

# Protoplast Fuzyonu (Somatik Hibridizasyon) ile Limonda Uçkurutan Hastalığına (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) Dayanıklı Bitkiler Elde Etme Olanaklarının Araştırılması\*

Namık Kemal KOÇ, Mukadder KAYIM, Ahmet ÇINAR  
Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana-TÜRKİYE

Mustafa KÜSEK  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kahramanmaraş-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 28.01.1997

**Özet:** Kütdiken limon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) çeşidi hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlarla Zagara Bianca limonu (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) yapraklarından izole edilen protoplastlar %40 Polietilen glikol (PEG; 6000 MW) aracılığı ile fuzyona uğratılmıştır. Protoplast fuzyonu sonucu 0.6 M sakkaroz içeren MT ortamında kültüre alınan fuzyon ürünü protoplastlardan oluşan globüler embriyolardan bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiştir.

Fuzyon ürünü embriyolardan regene edilen 250 bitkiden 150 tanesinde köklenme gerçekleşmiş ve bunlardan 100 tanesinin ebeveyn bitkilere göre morfolojik olarak farklı olduğu gözlenmiştir. Morfolojik farklılık gösteren 100 bitkiden 37 sinden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve 12 örneğin DNA'ları iki primer varlığında Kütdiken ve Zagara Bianca limon çeşitlerine spesifik RAPD markerları ile analizleri yapılmıştır. DNA örneklerinin elektroforezi sonucunda E09 ve P03 primerleri sırasıyla Kütdiken'de 1 ve 2, Zagara Bianca'da 3 ve 4 spesifik bant oluşturduğu gözlenmiştir. 12 örnek arasında sadece bir fuzyon ürünü her iki limon çeşidine ait spesifik bantları oluşturmuştur. Fuzyon ürününün ploidi seviyesi flov sitometrik analizlerle ölçülmüş ve ebeveyn bitkilerin DNA içeriği  $2C=0.74-0.78$  pg iken, fuzyon ürünü somatik hibrit bitkinin DNA içeriği  $2C=1.19-1.22$  pg değeriyle ebeveyn bitkilerin yaklaşık iki katı olarak saptanmıştır.

## Investigations on the Possibility to Obtain Mal Secco (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) Resistant Varieties Via Protoplast Fusion (Somatic Hybridization) in Lemon

**Abstract:** Protoplasts were isolated from cell suspension culture of Kütdiken (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) and from the leaves of Zagara Bianca lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) varieties, and fused by using 40% polyethylen glycol (PEG: 6000 MW). Fusion products were cultured in the basal MT medium containing 0.6 M sucrose and 250 plants were regenerated from globuler embryos derived fusion products.

Out of 250 regenerant plant, 150 plants showed root development out of which 100 plants were observed to have morphological differens from their parent plants. Genomic DNA was isolated for 37 of the 100 morphologically different plants and the DNAs of 12 samples were analysed for Kütdiken and Zagara Bianca specific RAPD markers by using two primers. The electroforesis of DNA samples showed that Kütdiken has 1 and 2, and Zagara Bianca has 3 and 4 specific bands in the case of E09 and P03 primers respectively. Among the twelve samples, only one fusion regenerant produced specific bands for both lemon varieties. Ploidy level of fusion regenerants was measured by flow cytometric analysis, the nuclear DNA contents  $2C=0.74-0.78$  pg of the parents were approximately half of the somatic hybrid plant  $2C=1.19-1.22$  pg.

## Giriş

Ülkemizin önemli ihraç ürünleri arasında yer alan limonun en önemli hastalıklarından birisi de etmeni *Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik. olan Uçkurutan hastalığıdır (1,2,3). Adı geçen hastalığa karşı kullanılan fungusitler,

hastalığın bir iletim demeti hastalığı olması nedeniyle etkin sonuçlar vermediği gibi, çevre kirliliği, fungusitlere dayanıklılık gibi sorunları da birlikte getirmektedir (4,5). Önerilen kültürel mücadele yöntemlerinin turuncgil üreticileri tarafından gerektiği şekilde uygulanamaması hastalıkla mücadeleyi sınırlamakta ve tüm Akdeniz ülkelerinde

\* Bu çalışma TÜBİTAK (Ankara) (TOAG-989/DPT) ve Ç. Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

görülen bu hastalık nedeniyle çok büyük ürün kayıpları ortaya çıkmaktadır (3,5). Bu nedenlerden dolayı hastalığa karşı tolerant veya dayanıklı limon çeşitleri yetiştiriciliğinin yapılması en kesin çözüm yolu olarak görülmektedir. Ancak klasik ıslah yöntemlerinin, turunçgillerin kendine özgü özellikleri (sterilite, uyuşmazlık, nüsellar embriyoni, heterozigoti, vb. gibi) dolayısıyla istenildiği şekilde uygulanamaması nedeni ile soruna çözüm bulmada güçlüklerle karşılaşmaktadır (6,7).

Son yıllarda in vitro bitki doku kültürü tekniklerindeki baş döndürücü gelişmeler, klasik melezlemede karşılaşılan güçlüklerin protoplast fuzyonu ile somatik hibridizasyon yöntemi kullanılarak aşılabileceği potansiyel olarak varsayılmaktadır (8,9).

Günümüzde daha çok Solanaceae (10) ve Cruciferae (11) familyalarına ait kültür bitkilerinde başarılı bir şekilde uygulanan protoplast fuzyonu, turunçgil in vitro doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi ile turunçgilleri de bu konuda çalışılabilecek aday kültür bitkileri arasına sokmuştur (12,13).

Turunçgil ıslahında protoplast kültürleri ile ilgili çalışmalarda son yıllarda önemli aşamalar kaydedilmiş, protoplast fuzyonu ile somatik hibridizasyon, organel transferi ve protoplastlar yardımı ile gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu konuda ilk başarılı intergenerik somatik hibridizasyon Ohgawara ve ark. (14) tarafından seksüel olarak uyumlu "Trovita" (*Citrus sinensis* Osb.) ve Üçyapraklı portakal (*Poncirus trifoliata*) arasında gerçekleştirilmiştir. O zamandan beri protoplast fuzyonu tekniği Rutaceae familyasında hastalıklara, zararlılara ve ekstrem koşullara (düşük sıcaklık, tuzluluk, herbisit v.b.) dayanıklı yeni turunçgil kalem ve anaçlanmn geliştirilmesinde seksüel olarak uyumlu ve uyumsuz türler arasında intensif olarak uygulanmaktadır (15,16).

Ülkemiz ekonomisi açısından önemli bir konuma sahip olan turunçgillerden limonun en önemli hastalıkları arasında yer alan Uçkurutan hastalığına (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) duyarlı fakat yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Kütdiken limon çeşidi (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) ile adı geçen hastalığa tolerant olduğu bildirilen Zagara Bianca limon çeşidi (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) (17) arasında protoplast fuzyonu (somatik hibridizasyon) ile Uçkurutan hastalığına tolerant yeni bireyler elde etmek amacıyla yapılan bu çalışma ile iki limon çeşidi arasında protoplast fuzyonu, protoplasttan bitkiye geçiş süreçleri ve elde edilen bitkilerin genetik analizleri değişik yönleriyle ele alınmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmada bitki materyali olarak Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ve Uçkurutan hastalığına (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) duyarlı olan Kütdiken limon çeşidi (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)'nin ovüler kallusları ile adı geçen hastalığa tolerant olduğu bildirilen Zagara Bianca (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) limon (17) çeşidinin ovüler kalluslarından geliştirilen in vitro bitkilerin genç yaprakları kullanılmıştır.

### Embriyogenik Ovüler Kallusların Elde Edilmesi

Her iki limon çeşitinden de embriyogenik kalluslar bazı değişikliklerle Kochba ve ark. (1972) (18) göre elde edilmiştir. Bazal MT (19) ortamında kültüre alınan ovüllerden oluşan kalluslar ve embriyolar 4. hafta sonunda altkültüre alınırken oluşan embriyoların dip kısımlarında veya diğer tip kalluslarla birlikte ortaya çıkabilen, morfolojik olarak tanınabilen çok az miktarda oluşan embriyogenik kalluslar (parlak, kırılğan ve kolay dağılılabilen) bir pens yardımıyla alınıp 0.5 mg/l 2,4-D içeren katı MT ortamında 2000 lux ışık altında kültüre alınmışlardır. Kalluslar bunu takiben 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l IAA ilave edilmiş katı MT ortamına aktarılmıştır. Dört hafta süre ile bu ortam üzerinde kültüre alınan kalluslar daha sonra sürekli olarak katı MT ortamı üzerinde 2000 lux ışık altında kültüre alınarak muhafaza edilmiştir (18,20).

### Embriyogenik Hücre Süspansiyon Kültürünün Kurulması

Kütdiken limon çeşidinin 15 günde bir katı MT ortamında 3 kez alt kültüre alınmış olan embriyogenik kallusları 100 ml'lik erlenmayerler içerisinde hazırlanmış 30 ml sıvı MT ortamına yaklaşık olarak 2 gr ilave edilmiş ve 120 devir/dakika'da çalışan çalkalayıcılar üzerinde 25-26°C'de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Kültürler 15 günde bir altkültüre alınarak muhafaza edilmiştir. Protoplast izolasyonu hücre kültürlerinin son kültüre alınmalarının 5-8. günleri arasında gerçekleştirilmiştir.

### Embriyogenik Hücre Süspansiyon Kültüründen Protoplast İzolasyonu

Kütdiken limonu hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonu için soğuk sterilize edilmiş, pH'sı 5.7'ye ayarlanmış 10 ml enzim solüsyonu petri kutusu (9 cm) içerisindeki süspansiyon kültürlerinden alınan 1 gr. hücre üzerine ilave edilmiştir. Enzim solüsyonu olarak % 0.3 Selülaz (Onozuko R-10), % 0.2 Maserozim (R-10),

% 0.1 Driselaz, 0.35 M mannitol, 0.35 M sakkaroz, 1/2 MT makro elementleri içeren solüsyon kullanılmıştır (21). Bir gece karanlıkta 35 devir/dakika'da çalışan çalkalayıcı üzerinde 12-14 saat süreyle  $26\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilen hücre enzim karışımı bu süre sonunda 50 ve 30  $\mu\text{m}$  por genişliğine sahip filtrelerden geçirildikten sonra santrifüj tüplerine aktarılmış ve MT bazal + 0.3 M sakkaroz + 0.3 M mannitol içeren yıkama solüsyonu ile 500 rpm'de 5 dakika olacak şekilde 3 kez santrifüj edilerek yıkanmak suretiyle enzimlerden arındırılmıştır. Canlılıkları FDA testi ile saptanan (22), izolasyonu gerçekleştirilmiş ve yoğunluğu 0.6 M sakkaroz içeren sıvı MT ortamında  $1.5\times 10^5$  protoplast/ml'ye ayarlanarak fuzyona hazır hale getirilmiştir.

#### Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu

Yapraktan protoplast izolasyonunda Zagara Bianca limon çeşidi embriyogenik kalluslarından somatik embriyogenesis ile elde edilmiş in vitro bitkilerin henüz gelişmesini tamamlamış yaprakları petri kutusu içerisinde ince şeritler halinde kesildikten sonra 1/2 MS (23) makro + 0.7 M mannitol+ 1mM morfolin etan sulfonik asit (MES) içeren solüsyonda (pH: 5.7) bir saat süre ile plazmoliz edilmiştir. Bir saatlik süre sonunda plazmoliz çözeltisi alınıp yerine %3 Selülaz (R-10)+ %0.3 Maserozim (R-10) + 1/2 MS makro elementleri + 0.7 M mannitol içeren enzim solüsyonu (1 gr yaprak/30 ml enzim solüsyonu) ilave edilip karışım 35 rpm'de çalışan bir çalkalayıcı üzerinde 12-14 saat süre ile  $26^\circ\text{C}$ 'de karanlıkta gece boyunca inkübe edilmiştir. Enzim protoplast karışımı 50  $\mu\text{m}$  por genişliğine sahip filtrelerden geçirildikten sonra iki kez 0.6 M mannitol solüsyonu ile 600 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu şekilde kültüre hazır duruma getirilmiş olan protoplast solüsyonunun yoğunluğu 0.6 M sakkaroz içeren sıvı MT ortamında  $2\times 10^5$  protoplast/ml'ye ayarlanarak fuzyon için hazır hale getirilmiştir.

#### Polietilen Glikol (PEG) Aracılığı ile Protoplast Fuzyonu ile Somatik Hibridizasyonu

Protoplast fuzyonu bazı değişikliklerle Ohgawara ve ark. (14)'na göre yapılmıştır. Buna göre Kütdiken limonu hücre süspansiyon kültürlerinden ve Zagara Bianca nüsel bitki yapraklarından izole edilip yoğunlukları ayarlanmış protoplast süspansiyonu 1:1 oranında tüpler içerisinde karıştırılmıştır. Fuzyon ajanı olarak kullanılan Polietilen glikol (PEG, 6000 MW) %40 konsantrasyonunda taze olarak hazırlanıp soğuk sterilize edildikten sonra protoplast karışımına ilave edilmiş ve tüp iki el arasında yavaş yavaş iyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika süreyle karı-

şım bekletilmiştir. PEG'i uzaklaştırmak için tüplere 0.6 M mannitol + 50 mM  $\text{CaCl}_2$  solüsyonu ilave edilip 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan PEG bir pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bunu takiben 900 rpm'de 5 dakika 0.6 M sakkaroz + MT ortamı ile yıkanan protoplast solüsyonu, iki kez de 0.6 M mannitol ile yıkanarak işlem tamamlanmıştır. Kültüre alma aşamasına gelen protoplastlardan alınan örneklerde FDA ile canlılık testi yapıldıktan sonra yoğunluğu  $1.5\times 10^5$  pro./ml'ye ayarlanmış ve fuzyon ürünlerini selekte edici 0.6 M sakkaroz + %0.6 agaroz (Seaplaque) içeren MT ortamında kültüre alınmışlardır. Yaklaşık 6 hafta sonra kültürde oluşan embriyolar 0.1 M galaktoz, 0.1 M sorbitol ve 0.35 mg/l  $\text{GA}_3$  içeren katı MT ortamına aktarılarak kotiledon yaprakları geliştirilmiştir (24). Kotiledon embriyolar 0.05 mg/l NAA ve %3 sakkaroz içeren katı MT ortamına aktararak yaklaşık iki ay içerisinde köklü sürgün gelişimi sağlanmıştır. Daha sonra bitkicikler %3 sakkaroz içeren büyük cam deney tüpleri içerisinde önceden hazırlanmış olan sıvı MT ortamında kültüre alınarak gelişmeleri hızlandırılmıştır. Bu aşamadan sonra bitkiler potasyum sülfat, amonyum sülfat ve triple süper fosfat ilave edilmiş torf:toprak:kum (1:1:1/4) karışımı içeren saksılara şaşırtılarak  $25-26^\circ\text{C}$ 'deki klima odalarında tutulmuştur.

#### Hibritlerin Belirlenmesi ve DNA Analizlerinin Yapılması

Materyal ve metotda belirtildiği şekilde elde edilen bitkilerde görülen morfolojik özelliklere göre ebeveyn bitkilerden farklılık gösterenler seçilerek bunlardan DNA izolasyonu yapılmış ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile tesadüfi olarak çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) bantları agaroz jel elektroforezi ile elde edilmiş ve bu bantların ayırt edici özelliklerine göre somatik hibrit bitkiler saptanmıştır. Daha sonra ebeveyn bitkilerle fuzyon ürünü ve somatik hibrit bitkilerin nükleer DNA içeriği flov sitometri ile ölçülerek ploidi seviyeleri saptanmıştır.

#### Genomik DNA İzolasyonu

Ebeveyn bitkilerin nüsel hücre ve yaprakları ile fuzyon ürünü bitkilerin yapraklarından izole edilen genomik DNA'lar somatik hibrit bitkileri belirlemek amacıyla RAPD için kullanılmıştır. DNA izolasyonu bazı modifikasyonlarla Power ve ark. (25)'na göre gerçekleştirilmiştir.

DNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri, sulandırma faktörü ve 50 sabit katsayısı ile çarpılarak 1 ml hacimde mg düzeyinde DNA miktarı hesaplanmıştır.

## Tesadüfi Olarak Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizi

Kütdiken kallus ve Zagara Bianca nusellar bitki DNA örnekleri önce spesifik DNA bantları oluşturabilecek primerleri saptamak amacıyla 10 farklı primer (C09, C15, C20, D01, E09, E20, O03, P03, R08, S04) (Operon Technologies, USA) (Tablo 1). Bu primerlerden 7 tanesi (C15, C20, E09, O03, P03, R08, S04) hem Kütdiken hem de Zagara Bianca limonu için spesifik bant oluşturmuştur. Bunlardan E09 ve P03 fuzyon ürünlerinin RAPD analizi için seçilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Rokka ve ark. (26)'na göre gerçekleştirilmiş olup, her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde 25-50 ng genomik DNA 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP karışımı 400 nM 10 bazlık tek kollu primerler (E09, P03), 0.75 birim Taq polimeraz (Boehringer Mannheim) ve 2.5 µl 10XPCR bafırından 750 ml'lik eppendorf tüplere konmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu PCR aletinde (M1 Research PTC-100) 30 döngüde gerçekleştirilmiştir. İlk denaturasyon işlemi 95°C'de 3 dakika yapıldıktan sonra her bir döngü için önce 95°C'de 30 san., 35°C'de 30 san. ve 72°C'de 1 dak. 10 san. olacak şekilde reaksiyon yürütülmüş, son basamakta 72°C'de 6 dakika sentez işlemiyle döngü tamamlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri %1.2'lik etidyum bromitli (IXTBE bafır) agaroz (Sea KeM, FMC, Bio Products, USA) jelde moleküler ağırlık markırları olan 100 baz çiftlik (bp) DNA markırı (Gibco BRL) kullanılarak 15-18°C'de 45 voltta 14-17 saat süre ile elektroforezi yapılarak, 260 nm dalga boyunda bir UV transillimünatör üzerinde bantlar tespit edilmiş ve 665 ile 667 nolu flimlerle poloroid fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 1. RAPD analizi ile fuzyon ürünlerinin testlenmesinde kullanılan primerlerin DNA baz dizileri.

C09	5' CTCACCGTCC 3'	C15	5' GACGGATCAG 3'
C20	5' ACTTCGCCAC 3'	D01	5' ACCGCGAAGG 3'
E09	5' CTTCACCCGA 3'	E20	5' AACGGTGACC 3'
O03	5' CTGTTGCTAC 3'	S04	5' CACCCCTTG 3'
R08	5' CCCGTTGCCT 3'	P03	5' CTGATACGCC 3'

### Flov Sitometri Analizleri

Kütdiken limonu kallusu, Zagara Bianca limonunun in vitro nusellar bitkileri, fuzyon ürünleri ve kontrol olarak *tetraploid Fortunella hindisii* Swing ile somatik hibrid bitkinin in vitro taze yapraklarının propidium iyodid (Calbiochem) ile boyanmış çekirdeklerinin nüklear DNA içeriği

(2C) flov sitometri (FAC Sort, Becton Dickinson, USA) ile ölçülmüştür. Her örnek (üç tekrarlı) için 50 mg taze yaprak veya kallus kullanılmıştır. Analiz için Arumuganathan ve Earle'ün (27,28) metodu izlenmiş olup nüklear DNA içerikleri bitki hücre nükleusları ve tavuk alyuvar hücrelerine ait grafiklerdeki pik noktalarının birbirine oranının tavuk alyuvar hücrelerinin standart 2C değeri olan 2,33 pg ile çarpılmasıyla elde edilmiştir (27). Nükleus floresanı 488 nm dalga boyunda bir argon-iyon lazer ile ölçülmüş ve her bir örnek için 765-2700 nükleus analiz edilmiştir.

## Sonuçlar

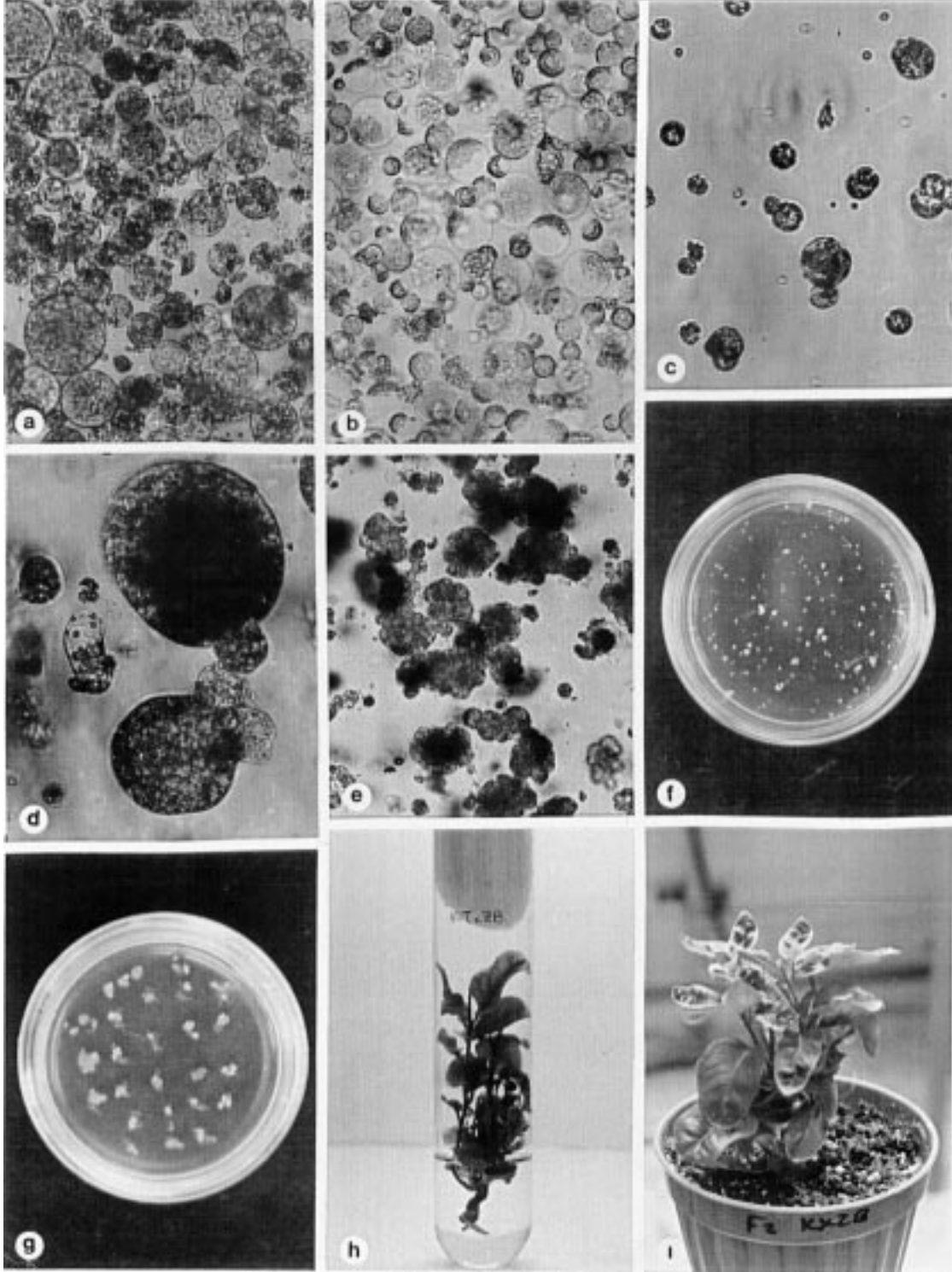
### Protoplast Fuzyonu ve Bitki Regenerasyonu

Kütdiken limonu embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlarla (Şekil 1a) Zagara Bianca limonunun nusellar bitki yapraklarından izole edilen protoplastlar (Şekil 1b) PEG (%40) ile fuzyona tabi tutulmuş (Şekil 1c) ve 0.6 M sakkaroz içeren MT ortamında kültüre alınmadan önce FDA ile yapılan canlılık testinde protoplastların %60-70 arasında canlı oldukları saptanmıştır. Protoplastlar kültüre alınmalarından yaklaşık 10 gün sonra bölünmeye başlamışlardır (Şekil 1d). Bunlardan Kütdiken limon çeşidi protoplastları 0.6 M sakkaroz + MT ortamında bölünerek hücre kolonileri (Şekil 1e) oluşturmalarına rağmen Zagara Bianca mezofil protoplastları adı geçen ortamda bölünmüşler ancak hücre kolonisi oluşturamamıştır.

Kültüre alınma işleminden yaklaşık 6 hafta sonra seleksiyon ortamında fuzyon ürünü mikrokallus ve globüler embriyolar (Şekil 1f) gelişmiştir. Bu embriyolar 0.1 M galaktoz + 0.1 M sorbitol + 0.35 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MT ortamına aktarılarak kotiledon yapraklara sahip embriyolar (Şekil 1g), bu embriyolarında 0.05 mg/l NAA ve %2.5 sakkaroz içeren MT ortamında kültüre alınmasıyla da bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiş (Şekil 1h) ve toprağa aktarılarak doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır (Şekil 1i).

### Morfolojik Olarak Hibritlerin Belirlenmesi ve DNA Analizlerinin Yapılması

Protoplast fuzyonu sonucu elde edilen bitkilerin morfolojik yapıları incelendiğinde, fuzyon ürünü embriyolarından 6-10 arasında değişen kotiledon yaprak ve bir veya iki sürgün gelişimi gözlenmiştir. Kütdiken ve Zagara Bianca'nın fuzyon uygulanmamış embriyogenik hücre kültürlerinden izole edilen protoplastlarından gelişen embriyola-



Şekil 1. Kütiken limon ile Zagara Bianca limon (*C. limon*) çeşitleri arasında protoplast fuzyonu ve bitki regenerasyonu; Kütiken limonu embriyogenik hücrelerinden izole edilmiş protoplastlar (a), Zagara Bianca limon çeşidinin yapraklarından izole edilmiş mezofil protoplastları (b), PEG uygulaması ile birleşen ve birleşmek üzere bir araya gelen protoplastlar (c), bölünen protoplastlar (d), hücre bölünmesi sonucu oluşan koloniler (e), globular embriyoidler (f), kotiledon embriyolar (g), protoplast fuzyonu sonucunda regenere edilmiş bitki (h), toprağa aktarılmış bitki (i).

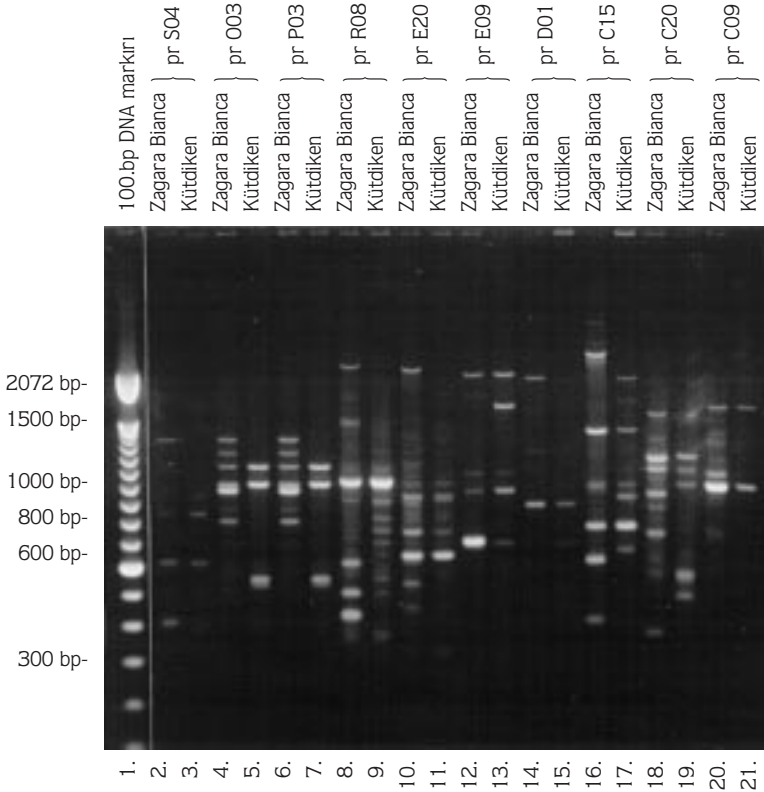
rın kotiledon yaprak sayısı ise 2 olup, normal görünüşte olmuştur.

Fuzyon sonucunda elde edilen 250 bitkiden 150 tanesinde 0.05 NAA + % 2.5 sakkaroz + MT ortamında kök oluşumu sağlanabilmiştir. Köklü bitkilerin morfolojilerini daha iyi gözlemek amacıyla bitkiler 1/2 MT makro ve mikro elementleri içeren sıvı MT ortamlarında kültüre alınmışlardır. Yaklaşık 2 ay sonra bu bitkilerin yapraklarında morfolojik farklılıklar belirginleşmiş ve bitkiler genel olarak 3 değişik yaprak morfolojisi göstermişlerdir. Birinci grup bitkilerin gövdesi kalın ve yaprak ayası normal ebeveyn bitkilere göre daha geniş olarak gelişirken, ikinci grup bitkiler ebeveynlerine göre yaprak ayası daha dar olarak gelişmiştir. Üçüncü gruba giren bitkiler diğer bitkilere göre normal görünüşte olup, yaprak ayası genişliği ve kalınlığı açısından heriki ebeveynine göre az da olsa farklılıklar göstermiştir. Renk açısından yapraklarda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Protoplast fuzyonu sonucunda regenere edilen ve morfolojik olarak farklılık gösteren bitkilerin RAPD analizleri için kullanılacak primerlerin belirlenmesi için 10 değişik primer (Tablo 1) önce ebeveyn bitkiler için denen-

miştir. Bu primerlerle yapılan RAPD analizleri sonucunda 10 primerden 7 tanesi (C 15, C20, E09, O03, P03, R08, S04) spesifik bantlar vermesine (Şekil 2) karşın bunlardan P03 ve E09 primerleri daha belirgin bantlar vermesi nedeniyle fuzyon sonucunda oluşan bitkilerin 12 tanesinin polimeraz zincir reaksiyonu ile RAPD analizlerinin yapılmasında kullanılmış ve agaroz jel elektroforezde poliformik bantlar elde edilmiştir (Şekil 3,4). Bu polimorfik bantlar içerisinde heteromorfik bantlar seçicilik özelliğine sahip olup, somatik hibritler her iki ebeveynine ait homomorfik bantlarla birlikte seçici heteromorfik bantlardan birini veya hepsini içermesine göre tespit edilmiştir.

Kütdiken limonu ovüler kalluslarının hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen genomik DNA E09 primeri ile RAPD analizi sonucunda 5 (Şekil 3), P03 primer ile 4 tane polimorfik bant oluştururken (Şekil 4), Zagara Bianca nusellar bitki yapraklarından izole edilen genomik DNA E09 primeri ile 8, P03 primeri ile 7 polimorfik bant oluşturmuştur (Şekil 3,4). E09 ve P03 primerlerinin varlığında sırasıyla Kütdiken limonu polimorfik bantlarından 4 ve 2 tanesi Zagara Bianca'nın polimorfik bantları ile homomorfik özelliğe sahip iken 1 ve 2'si spesifik bant oluşturmuş, Zagara Bianca limon çeşitinin ise her iki primer



Şekil 2. 10 farklı primerin Kütdiken limonu ovüler kallus ve Zagara Bianca limonu nusellar bitki DNA örneklerinde oluşturduğu RAPD bantları. 100 baz çiftlik (bp) bir DNA molekülü moleküler markır olarak kullanılmıştır.

varlığında da 4 tanesi Kütdiken limonu ile spesifik band özelliği göstermiştir. Test edilen 12 bitkiden EO9 primeri varlığında 15 nolu (Şekil 3) ve P03 primeri varlığında 3 nolu (Şekil 4) fuzyon bitkisi hem Kütdiken limonunun hem de Zagara Bianca limon bitkisinin homomorfik ve spesifik bantlarının tümünü içerdiğinden, somatik hibrit olarak belirlenmiştir.

RAPD ile somatik hibrit olduğu belirlenen bitkinin nükleer DNA içeriği ebeveyn bitkilerle flov sitometrik analizlerle karşılaştırılmış (Şekil 5a,b,c) ve somatik hibrit bitkinin nükleer DNA içeriği ( $2C=1.19-1.22$  pg) (Şekil 5c) ebeveyn bitkilerin nükleer DNA içeriklerinin ( $2C=0.74-0.78$  pg) (Şekil 5ab) yaklaşık iki katı olduğu saptanmış diğer fuzyon ürünü bitkilerin nükleer DNA içerikleri  $2C=1.06$  ile  $1.16$  pg arasında değişirken, kontrol olarak alınan tetraploid *Fortunella hindisii* Swing'in ise  $2C=1.23$  ile  $1.29$  pg arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

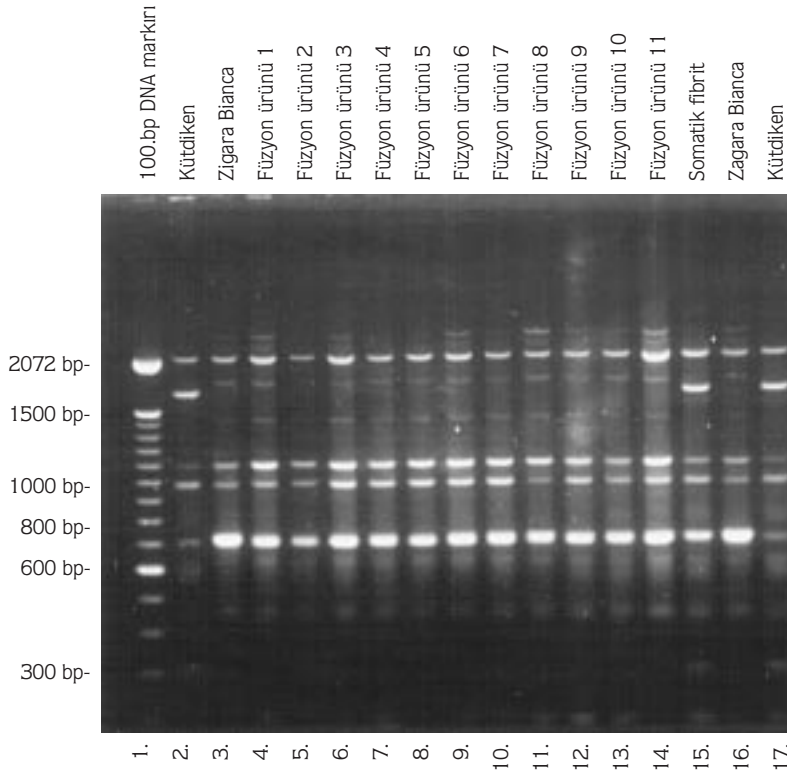
## Tartışma

Her iki limon çeşitinde de protoplast-bitki sisteminin gerçekleştirilmesinden sonra Kütdiken limonu hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlarla Zaga-

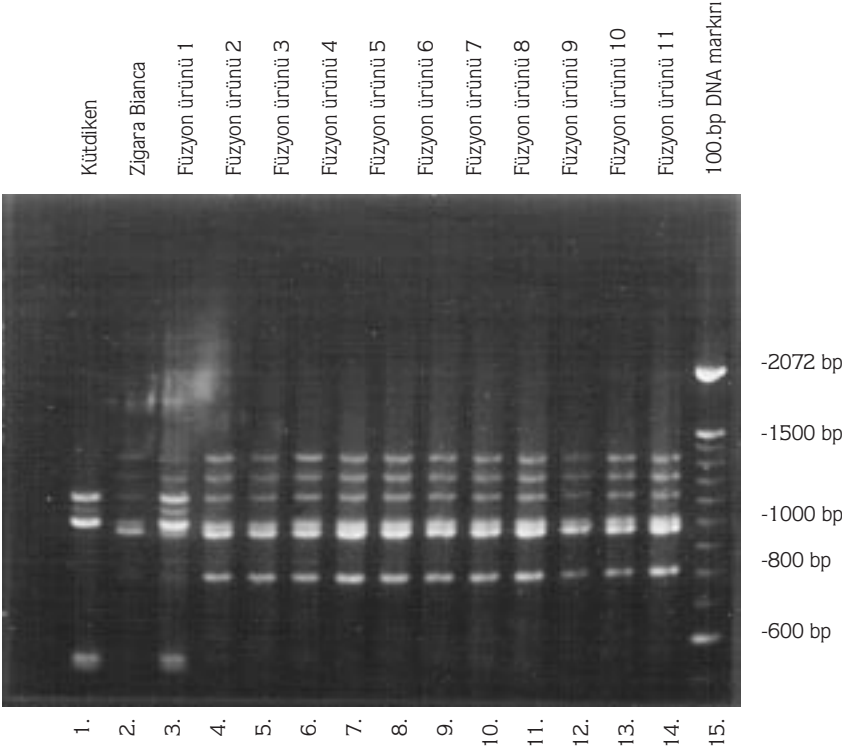
ra Bianca limonu in vitro bitkilerinin yapraklarından izole edilen mezofil protoplastları PEG aracılığı ile fuzyona tabi tutulmuşlardır. Fuzyon sonucunda protoplastların  $0.6$  M sakkaroz içeren hormonsuz katı MT ortamında kültüre alınmasından 6 hafta sonra fuzyon ürünü yeşil renkli globüler yapıda embriyolar oluşmuştur (Şekil 1f).

Protoplast fuzyonunda kullanılan PEG yöntemi pahalı olmaması nedeniyle elektrofuzyon yöntemine alternatif olarak değişik araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır (15,16,29,30). İlk kez Menczel ve ark. (31) tarafından geliştirilmiş ve Ohgavara ve ark. (14) tarafından turuncgillerde uygulanarak *Citrus sinensis* Osb. ve *Poncirus trifoliata* arasında protoplast fuzyonu ile allotetraploid hibrit bitkiler elde edilmiştir.

Fuzyon sonucunda somatik hibritlerin seleksiyonunda kullanılan bu yöntemin işlerlik mekanizması, ebeveynlerin birisinin dominant bir özellik olan embriyogenik kapasiteye sahip olması ve bu özelliğin fuzyon ürünlerinde ortaya çıkarak tüm bir bitkinin oluşumuna olanak sağlaması, buna karşılık ikinci ebeveynden izole edilen protoplastların (mezofil protoplastlar) hormonsuz ortamda regenerasyon kapasitesine sahip olmayan resesif bir özelliğe sahip olması şeklinde açıklanmaktadır (14). Ayrıca hormonsuz or-



Şekil 3. Kütdiken limonu ile Zagara Bianca limonu arasında yapılan protoplast fuzyonu sonucunda elde edilen fuzyon ürünü bitkilerin tanımlanması amacı ile EO9 primeri kullanılarak yapılan RAPD sonucu oluşan DNA profilleri. Soldan 2. ve 17. sıralar Kütdiken, 3. ve 16. sıralar Zagara Bianca, 15. sıra her iki ebeveyne ait spesifik bantlara sahip somatik hibrit bitki, 4 - 14. sıralar ise fuzyon ürünü bitkilere ait öantlar. 100 bp çiftlik bir DNA molekülü moleküler markır olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.

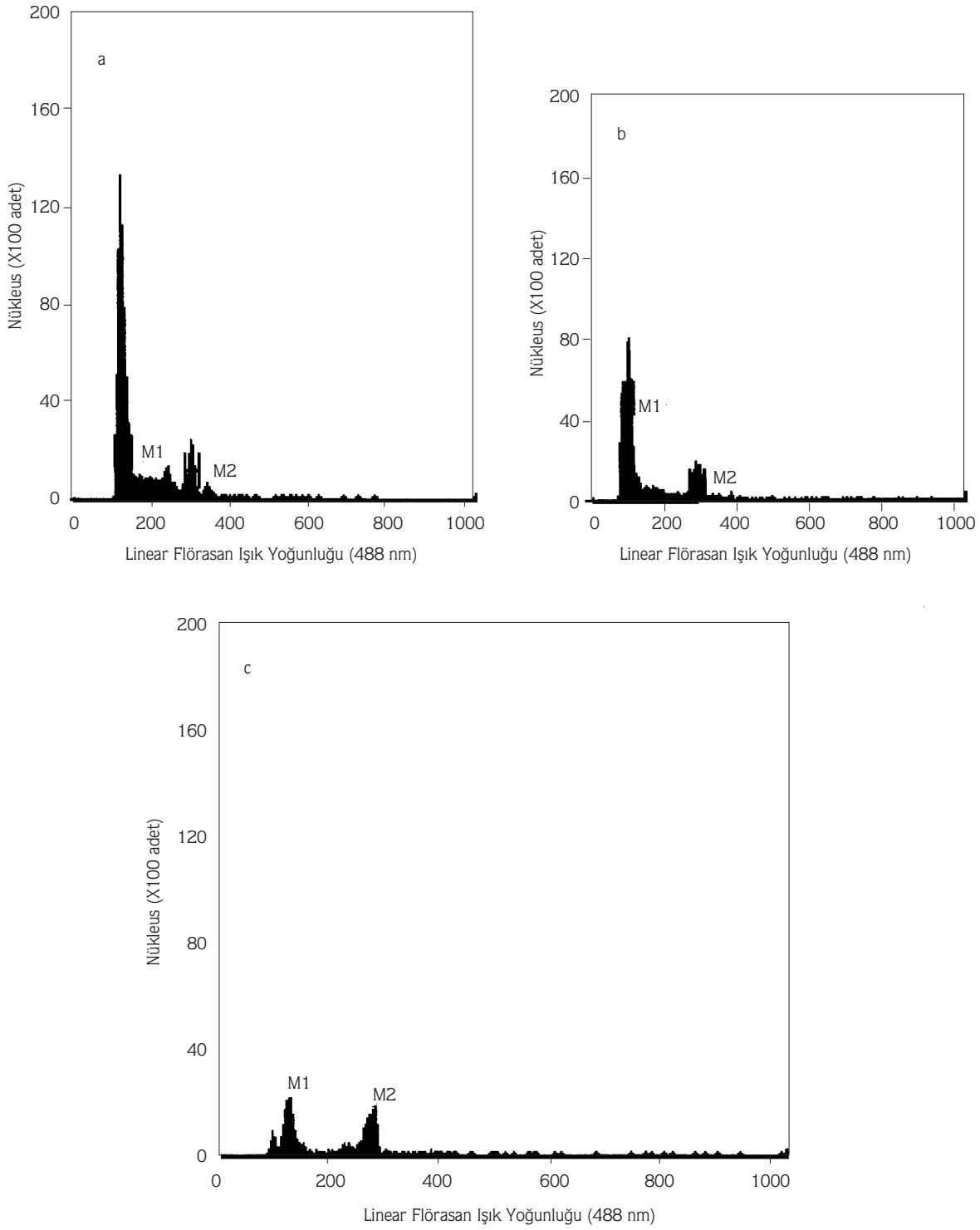
Kütdiken limonu ile Zigara Bianca limonu arasında yapılan protoplast fuzyonu sonucunda elde edilen fuzyon ürünü bitkilerin tanımlanması amacıyla PO3 primeri kullanılarak yapılan RAPD sonucu oluşan DNA profilleri; soldan birinci sıra Kütdiken, 2. sıra Zigara Bianca, 3. sıra her iki ebeveyne ait spesifik bant veren somatik hibrit bitki, 4-14. sıralar fuzyon ürünü bitkilere ait bantlar. 100 baz çiftlik bir DNA molekülü moleküler markır olarak kullanılmıştır:

tamda gelişen turunçgil embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri söz konusu ortamda embriyogenik özelliklerini korudukları gibi mitotik aktivitede kazanmaktadırlar. Bu özellik fuzyona uğramış protoplastlarda somatik embriyogenesisin teşvik edilmesinde tetik görevi görmekte ve bu suretle de fuzyon ürünlerinin embriyogenesis kapasitesi yükselmiş olmaktadır. Bunun başlıca nedeni de iki hücrenin birleşmesiyle endogen hormon seviyesinin yükselmesi ve kromozom sayısının ikiye katlanması ile hücrede metabolik faaliyetlerin hızlanması şeklinde açıklanmaktadır. Fuzyon uygulamasını takiben, fuzyona uğramamış olan embriyogenik protoplastların da bölünerek çoğalması mümkün olabilmektedir. Ancak bu tip protoplastlar mikro kallus oluşturmaları nedeniyle embriyo oluşturan fuzyon ürünlerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (14,30). Protoplast fuzyonunda eşlerden birine ait protoplastların yapraktan izole edilerek fuzyon işleminde kullanılmasının seleksiyonda sağladığı yararların yanısıra, klorofil içermesi nedeniyle protoplastların fuzyona uğrama oranlarını, eşler arasındaki renk farklılığı nedeniyle mikroskop altında kontrol etme olanağını vermesi bakımından da yarar sağlamaktadır (Şekil 1c). Bu nedenlerden dolayı çoğu araştırmacılar embriyogenik hücre kültürlerinden izole edilen protoplastlara fuzyon esnasında eş olarak

mezofil protoplastlarını seçmektedirler (15,16,29,30).

Araştırmada fuzyon sonucu kültüre alınan protoplastlardan oluşan embriyolardan bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiş ve regenerasyon 250 bitkiden 150 tanesi köklendirilebilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda bazı bitkilerin morfolojik olarak farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Somatik hibrit bitkilerin tanımında morfolojik farklılıklardan yararlanma Citrus ve diğer cinsler de dahil olmak üzere geniş kullanım alanına sahiptir. Dominant ve ko-dominant genlerin kontrolü altındaki özellikler somatik hibrit bitkilerin tanısında önemli faktörlerdendir. İnterspesifik somatik hibrit bitkilerin belirlenmesinde kriter olarak göz önüne alınan morfolojik farklılıklar, intraspesifik (bir tür içerisindeki çeşitler arasında) somatik hibritleri belirlemede ayırt edici kriter olmayabilir. Böyle durumlarda veya morfolojik farklılığın kriter olarak değerlendirildiği fuzyon ürünlerinde kromozom sayımları yapılmakta daha sonra somatik hibritleri homo ve heterokaryonlardan ayırt etmek amacı ile bu bitkilerin, yapraklarındaki yağların kromatografik ayırım analizleri, izozim analizleri, ebeveyn bitkilere ait spesifik mtDNA (mitokondrial DNA), chDNA (kloroplast DNA), rDNA (ribozomal DNA) veya rRNA (ribozomal RNA) fragmentlerinin restriksiyon endonükleaz analizleri ile ve son yıllarda kısa sürede yüzlerce





Şekil 5. Kütdiken limonu kallus (a), Zagara Bianca nusellar bitki (b) ve protoplast füzyonu sonucunda elde edilen somatik hibrit bitki yaprak hücre nükleuslarının (c) flov sitometri ile belirlenen nükleer DNA içerikleri, M1: bitki nükleer DNA pik noktaları; M2: tavuk alyuvarları nükleer DNA pik noktaları.

bitkinin aynı anda testlenmesine olanak sağlayan RAPD (tesadüfi olarak çoğaltılmış polimorfik DNA) analizi gibi yöntemlerden birisi uygulanarak kesin sonuçlara ulaşılmaktadır.

Kütdiken ve Zagara Bianca limonlarından izole edilen protoplastların fuzyonu sonucunda elde edilen fuzyon ürünlerinden morfolojik olarak farklılık gösteren 100 bitkiden 37'si seçilmiş ve DNA izolasyonu yapılarak bunlar arasından somatik hibrit bitkileri belirlemek için 12 bitkide RAPD analizi yapılmıştır. RAPD (tesadüfi olarak çoğaltılmış polimorfik DNA) tekniği günümüzde RFLP (belli fragment uzunluğunda polimorfizm) (32,33,34) çalışmalarını tamamlamada, bir türe ait farklı varyeteleri saptamada, mutasyon analizlerinde (32,35,36) ve son zamanlarda fuzyon ürünlerinden somatik hibritleri seçmede (26) yoğun olarak kullanılmaktadır. Rastgele sentezlenmiş tek kollu 10 bazlık oligonükleotidler genomik DNA'dan tesadüfi olarak komplementarları ile bir araya gelmiş DNA amplifikasyon ürünlerini elde etmede primer olarak kullanılmaktadır. Bir bitkinin farklı varyetesi, nükleotid dizisi belli primerlerle farklı DNA bantları (polimorfizm) oluşturur. Bu şekilde varyeteler biri birinden ayırt edilebilmekte ve polimorfizmin bitki genomundaki yerleri saptanabilmektedir (32).

Yapılan RAPD sonuçlarına göre 12 fuzyon ürünü bitkiden 1 tanesi somatik hibrit olarak saptanmış olup, diğer fuzyon ürünü bitkilerin Zagara Bianca nusellar bitki orjinli olduğu agaroz jel elektroforezinde elde edilen bantların gözlenmesi ile tespit edilmiştir. Nitekim Kobayashi ve ark. (37) *Citrus sinensis* 'Washington' navel embriyogenik hücre süspansiyon kültürü ve Satsuma mandarini yaprak protoplastları arasında gerçekleştirdikleri fuzyon sonucunda bir tane, Navel portakalı ve 'Murcott' Tangor arasındaki protoplast fuzyonu ile iki tane somatik hibrit bitki elde ettiklerini biyotin ile işaretli rDNA fragmentlerinin sırasıyla Sac I ve Eco RI restriksiyon endonükleaz enzim analizleri ile göstermişlerdir. Ohgawara ve ark. (14) *C. sinensis* 'Trovita' embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri ile *Poncirus trifoliata* yaprak protoplastları arasındaki fuzyon sonucunda 10 tane, *C. sinensis* "Trovita" portakalı ile Troyer Citrange (*C. sinensis* X *P. trifoliata*) arasındaki fuzyon sonucunda ise 21 klondan 17 tanesinin somatik hibrit olduğunu P32 ile işaretlenmiş rRNA'nın Eco RI ve biyotin ile işaretlenmiş rRNA'nın Eco RV restriksiyon endonükleaz analizleri ile kanıtlamışlardır. Bununla birlikte Grosser ve ark. (38) *C. sinensis* 'Hamlin' embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastları ile *P. trifoliata*

'Flying Dragon' yaprak protoplastları arasındaki fuzyon sonucunda 300'den fazla intergenerik somatik hibrit elde etmişlerdir. Yine aynı araştırmacıların (39) seksüel olarak uyumsuz *C. sinensis* embriyogenik 'Hamlin' protoplastları ile embriyogenik olmayan *Severinia disticha* kallus protoplastları arasında gerçekleştirilen fuzyon sonucunda 150'den fazla intergenerik allotetraploit somatik hibrit bitkiler elde ettiklerini yapmış oldukları genetik analizlerle kanıtlamışlardır.

Seksüel olarak uyumsuz *C. reticulata* Blanco cv. Cleopatra mandarininin embriyogenik protoplastları ile *Citropsis gilletiana* Swing. & M. Kell. yaprak protoplastları arasında gerçekleştirilen fuzyonda 147 fuzyon ürünü bitki regenerere edilmiş olup, bunlardan 135 tanesi 'Cleopatra' mandarini özelliği taşıırken, 12 tanesinin Cleopatra X Citropsis intergenerik allotetraploit somatik hibrit olduğu fosfoglukoz mutaz (PGM) ve fosfoheksoz izomeraz (PHI) izozim bantlarının elektroforetik analizleri ile saptanmıştır (40). Yine seksüel olarak uyumsuz *C. sinensis* ve *Atalantia ceylanica* arasındaki yapılan protoplast fuzyonunda 5 tane intergenerik allotetraploit somatik hibrit bitkileri elde ettiklerini yapmış oldukları yaprak izozim analizleri ile belirlemişlerdir (41).

Protoplast fuzyonu sonucunda elde edilen bitkilerin genetik analizlerinde kullanmış olduğumuz RAPD yöntemine ilave olarak yapılan flov sitometrik analiz sonuçları RAPD analizleri ile elde ettiğimiz bulguları kanıtlayıcı özellikte olmuştur. Nitekim Arumuganathan ve Earle (27,28) tarafından 107 kültür bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda bitki, kallus, hücre süspansiyon ve anter kültürleri ile protoplast fuzyonu ve transformasyon sonucu elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesinde daha kolay ve hızlı sonuç veren flov sitometrik analizlerin kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların yanı sıra Ollitrault ve ark. (42)'larının turuçgillerde diploid genom büyüklüklerini saptamak amacı ile yaptıkları flov sitometri analizleri sonucunda *Citrus limon* 'un nükleer DNA (2C) içeriğinin ortalama 0.77 pg olarak tespit ettiklerinden bizim diploid kallus ve bitki genomlarından elde ettiğimiz sonuçlara çok yakın bulunmuştur. Diğer fuzyon ürünü bitkilerin morfolojik olarak farklılık göstermesine ve nükleer DNA içerikleri normal diploid bitkilerden fazla (2C=1.06-1.16 pg), kontrol olarak ele alınan tetraploid *F. hindisii* Swing'in 1.23-1.29 pg DNA miktarına karşılık az olması nedeniyle somatik hibrit olarak belirlenmemiş ancak bu bitkilerde kromozom kayıplarının olduğu tahmin edilmektedir. Bunların yanı sıra RAPD sonucuna göre elde edilen

somatik hibrit bitkinin nükleer DNA içeriği 1.19-1.22 pg olarak belirlenip, tetraploid *F. hindisii* Swing'in genom büyüklüğüne çok yakın bulunduğundan elde edilen somatik hibrit bitkinin de tetraploid olduğu sonucuna varılmıştır.

Süreklilik arzeden bu araştırmada elde olmayan nedenlerle sadece 12 bitkinin genomik DNA analizleri yapılabilmektedir. Elde mevcut diğer bitkiler arasında amaca yönelik bitkilerin olması muhtemeldir. Bu nedenle olanaklar elverdiği sürece bu bitkiler çeşitli yönlerden ele alınıp incelenerek ebeveyn bitkilere göre genetik bakımdan farklı-

lık arzedenler ortaya çıkarılmaya çalışılacaktır.

### Teşekkür

TÜBİTAK TOGTAG grubu ve Ç.Ü. Araştırma Fonuna, polimeraz zincir reaksiyonu ile flow sitometrik analizlerin yapılmasına olanak sağlayan Finlandiya Tarımsal Araştırma Merkezi, Bitki Islahı Bölümün'e (Agricultural Research Center of Finland, Plant Breeding Section) teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

1. FAO, Production Year Book, FAO Rome. 71, 175-178, 1992.
2. Klotz, L., Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: W. Reuther, C.E. Calavan, and G.E. Carman (Eds), The Citrus Industry, University of California Press, Berkeley. 4, 1-66, 1978.
3. Akteke, Ş. A., Limonlarda Uçkurutan Hastalığının Sörveyi ve Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Yayın No. 17, Güney Matbaası, Adana, 1979.
4. Salerno, M., Somma V., Osservazioni Sulla Sistemica del Benomyl in Semenzali di Arancio Amaro e Risultate di Lotta Contro di "Mal Secco" Degli Agrumi. Phytopathologia Mediterranea, 99-106, 1971.
5. Cutuli, G., Laviola, C., Perrotta, G., Salerno, M., Spina, P., Le Mal Secco Des Argumes, Seminaire Internationale Agrimed 1984-1988, capod. Orlando, Massina, 131, 1984.
6. Kobayashi, S., Ohgawara, T., Ohgawara, E., Oiyama, E.I., Ishü, S., A Somatic Hybrid Plant Obtained by Protoplast Fusion Between Navel orange (*Citrus sinensis*) and Satsuma Mandarin (*C. unshii*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 14, 63-69, 1988.
7. Hidaka, T., Kajiura, I., Plantlet Differentiation from Callus. Protoplasts Induced from Citrus Embryo. Scientia Horticulturae, 34, 85-92, 1988.
8. Grosser, J.W., Chandler, J.L., Aseptic Isolation on Leaf Protoplast from Citrus, Poncirus, Citrus X Poncirus Hybrids and Severiania for Use in Somatic Hybridization Experiments. Scientia Horticulturae, 31, 253-257, 1987.
9. Hidano, Y. and Nüzeki, M., Protoplast Culture of Decious Fruit Trees. Scientia Horticulturae, 37, 201-206, 1988.
10. Yarrow, S.A., Barsby, T.L., Recent Advances in Protoplast Culture of Horticultural Crops. Scientia Horticulturae, 37, 179-200, 1988.
11. Pua, E.C., Plant Regeneration from Stem-Derived Protoplast of Brassica Albogabra Bailey. Plant Sci. 50, 153-160, 1987.
12. Kobayashi, S., Uchimiya, H., Ikeda, I., Plant Regeneration from "Trovita" Orange Protoplasts. Jpn. J. Breed., 33, 119-122, 1983.
13. Vardi, A., Breiman, A., Galun, E., Citrus Cybrids; Production by Donor-Recipient Protoplast Fusion and Verifctation by MitochondrialDNA restriction Profiles. Theor. Appl. Genet., 75, 51-58, 1987.
14. Ohgawara, D., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchiyama, H., Ishü, S., Somatic Hybrid Plants Obtained by Protoplast Fusion between Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. Theor. Appl. Genet., 71, 1-4, 1985.
15. Grosser, J.W., Moore, G.A., Gmitter F.G.Jr., Interspecific Somatic Hybrid Plants from Fusion of Key Lime (*Citrus aurantifolia*) with "Valencia" Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Protoplasts. Scientia Hort., 39, 23-29, 1989.
16. Vardi, A., Arzee-Gonen, P., Frydman-Shani, A., Bleichman, S., Galun, E., Protoplast-Fusion-Mediated Transfer of Organelles from Microcitrus into Citrus and Regeneration of Navel Alloplasmic Trees. Theor. Appl. Genet., 78, 741-747, 1989.
17. Tuzcu, Ö., Kaplankıran, M., Yeşiloğlu, T., Çınar, A., Erkiç, A., Çelikel K., Çetiner, E., Turunçgillerin Uçkurutan (*Phoma tracheiphila* Kanc. et. Ghick.) Hastalığına Dayanıklılıklar, Doğa 11(1), 54-66, 1987.
18. Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Safran, H., Adventive Plants from Ovules and Nucelli in Citrus. Planta, 106, 237-245, 1972.
19. Murashige, T., Tucker, D.P.H., Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. In: Chapman, H. D. (ed), Proc. 1st. Int. Citrus Symp. Vol. 3., Riverside CA. pp. 1151-1161, 1969.
20. Vardi, A., Hutchison, D.J., Galun, E., A Protoplast to Tree System in Microcitrus Based on Protoplasts Derived from a Sustained Embryonic Callus. Plant Cell Rept., 5, 412-414, 1986.
21. Vardi, A., Galun, E., Isolation and Culture of Citrus Protoplast. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplast and Genetic Engineering I (Ed. Y.P.S. Bajaj), 147-159, 1989.
22. Nadel, B.L., Use of Fluorescein Diacetate in Citrus Tissue Cultures for the Determination of Cell Viability and the Selection of Mutants. Scientia Hort., 39, 15-21, 1989.

23. Murashige, T., Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497, 1962.
24. Hidaka, T., Omura, M., Control of Embriyogenesis in Citrus Cell Culture. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. B* 16, 1-17. 1989.
25. Power, J.B., Davey, M.R., Mcllellan, M. and Wilson, D., *LaboratQry Manual Plant Tissue Culture Plant Genetic Manipulation*, Group, Department of Botany, University Nottingham, 1989.
26. Rokka, V.M., Xu, Y.S., Kankila, J., Kuusela, A., Pulli, S., Pehu, E., Identificator of Somatic Hybrids of Dihaploid *Sodanum kuberosum* Lines and *S. brevidens* by Species Specific RAPD Patterns and Assessment of Disease Resistance of the Hybrids. *Euphytica*, 80, 207-217, 1994.
27. Arumuganathan, K., Earle, E.D., Estimation of nuclear DNA content of plants by Flow Cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9,229-233, 1991.
28. Arumuganathan, K., Earle, E.D., Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9,208-213, 1991.
29. Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ishü, S., Yoshinaga, K., Oiyama, I., Fertile Fruit Trees Obtained by Somatic Hybridization Navel Orange (*C. sinensis*) and Troyer Citrange (*C. sinensis* X *Poncirus trifoliata*). *Theor. Appl. Genet.*, 81, 141-143, 1991.
30. Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr., Protoplast Fusion and Citrus Improvement. *Plant Breed. Rev.* 8, 1991.
31. Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Z.R., Maliga, P., Streptomycin Resistant and Sensitive Somatic Hybrids of *Nicotiana tabccum* + *Nicotiana knightrana* : Correlation of Resistance to *N. tabaccum* Plastids. *The Theor. Appl. Genet.*, 59, 191-195, 1981.
32. Ainsworth, C., Beynon, J., Buchanan-Wollaston, V., *Techniques in Plant Molecular Biology. The Practical Manual*. Wye College, University of London, p. 129, 1992.
33. Burr, B., Evola, S.V., Burr, F.A., The Application of Restriction Fragment Length Polymorphism to Plant Breeding. In: *Genetic Engineering Principles and Melhods*. J.K. Setlow and A. Hollaender (Eds) p., 45-59, Plenum, New York, 1983.
34. Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C., Wegman, S., Restriction Fragment Polymorphisms as Probes for Plant Diversity and Their Development as Tools for Applied Plant Breeding. *Plant Molecular Biology*, 5, 109-118, 1985.
35. Hu, J., Quiros, C.F., Identification of Broccoli and Cauliflower Cultivars with RAPD Markers. *Plant Cell Reports*, 10, 505-511, 1991.
36. Tinker, N.A., Fortin, M.G., Mather, D.E., Random Amplified Polymorphic DNA and Pedigree Relationships in Spring Barley. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 976-984, 1993.
37. Kobayashi, S., Ohgawara, T., Ohgawara, E., Oiyama, I., Ishii, S., A Somatic Hybrid Plant Obtained by Protoplast Fusion Between Navel Orange (*Citrus sinensis*) and Satsuma Mandarin. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 14, 63-69, 1988.
38. Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr., Chandler, J.L., Intergenerie Somatic Hybrid Plants of *Citrus cinensis* cv. 'Hamlin' and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Reports*, 7, 5-8, 1988.
39. Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr., Chandler, J.L., Intergeneric Somatic Hybrid Plants from Sexually Incompatible Woody Species: *Citrus cinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.*, 75, 397-401, 1988.
40. Grosser T.W., Gmitter, F.G.Jr., Tusa, N., Chandler, J.J. Somatic Hybrid Plants from Sexually Incompatible Woody Species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. *Plant Cell Reports*, 8, 656-659, 1990.
41. Louzada, E.S., Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr. Intergeneric Somatic Hybridization of Sexually Incompatible Parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. *Plant Cell Reports*, 12, 687-690, 1993.
42. Ollitrait, P., Dambier, D., Luro, F., Duperray, C., Nuclear Genome Size Variations in Citrus . *Fruits*, 49, 390-393, 1994.