao, A., Nakatani, S., Kobayashi, S., 1994. Breeding of triploid citrus cultivars I. Production of triploids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) X tetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) crosses. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 66: 9-14.
- Kaneyoshi, J., Kanou, T., Kuwata, Y., Hirao, A., Nakatani, S., Kobayashi, S., 1997. Breeding of triploid citrus cultivars I. Production of triploids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) X tetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) crosses. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 66: 9-14.
- Kayim, M., Koc, N.K., Tor, M., 1994. Gene transfer into citrus (*Citrus limon* L.) nucellar cells by particle bombardment and expression of GUS activity. Turkish J. Agric. Forestry, 20: 349-352.
- Kayim, M., Koc, N.K., 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. Sci. Hort., 109: 29-34.
- Kepiro, J.L., Roose, M.L., 2010. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. Tree Genetics and Genomes, 6:1-11.
- Kobayashi, S., Uchimiya, H., 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. Jpn. J. Genet., 64: 91-97.
- Komatsu, A., Takanokura, Y., Omura, M., Akihama, T., 1996. Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). Mol. Gen. Genet. 252: 346-351.
- Krueger, R., Gülşen, O., Roose, M.L. (Abs). 2000. Use of Molecular Markers in Management of Citrus Germplasm Resources. 9. Int. Soc. Citriculture Meeting, Orlando, USA.
- Liou, P.C., Gmitter, F.G., Moore, G.A., 1996. Characterization of the *Citrus* genome through analysis of restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet., 92: 425-435.
- Malik, S.K., Chaudhury, R., 2006. The cryopreservation of embryonic axes of two wild and endangered *Citrus* species. Plant Genetic Resources, 4: 204-209.
- Mendes, A.F.S., Cidade, L.C., Manzoli, G.N., Otoni, W.C., Filho, W.S.S., Costa, M.G.C., 2008. Tissue culture parameters in sweet orange cultivars. Pesq. Agropec. Bras., 43:1093-1096.
- Moriguchi, T., Hidaka, T., Omura, M., Motomura, T., Akihama, T., 1996. Genotype and parental combination influence efficiency of cybrid induction in *Citrus* by electrofusion. HortScience, 31: 275-278.
- Mourao-Fo, F.A.A., Gmitter, F.G., Grosser, J.W., 1996. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. Fruit Varieties Journal, 50: 76-80.
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Patrizia-Russo, M., Cunsolo, V., Saletti, R., 2009. Reforgiato Recupero, G., Foti, S., Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. J. Proteom., 73: 134-152.
- Nadel, B., Spiegel-Roy, P., 1987. Selection of *Citrus limon* cell culture variants resistant to the Mal secco toxin. Plant Sci. 53: 177-182.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., Tribulata, E., 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor. Appl. Genet., 100: 1155-1166.
- Normah, M.N., Siti Dewi Serimala, M.N., Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J. (eds.), Hong, T.D., 1997. Cryopreservation of seeds and embryonic axes of several *Citrus* species. Basic and applied aspects of seed biology. Proc Fifth International Workshop on Seeds, UK, pp 817-823.
- Oh, S., 1997. The effect of prefreezing treatment and cryoprotectants on the survival of cryopreserved somatic embryos and plant regeneration in Korean native citrus species. Altman, A., Ziv, M., (eds.). 3th Int. Symp. on *In vitro* Culture and Hort. Breed., Jerusalem, Israel. Acta Horticulturae, 447: 499-505.
- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimiya, H., Ishii, S., 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor. Appl. Genet., 71: 1-4.
- Oliveira, R.P., Mendes, B.M.J., Tulmann Neto, A., De-Oliveira, R.P., 1994. Cell suspension culture of two citrus rootstocks. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 6: 141-144.
- Pan, Z., Guan, R., Zhu, S., Deng, X.X., 2009. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Plant Cell Rep., 28: 281-289.
- Pang, X.M., Hu, C.G., Deng, X.X., 2007. Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. Genet. Res. Crop Evol., 54: 429-436.
- Parthasarathy, V.A., Nagaraju, V., Rahman, S.A.S., 1997. In vitro grafting of *Citrus reticulata* Blanco. Folia-Horticulturae, 2: 87-90.
- Pavan, A., Calixto, C., Cardoso, S.C., Mendes, B.M.J., Filho, A.B., Lopes, J.R.S., Carvalho, C.R., Filho, F.A.A.M., 2007. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. Sci. Hort., 113: 278-285.
- Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Navarro, L., 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantiifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Rep., 16: 731-737.
- Pena, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Perez, R., Romero, J., Juarez, J., Pina, J.A., Navarro, L., 2004. Agrobacterium mediated transformation of Citrus. Transgenic crops of the world: essential protocols (eds: Curtis, I.S.). Kluwer Academic Publisher. pp: 454.
- Perez-Molphe-Balch, E., Ochoa-Alejo, N., 1997. In vitro plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. HortScience, 32: 931-934.
- Perez, R.M., Navarro, L., Duran-Vila, N., 1997. Cryopreservation and storage of embryonic callus

- cultures of several *Citrus* species and cultivars. Plant Cell Reports, 17: 44-49.
- Quan, Y., Zhu, S.C., Tian, C.G., Jin, R.R., Shan, C.C., Quan, Y., Chen, Z.S., Guo, T.C., Zhang, J.R., Chen, S.C., 1996. *Citrus* germplasm preservation in vitro. South China Fruits, 25: 3-5.
- Roose, M.L., 1993. Genetic Mapping in Citrus. Proc. of Int. Mandarin Festival. Azuma-cho. Kagoshima 899-14, Japan. October 29-31.
- Roose, M.L., 2007., Mapping and marker assisted selection in Citrus. In: Khan IA (ed) Citrus genetics, breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK, pp 275–286
- Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A.A., Hallan, V., Nagpal, A., Virk, G.S., 2007. In vitro production of *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) free kinnow plants employing phytotherapy coupled with shoot tip grafting. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant., 43: 254–259.
- Singh. S., Rajam, M.V., 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. Physiol. Mol. Biol. Plants, 15: 3-22.
- şeker, M., 1999. Aurantioideae altfamilyasındaki önemli turunçgil genotiplerinin tanılanmasında genom büyüklükleri ve izoenzim analizlerinden yararlanma olanakları. ukurova Üniv. Fen. Bil. Ens. Adana.
- Shi, J.X., Chen, S., Gollop, N., Goren, R., Goldschmidt, E.E., Porat, R., 2008. Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. Plant Science, 175: 478–486.
- Sim, G.E., Goh, C.J., Loh, C.S., 1989. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco: multiple bud formation of from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. Plant Sci., 69: 203-210.
- Spiegel-Roy, P., Ben-Hayyim, G., 1985. Selection and breeding for salinity tolerance in vitro. Plant Soil, 89: 243-252.
- Stam, P., 1993. Constraction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. Plant Journal, 3: 739-744.
- Swingle, W.T., Reece, P.C., 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor DL (eds). The Citrus Industry, vol. 1. University of California, Berkeley, pp.190-430.
- Tanaka, T., 1977. Fundamental Discussion of *Citrus* Classification. Stud. Citrol., 14: 1-6
- Tapati, D., Mitra, G.C., Chatterjee, A., Das, T., 1995. Micropropagation of *Citrus sinensis* var. mosambi - an important scion. Phytomorphology, 45: 57-64.
- Uzun, A., Yesiloğlu, T., Aka-Kacar, Y., Tuzcu, O., Gülşen, O., 2009. Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). Scien. Hortic., 121: 306-312.
- Xu, X.Y., Liu, J.H., Deng, X.X., 2006a. Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplast–protoplast fusion. Genetic Transformation and Hybridization, 25: 533-539.
- Xu, C.J., Bao, L., Zhang, B., Bei, Z.M., Ye, X.Y., Zhang, S.L., Chen, K.S., 2006b. Parentage analysis of huyou (*Citrus changshanensis*) based on internal transcribed spacer sequences. Plant Bred., 125: 519-522.
- Vardi, A., Epstein, E., Breiman, A., 1986. Is the Phytophthora citrophthora culture filtrate a reliable tool for the in vitro selection of resistant *Citrus* variants. Theor. Appl. Genet., 72: 596-574.
- Vardi, A., Gallun, E., 1988. recent advances in protoplast culture in horticultural crops-citrus. Scientia Horticulturæ 37: 217-230.
- Vardi, A., Bleichman, S., Aviv, D., 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Sci., 69: 199-206.
- Wu, X.B., Wang, J., Liu, J.H., Deng, X.X., 2008. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. J. Plant Phys., 166: 52-62.
- Yamamoto, M., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Yamada, Y., 1993. Phylogenic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In: Hayashi T, Omura M, Scott NS (eds). Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan, pp.39-46.
- Yang, Z.N., Ingelbrecht, I.L., Louzada, E., Skaria, M., Mirkov, T.E., 2000. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). Plant Cell Reports, 19:1203–1211.
- Yao, J., Jin, H.W., Gleave, A.P., Morris, B.A.M., Yao, J.L., Wu, L.U., 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. Plant Science Limerick, 113: 175-183.
- Zanek, M.C., Reyes, C.A., Cervera, M., Pena, E.J., Velázquez, K., Costa, N., Plata, M.I., Grau, O., Pena, L., García, M.L., 2008. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. Plant Cell Reports, 27: 57-66.
- Zarei, A., Rahimian, H., 1997. Elimination of citrus tristeza virus from two cultivars of satsuma mandarin through shoot-tip grafting. Iranian J. Plant Pathology., 33: 84-89.