

## Turunçgillerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları

Bayram ÇEVİK<sup>1</sup>, Mehtap ŞAHİN ÇEVİK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

**Özet:** Diğer bitkilerde olduğu gibi turunçgillerde de genetik mühendisliği uygulamalarının yapılması ve yaygınlaşması, istenilen özellikleri sağlayacak genlerin bulunmasına ve bunları bitkiye aktaracak transformasyon yöntemlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bu iki temel koşulun sağlanmasıyla turunçgillere ıslah çalışmalarıyla kazandırılmayan bazı özellikler genetik mühendisliği yoluyla kazandırılabilir. Bu amaçla turunçgillerde son on yılda çok sayıda çalışma yapılmış olup farklı bitki materyali ve farklı gen aktarım yöntemleri kullanılarak transgenik bitkiler üretilmiştir. Başlangıçta transformasyon çalışmaları sadece raportör genler kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra transformasyon yöntemlerinin optimizasyonu ve tarımsal açıdan önemli genlerin çeşitli kaynaklardan klonlanmasıyla turunçgillerde hastalık ve zararlılar yanında abiyotik streslere dayanıklılık ve meyve kalitesinin artırılmasına yönelik genetik mühendisliği uygulamaları da başlamıştır. Bu uygulamalar sonucunda birçok transgenik bitki üretilmiş olup halen bu transgenik bitkilerin moleküler ve biyolojik karakterizasyonları yapılmaktadır. Bu çalışmada dünyada turunçgillerde yapılan genetik transformasyon çalışmaları ve bunların sonuçları derlenerek yakın gelecekteki durumu ve ülkemiz açısından önemi tartışılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Turunçgiller, genetik mühendisliği, genetik transformasyon, doku kültürü, Biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık,

### Application of Genetic Engineering in *Citrus*

**Abstract;** As in other plants, application of genetic engineering in *Citrus* requires availability of genes for desired traits and development of genetic transformation methods. Once these conditions are met, traits that can not be integrated into the *Citrus* genome by conventional breeding could be introduced to citrus by genetic engineering. Hence, a number of studies were conducted in *Citrus* and transgenic citrus plants were produced from different types of plant material using various transformation methods in the last decade. Initially, citrus plants were transformed only with reporter genes. As the transformation methods were optimized and genes for agriculturally important traits become available by cloning from different sources, genetic engineering was applied for developing resistance to diseases, pests and abiotic stresses as well as improving fruit quality in *Citrus*. As a result, many transgenic plants transformed with these genes were produced and molecular and biological characterization of these transgenic plants are still underway. In this study, genetic transformation studies in *Citrus* were reviewed and its prospects in the near future and its importance for Turkey were discussed.

**Key words:** Citrus, genetic engineering, genetic transformation, tissue culture, resistance to abiotic and biotic stresses,

## Giriş

Turunçgillerde klasik ıslah yöntemleri gençlik kısırlığı dönemlerinin uzun olması, heterozigoti, kısırlık, kendine ve karşılıklı uyumsuzluk gibi problemlerden dolayı etkin bir şekilde kullanılmamaktadır (Gmitter ve ark. 1992). Bu nedenle genetik mühendisliği turunçgiller gibi odunsu bitkilerin ıslahında uygun ve etkin bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Ticari olarak yetiştirilen turunçgil çeşitlerine genetik mühendisliği uygulamalarıyla yeni genler aktararak, istenilen özelliklerin kazandırılmasıyla, tarımsal açıdan daha çok istenilen çeşitler haline getirilebilir. Bütün bitkilerde olduğu gibi genetik mühendisliğinin turunçgillerde başarıyla uygulanması, tarımsal açıdan önemli özellikleri kodlayan genlerin bulunabilirliğine ve bu genlerin turunçgil genomuna entegre edilebilmesi yani bitkiye aktarılması için gerekli transformasyon yöntemlerinin geliştirilmiş olmasına bağlıdır.

## Transformasyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Uzun yıllardan beri turunçgillerde etkin bir transformasyon yönteminin geliştirilmesi için farklı turunçgil türleri üzerinde değişik transformasyon teknikleri kullanılarak, çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Turunçgillerde genetik transformasyon ilk defa polietilen glikol'le (polyethylene glycol, PEG) doğrudan DNA aktarımı (direkt DNA uptake) yöntemi kullanılarak, Trovita portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) çeşidinin protoplastında yapılmıştır (Kobayashi ve Uchimiya 1989). Bunu kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.) protoplastının PEG ile doğrudan DNA aktarımı yöntemi kullanılarak yapılan genetik transformasyon çalışması izlemiştir (Vardi ve ark. 1990). Daha sonra *Citrus reticulata* Blanco protoplastlarında elektroprasyon (electroporation) yöntemi kullanılarak, transformasyon başarılı bir şekilde

gerçekleştirilmiştir (Hidaka ve Omura 1993). Doğrudan DNA aktarımına alternatif transformasyon yöntemleri geliştirmek amacıyla portakal kallusundan elde edilen süspansiyon hücre kültürleri *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak transforme edilmiştir (Hidaka ve ark. 1990). Daha sonra tangelolardan elde edilen embriyogenik hücreler gen tabancası kullanılarak transforme edilmiş ve transgenik embriyolar üretilmiştir (Yao 1996). Bu çalışmalar sonucunda turunçgil protoplastları ve embriyogenik kalluslardan elde edilen hücre kültürlerinde PEG ve elektroprasyona dayalı doğrudan DNA aktarım yöntemleri yanında, gen tabancası ve *Agrobacterium* kullanılarak da transgenik bitki üretilebileceği gösterilmiştir. Ancak protoplast ve hücre süspansiyon kültürlerinin hazırlanmasının zor olması (Gmitter ve ark. 1992) ve bu yöntemler kullanılarak elde edilen transgenik bitkilerin yetiştirilmesi sırasında daha fazla güçlüklerle karşılaşılması ve daha uzun süre gerektirmesinden dolayı geliştirilen bu yöntemler, turunçgillerde rutin genetik mühendisliği çalışmaları için yetersiz kalmışlardır.

Bu transformasyon yöntemlerinin yetersizliğini gidermek amacıyla, turunçgil epikotil parçalarının *A. tumefaciens*'le transformasyonunu sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemle önce Carrizo citrange ve Swingle citrimento fidanlarından elde edilen epikotil parçaları *A. tumefaciens*'le birlikte bekletilerek transformasyon sağlanmış ve bu parçalardan organogenik rejenerasyonla transgenik sürgünler elde edilmiştir. Daha sonra bu transgenik sürgünler köklendirilerek, tüm transgenik bitkiler elde edilmiştir (Moore ve ark. 1992; Moore ve ark. 1993). Geliştirilen bu yöntem daha da geliştirilerek *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. epikotil parçalarının daha etkin olarak transformasyonu sağlanmıştır (Kaneyoshi ve ark. 1994). Epikotil parçalarının *Agrobacterium*'la transformasyonunu sağlayan bu yöntemde transformasyon ve rejenerasyonu etkileyen

faktörler ayrıntılı olarak ayrı ayrı incelenerek, yöntem citrangelar, laym ve turunç gibi turunçgil türleri için optimize edilmiştir (Gutierrez ve ark. 1997). Böylelikle farklı turunçgil türlerinde ve akrabalarında kullanılabilir bir transformasyon ve rejenerasyon yöntemi oluşturulmuştur. Ancak transgenik sürgünlerin köklendirilerek, transgenik bitki oluşumundaki bazı zorluklar tam olarak aşılanamamıştır..

Yukarıdaki yöntem benzeyen ancak daha etkin olan bir transformasyon ve rejenerasyon sağlayan yeni bir yöntem geliştirilerek, Pineapple portakal çeşidinin transformasyonunda kullanılmıştır. Bu yöntemde transformasyon için yine epikotil parçaları kullanılarak ve transgenik sürgünler aynı şekilde elde edilmiştir. Ancak bu transgenik sürgünler köklendirme ortamında köklendirilme yerine, önce sürgün ucu aşılama tekniğiyle *in vitro* kültürde yetiştirilen anaçlar üzerine aşılanmıştır. Daha sonra da serada yetiştirilen ve güçlü bir anaç olan kaba limon anaçı üzerine aşılanarak, transgenik bitkiler elde edilmiştir (Pena ve ark. 1995a, Pena ve ark. 1995b). Bu yöntem daha sonra laym (*C. aurantifolia* L.) ve citrangelar için de optimize edilerek, bu türlerin transformasyonu için kullanılmıştır (Pena ve ark. 1997, Cervera ve ark. 1998). Ayrıca bu yöntemin aşılama aşamasında bazı değişiklikler yapılarak, Washington Navel portakalının transformasyonunda da kullanılarak transgenik sürgünler doğrudan seralardaki Carrizo citrange üzerine mikro-aşılama tekniğiyle aşılanarak, transgenik portakal bitkilerinin üretimi gerçekleştirilmiştir (Bond and Roose 1998). Bu yöntem kullanılarak, birkaç turunçgil türünün başarılı bir şekilde transformasyonunun gerçekleştirilip, transgenik bitkiler elde edilmesine rağmen, tam bir transgenik bitkinin elde edilmesi, sürgün ucu aşılması ve mikro-aşılama gibi karmaşık ve zor tekniklerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle bu yöntemler transformasyonun etkinliğini artırırken, rejenerasyonu daha karmaşık hale getirerek,

turunçgillerin transformasyonunda kullanılacak rutin bir protokol için gerekli koşulları tam olarak sağlayamamıştır.

Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda epikotil parçaları kullanılarak transformasyon yapılmasını ve organogenesisle transgenik bitki rejenerasyonunu sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, transgenik sürgünlerin köklendirilmesiyle ilgili problemleri azaltıp, sürgünlerden transgenik bitki elde edilmesini kolaylaştırarak, Duncan altıntop çeşidinin (*C. paradisi*) transformasyonunda başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Luth ve Moore 1999). Geliştirilen bu yöntem, sadece transgenik sürgünlerin kısa zamanda köklenerek, transgenik bitkilerin elde edilmesini sağlayan basit bir protokol ortaya çıkarmakla kalmayıp, aynı zamanda *Agrobacterium*'a dayalı transformasyonun etkinliğini artırmıştır. Bu protokol temel alınarak yapılan epikotil parçalarının uzunluğuna kesilmesi ve kesilen epikotil parçalarına sakkaroz ve maltozla plasmolisis uygulaması, transformasyon etkinliğini daha da artırmıştır (Kayım ve ark. 2003, Kayım ve Koç 2005)

Diğer bitkilerde olduğu gibi turunçgillerde de transformasyon için genellikle *in vitro* gelişim potansiyeli yüksek olan ve az bulaşma (kontaminasyon) gösteren, juvenilesini tamamlamamış bitki parçaları kullanılmaktadır. Ancak turunçgiller gibi juvenile gösteren bitkilerde, genetik mühendisliği uygulamalarının ürün bazında bitki üzerindeki etkisinin kısa sürede değerlendirilebilmesi için transformasyon aşamasında, juvenilesini tamamlamış bitki materyalinin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle erişkin turunçgil bitkilerinden alınan bitki materyaline dayalı transformasyon yöntemlerinin geliştirilmesi, genetik mühendisliği uygulamalarının turunçgil ıslahında kullanımını yaygınlaştırıp hızlandıracaktır. Bu kapsamda Pineapple portakal çeşidinin erişkin ağaçlarından alınan boğum arası parçacıkları, *Agrobacterium*'la transform edilmiştir. Daha sonra bunlardan

elde edilen transgenik sürgünler, anaçlar üzerine mikro-aşılama yöntemiyle aşılansarak, birkaç transgenik bitkinin elde edilmesi sağlanmış ve bu bitkiler 14 ayda meyve vermeye başlamıştır (Cervera ve ark. 1998). Buna benzer olarak Pera, Valancia, Natal ve Hamlin gibi dört farklı portakal çeşidinin erişkin ağaçlarından alınan boğum arası parçacıkları ve yaprak diskleri *Agrobacterium*'la transform edilerek, Carizzo anacı üzerine mikro-aşılama yöntemiyle aşılansarak, transgenik bitkiler elde edilmiştir (Almaeida ve ark. 2003). Böylece en azından bazı turunçgil türlerinde erişkin bitki materyali kullanılarak, genetik transformasyon yapılabileceği gösterilmiştir.. Diğer transformasyon yöntemlerinde olduğu gibi bu yöntem üzerinde de küçük değişiklikler yapıp, diğer önemli turunçgil tür ve çeşitlerine uyarlanarak, bunlar üzerinde uygulanacak gen aktarımlarında kullanılabilir.

Turunçgillerde geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan *A. tumefaciens*'e dayalı transformasyon yöntemine alternatif olarak, *Agrobacterium rhizogenes*'le yapılan bir transformasyon yöntemi geliştirilerek, transgenik Meksika laymı ve turunç elde edilmesinde kullanılmıştır (Perez-Molphe-Balch ve Ochoa-Alejo 1998, Chávez-Vela ve ark. 2003). Bu yöntemde yine epikotil parçaları kullanılmakla birlikte *A. rhizogenes*'le yapılan transformasyon sonucunda önce transgenik kökler elde edilmekte ve daha sonra bu köklerden sürgünler oluşturularak köklenmiş tam transgenik bitkiler elde edilmektedir. Bu yöntem trunçgillerin transformasyonunda yaygın olarak kullanılmasa da transgenik kök dokusundan, tüm transgenik bitkiler ürettiği için *A. tumefaciens*'e dayalı transformasyon yöntemlerinde rastlanılan köklendirme problemini çözmesi yanında transformasyon yüzdesini artırarak, kimerik transformasyonları azaltarak, özellikle anaçlara gen aktarımı konularında bazı avantajlar sunmaktadır.

*A. rhizogenes*'e dayalı transformasyon yöntemleri bazı avantajlar

sağlasa da erişkin ağaçlardan ve erişkin olmayan fidanlardan elde edilen epikotil parçaları kullanılarak uygulanan *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon yöntemi, turunçgillerde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem önceleri sadece glukronidaz (GUS), yeşil fluoresan protein (GFP) ve kanimicine dayanıklılık (NPTII) gibi raportör genlerinin turunçgillere aktarılmasında başarıyla kullanılmıştır. Günümüzde tarımsal açıdan önemli genlerin turunçgillere ve akrabalarına aktarılmasında kullanılarak, turunçgillerde genetik mühendisliği uygulamalarına katkıda bulunmaktadır.

Genetik mühendisliği yoluyla genetiği değiştirilen organizmalara olan tepkinin başında, bu bitkilere istenilen gen dışında, antibiyotiklere dayanıklılık geninin de aktarılması ve transgenik bitkilerin bu antibiyotiğe dayanıklılığına göre ilk seleksiyonlarının yapılmasıdır. Bu konudaki duyarlılığı gidermek açısından transgenik bitkilerde, antibiyotiklere dayanıklılık genleri dışında seleksiyon yapmanın yolları araştırılarak, antibiyotiğe dayanıklılık geni içermeyen transgenik bitkiler geliştirilmesine çalışılmaktadır. Turunçgillerin genetik transformasyonunda antibiyotiklere dayanıklılık genlerinin kullanımını ortadan kaldırmak için *Escherichia coli* bakterisinin mannozunu karbon kaynağı olarak kullanmasını sağlayan phosphomannoz-izomeraz (phosphomannose-isomerase PMI) genini seçici gen ve mannozu seçici ajan olarak kullanan bir transformasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde PMI geni *Agrobacterium*'la Valencia, Hamlin, Natal ve Pera portakal çeşitlerinden elde edilen epikotil parçacıklarına aktarılarak, bunlardan mannozlu ortamda büyüeyebilen transgenik portakal bitkileri elde edilmiştir. Bu yolla farklı portakal çeşitlerinden transgenik bitkiler üretilerek antibiyotiklere dayanıklılık genleri kullanılmadan da transgenik turunçgil bitkilerinin üretilebileceği gösterilmiştir (Boscariol ve ark. 2003).

Yukarıda belirtilen yöntemlerin geliştirilmesiyle, turunçgillerde genetik mühendisliği uygulamaları yaygınlaşmaya başlamış ve birçok gen farklı turunçgil türlerine aktarılmıştır. Turunçgillerde gen aktarımı yoluyla yapılan genetik mühendisliği uygulamaları, turunçgil yetiştiriciliğinde karşılaşılan önemli problemlere çözüm bulmak amacıyla yapılmaktadır. Bunların başında biyotik ve abiyotik etmenlere karşı dayanıklılık ve tolerans, meyve kalitesinin artırılması gibi ana konular yer almaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar aşağıda özetlenerek, turunçgillerde genetik mühendisliği uygulamalarının şu andaki konumu ve gelecekteki yönü tartışılacaktır.

#### **Hastalık ve Zararlılara Karşı Dayanıklılık Geliştirilmesi**

Citrus tristeza virüsü dünyada ülkemizin de dahil olduğu tüm turunçgil bölgelerinde bulunan ve bazı bölgelerde çok önemli ekonomik kayıplara yol açan ve turunçgil yetiştiriciliğini sınırlayan hastalıkların başında gelmektedir. Citrus tristeza virüsünün moleküler düzeyde karakterize edilmesi ve turunçgillere gen aktarımı yapan transformasyon yöntemlerinin geliştirilmesiyle, genetik mühendisliği uygulamaları, CTV'ne karşı dayanıklılığın geliştirilmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Diğer bitkilerde farklı virüslere karşı başarıyla kullanılan "etmeden elde edilen dayanıklılık" (pathogen-derived resistance) yöntemi, turunçgil türlerinde CTV gibi önemli bir virüse karşı dayanıklılığın geliştirilmesinde en etkin yöntemlerden biri olarak görülmektedir. Bu amaçla, ilk olarak CTV'nün kılıf protein geni (coat protein, CP), *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon yöntemiyle turunç ve layma aktararak, az sayıda da olsa virüs geni taşıyan ilk transgenik bitkiler elde edilmiştir (Gutierrez ve ark. 1997). Daha sonra, CTV CP geni, benzer yöntemle turunç ve Meksika laymına aktararak, daha fazla sayıda transgenik bitkiler elde edilmiştir (Dominguez ve ark.

2000, Ghorbel ve ark. 2000). Bunu takiben CTV'nün farklı ırklarından elde edilen ve protein kodlayan ve kodlayamayan kılıf protein genleri CTV'üne karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla, üretim açısından önemli birçok turunçgil türüne aktarılmıştır (Yang ve ark. 2000, Febres ve ark. 2003). Ancak bu çalışmaların birçoğunun sonucunda elde edilen transgenik bitkilerin virüse karşı dayanıklılık oluşturup oluşturamadıkları henüz belirlenemediği için CTV'ne karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla, farklı CTV genleri ve genom bölgeleri turunçgil türlerine aktarılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda küçük kılıf protein geni (p27, mCP), p20 replikaz enzimini kodlayan gen yanında, 3' UTR bölgesi de Duncan altıntop çeşidine aktararak, çok sayıda transgenik bitki üretimi sağlanmıştır. Bu bitkilerden bazıları aşılama yoluyla CTV'üyle enfekte edilerek, virüse karşı dayanıklılıkları test edilmiştir. Ancak transgenik bitkilerde virüs titerinin (yoğunluğunun) kontrol bitkilerine göre biraz daha düşük olduğunun belirlenmesine rağmen, virüse karşı tam bir dayanıklılık göstermedikleri tespit edilmiştir (Febres ve ark. 2003). Bunun yanında CTV'üne karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla, p23 geninin protein sentezleyen ve sentezleyemeyen iki farklı formu Meksika laymına aktararak, transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bu bitkilerden p23 genini taşıyanlar, CTV'nün Meksika laymında oluşturduğu belirtileri oluşturarak, dayanıklılığı sağlamak yerine hastalıklı bitkiler oluşturmuştur. Ancak protein sentezlemeyen p23 genini taşıyan transgenik bitkilerde böyle belirtiler gözlenmemekle birlikte bunların virüse karşı dayanıklılık gösterip göstermedikleri henüz tespit edilmemiştir (Ghorbel ve ark. 2001). Diğer bitkilerde virüslere karşı dayanıklılık geliştirmekte başarıyla kullanılan replikaza dayalı dayanıklılık yöntemini turunçgillerde denemek amacıyla, CTV'ünün RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geninin normal, protein sentezleyemeyen (untranslatable), ters (antisens) ve mutasyona uğratılmış formları

*Agrobacterium*'la Duncan altıntop çeşidine aktararak çok sayıda transgenik bitkiler elde edilmiştir (Çevik ve ark. 2000, Çevik 2001, Çevik ve ark. 2006). Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu transgenik bitkiler, henüz CTV'üne dayanıklılık açısından test edilmemiştir. Şu ana kadar birçok turuncğil türünde çok sayıda CTV'üne dayanıklı olabilecek transgenik bitki üretilmesine rağmen, bunların dayanıklı olup olmadıkları tam olarak test edilmemiştir. Bunun en önemli nedeni, CTV'üne mekanik inokülasyonun etkin olmaması ve virüsün sadece aşılama veya yaprak bitleriyle taşınmasıdır. Şimdiye kadar yapılan sınırlı dayanıklılık testleri, transgenik bitkilere CTV'üyle bulaşık aşı gözü aşılanarak yapılmış ve herhangi bir dayanıklılık gözlenmemiştir. Ancak bu yöntem, bitkiye bir anda aşırı virüs yüklemesi yaptığı ve genellikle transgenik bitkiler transgenik olmayan bir anaç üzerine aşılandığı için dayanıklılığın test edilmesinde uygun bir yöntem değildir. Bu nedenle transgenik turuncğil bitkilerinin CTV'üne karşı dayanıklılığının tespiti için virüsün doğal taşınma yolu olan yaprak bitleriyle inokülasyon yöntemiyle yapılmasını sağlayacak etkin bir yöntem geliştirme çalışmaları halen devam etmektedir.

Yapay diyetlerle yapılan biyolojik testler spesifik olarak mannoza bağlanan kardelen *Galanthus nivalis* lesitinini (GNA)'de içeren lesitinlerin yaprak bitlerinin gelişmesini, yaşama oranı ve verimliliğini (doğurtkanlığı) azaltmakta etkili olduğu belirlenmiştir (Rahbe ve Febvay 1993; Sauvion ve ark. 1996). GNA lesitininin farklı izoformlarını kodlayan genler izole edilerek (Van Damme ve ark. 1991) ve yaprak bitlerine karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla, bitkilere aktarılmış ve elde edilen transgenik bitkilerin bazı yaprak bitlerine karşı dayanıklılık gösterdiği bulunmuştur (Gatehouse ve ark. 1997; Rao ve ark. 1998). CTV'de doğada birkaç yaprak bitiyle taşındığından dolayı GNA geni ekonomik açıdan önemli turuncğillerden biri olan Ruby

Red altıntop çeşidine *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon yöntemi kullanılarak aktarılmıştır (Yang ve ark. 2000). Transgenik altıntop bitkilerinin yaprak bitlerine dayanıklılığı henüz test edilip yayınlanmamış olsa da, tütün ve patatesten elde edilen sonuçlar bu genin yaprak bitlerinin büyüme, gelişme ve verimliliklerinin azaltılması üzerine etkide bulunduğu belirlenmesi, turuncğillerde de yaprak bitlerine karşı dayanıklılığın geliştirebileceğini göstermektedir.

Citrus blight (CB) özellikle nemli turuncğil üretim alanlarında yaygın olarak görülen ve etmeni bilinmeyen bir hastalıktır (Derrick ve Timmer 2000). Hastalıklı bitkilerde yapılan çalışmalarda p12 adı verilen ve ekpensis türünden bir proteinin sadece CB'lı bitkilerde biriktiği belirlenmiştir (Derrick ve ark. 1990). Bu proteinin bitki tarafından hastalık veya etmenine karşı üretildiği sanılmakta olup, bu proteini kodlayan gen izole edilmiştir (Ceccardi ve ark. 1998). Bu proteinin CB hastalığıyla ilgisini ve CB'ye karşı dayanıklılık sağlayıp sağlamadığını belirlemek amacıyla, p12 geni *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon yöntemiyle önemli bir anaç olan Carizzo Citrange'ine aktararak, transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Kayım ve ark. 2004). Bu transgenik bitkilerin p12 genini taşıdıkları ve p12 proteinini çok miktarda ürettiklerinin belirlenmesine rağmen, CB hastalığına karşı dayanıklı olup olmadıkları henüz belirlenmemiştir.

### **Abiyotik Streslere Karşı Dayanıklılık Geliştirilmesi**

Turuncğillerde genetik mühendisliği uygulamalarının yapılmasının diğer bir nedeni de turuncğil çeşitlerinde abiyotik streslere karşı dayanıklılığı arttırarak, çevresel streslere daha toleranslı çeşitler elde etmektir. Bu amaçla farklı organizmalarda çevresel streslere dayanıklılık sağlayan genler klonlanarak, turuncğillere aktarılıp, söz konusu streslere dayanıklılık geliştirilmeye çalışılmış ve günümüzde de bu çalışmalar

devam etmektedir. Öncelikle mayadan izole edilen ve mayaların tuza dayanıklı olmasını sağlayan halotolerans geni, HAL2, Carrizo Citrange'a aktarılarak, turunçgillerin tuza karşı toleransı artırılmaya çalışılmıştır (Cervera ve ark. 2000). Yine başka bir çalışmada etilen biyosentezinde önemli bir enzim olan ACC oksidazını kodlayan ve portakallarda soğuk sırasında etkinliği artan ACC oksidaz geninin ters (antisense) hali *P. trifoliata*, Carrizo ve portakala aktararak, normal koşullarda ve soğuk sırasında bu genin ekspresyonu incelenerek, turunçgillerde soğuğa karşı dayanıklılıkta ve etilenle ilgili diğer olaylar üzerine etkileri araştırılmıştır (Wong ve ark. 2001). Ayrıca *Arabidopsis*'te soğuğa dayanıklılık genlerinin ekspresyonunu düzenleyen CBF transkripsiyon faktörü greylarda aktararak, turunçgillerde soğuğa dayanıklılığın artırılması amacıyla kullanılmıştır (Champ 2004). Bitki hücrelerinde osmotik ayarlama önemli moleküllerden biri olan prolin amino asidi sentezindeki en önemli enzim olan D-1-pirrolin-5-karbokilat sintetazı (D-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) kodlayan gen Carrizo Citrange'ine aktararak, turunçgillerde prolin miktarı artırılarak, abiyotik streslere karşı tolerans artırılmaya çalışılmıştır (Molinari ve ark. 2004). Bu çalışmalar sonucunda, abiyotik streslere karşı dayanıklı bir çeşit henüz geliştirilmemiş olmakla birlikte, genetik mühendisliği uygulamalarının bu alanda etkin bir şekilde kullanılabilmesinin gösterilmesi açısından önemlidir. Turunçgillerde genetik mühendisliği yoluyla abiyotik streslere dayanıklılığın artırılması, bu amaçla kullanılacak genlerin bulunabilirliğine bağlıdır. Model bitki *Arabidopsis*'te ve diğer bazı otsu kültür bitkilerinde soğuğa karşı dayanıklılıkta rol oynayan çok sayıda gen belirlenmesine rağmen odunsu bitkilerde ve turunçgillerde bu genlerin sayısı çok sınırlı kalmakta ve soğuğa dayanıklılık mekanizmasının anlaşılması konusunda pek az çalışma yapılmıştır. Bu durumu ortadan kaldırmak

amacıyla turunçgillerin yakın akrabası ve soğuğa karşı dayanıklı olan *P. trifoliata*'da kapsamlı gen ekspresyon çalışması yapılarak, soğuk sırasında aktif hale gelen 100'e yakın gen belirlenmiş (Şahin-Çevik 2003; Şahin-Çevik and Moore 2006a) ve bunların bazılarının karakterizasyonları yapılmıştır (Şahin-Çevik and Moore 2006b; Şahin-Çevik and Moore 2006c). Bu genlerin *Poncirus* ve *Citrus*'ta farklı düzeylerde ekspresyon gösterdiği tespit edilmiş olup genlerin ekspresyonları turunçgillerde soğuğa karşı dayanıklılığın geliştirilmesi amacıyla kullanılması mümkündür ((Şahin-Çevik and Moore 2006a; Şahin-Çevik and Moore 2006b; Şahin-Çevik and Moore 2006c).

#### **Meyve Kalitesinin Artırılması**

Turunçgillerde meyve kalitesini ve hasat sonrası saklanma süresini artırmak amacı ile de bazı genetik mühendisliği uygulamaları yapılmaya başlanmıştır. Meyve kalitesini artırmak amacıyla yapılan çalışmaların sayısı sınırlı olup daha çok karotenoid ve flavanoid biyosentezinde değişiklik yapmaya yöneliktir. Karotenoidlerin fotosentetik organizmalarda fotosentez aparatının önemli bir parçasını oluşturmasının yanında hücrede birçok farklı görevleri de vardır. Bazı bitkilerde karotenoidler meyve ve çiçeklerdeki kromoplastta birikerek parlak sarı, turuncu ve kırmızı renkleri oluşturarak çiçek ve meyvelerin albenisini artırır. Bazı karotenoidler ise bitkilerde absisik asidin öncül maddeleri olup, bu hormonun sentezlenmesini sağlarlar. Bazıları ise insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir role sahip olan ve bazı kanser türlerinin riskini azaltan vitamin A'nın öncül molekülleri olup, bu vitaminin sentezinde görev alırlar (Rock ve Zeevaart 1991). En fazla sayıda karotenoid içeren meyve grubu olan turunçgiller, tam bir karotenoid kaynağıdır. Ancak turunçgillerde karotenoidlerin konsantrasyonu ve yapısı tür ve çeşit yanında yetiştirme koşullarına göre de büyük farklılıklar göstermektedir (Gross 1987).

Karotenoid biyosentezinde rol oynayan önemli enzimleri kodlayan genler aralarında mandarin, limon, portakal (Kato ve ark. 2004) ve altıntop (Costa ve ark. 2002) gibi turuncğil türlerinden izole edilerek klonlanmıştır. Bunların bazıları *A. tumefaciens* aracılığıyla bitkiye aktarılarak turuncğillerde karotenoid biyosentezinde değişiklikler yapmak amacıyla kullanılmıştır (Costa ve ark. 2002).

Flavonoidler doğal olarak oluşan aromatik maddelerdir veya ikincil bitki metabolitleridir. Flavonoidlerin turuncğillerin tadında etkili olmasının yanında kemiklerin sağlıklı gelişiminde (Chiba ve ark. 2003), kalp ve kanser hastalıklarının önlenmesinde (Middleton ve ark. 2000; Manthey ve ark. 2001, Silalahi 2002, Manthey and Guthrie 2002) ve anti-mikrobia (Kim ve ark. 2001) madde olarak da önemlidirler. Flavonoidlerin bir alt grubunu oluşturan flavonane glikoosidler altıntop ve diğer turuncğillerde acılık tadından sorumludurlar (Horowitz 1986). Turuncğil türlerinde meydana gelen bu acılık flavonane biyosentezinde yer alan enzimler üzerinde genetik mühendisliği uygulamaları yapılarak giderilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla çalkone sintaz (chalcone synthase, CHS) ve çalkon izomeraz (chalcone isomerase, CHI) genleri izole edilerek, bunların düz (sense) ve ters (antisense) formları altıntop bitkisine aktararak, acılığa neden olan maddenin etkisi azaltılmaya çalışılmıştır (Koca 2004). Yine flavonane biyosentezinde yer alan ve acılığa neden olan son maddenin sentezlenmesinde görev alan 1,2 rhamnosyl transferase (1,2 RT) geni, şadok (*Citrus grandis* L. Osbeck) bitkisinden izole edilerek (Frydman ve ark. 2004) bu genin düz ve saç tokası şeklinde ikincil yapı oluşturan formu bitkide çift sarmal RNA (RNAi) üreterek, hedef genin ekspresyonunun engellenmesi için altıntop bitkisine transfer edilmiştir (Koca 2005). Yapılan bu genetik transformasyonların sonucunda altıntopta acılığa sebep olan naringin maddesi düşük olan birkaç transgenik bitki elde edilmiştir (Koca 2005).

Etilen bitkilerde çevresel streslere tepki, absisyon ve degrening gibi birçok önemli fizyolojik olayda rol oynayan bir hormondur. Bu nedenle çevresel streslere dayanıklılık ve hasat sonrası meyve kalitesini artırmak amacıyla etilen biyosentezi kontrol edilebilir. Etilen sentezinde önemli rolleri bulunan 1-aminociclopropan-1-karboksilat oksidaz (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oksidase, ACC oksidase) ve ACC sintaz (ACC synthase) enzimlerini kodlayan genler, aralarında turuncğillerinde bulunduğu birçok bitkiden klonlanmıştır. Bu iki genin bitkideki ekspresyonunu azaltarak, absisyon ve sararma işlemlerini yavaşlatarak veya engelleyerek, turuncğillerin ağaç üzerindeki saklanma sürelerini artırıp, hasat sonrası saklanma süreleri kısıtlanabilir. Bu amaçla ACC sintaz geninin ters formu *P. trifoliata*, carrizo ve portakala aktarılarak normal koşullarda ve soğuk sırasında bu genin ekspresyonu incelenerek, turuncğillerde absisyon ve sararmanın engellenmesi ve etilenle ilgili diğer olaylar üzerine etkilerini araştırmak amacıyla transgenik bitkiler elde edilmiştir (Wong ve ark. 2001).

Çekirdeksizlik özellikle sofralık turuncğillerde aranan bir özellik olup çeşitli yöntemlerle çekirdeksiz meyveler geliştirilebilir. Klasik çaprazlama, mutasyon ve seleksiyon yapılarak, triploid oluşturma ve çiçek tozu kısırlığı, çekirdeksiz meyve üretiminde yaygın olarak kullanılan metotlardır. Satsuma mandarini (*C. unshiu* Marc.) ve Navel portakalında çekirdeksizliğin nedeni olan çiçek tozu kısırlığı çekirdeksiz meyve üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle erkek kısırlığının ve partenokarpik özelliklerin genetik transformasyon yoluyla çekirdekli çeşitlere aktarılmasıyla, çekirdeksiz çeşitlerin geliştirilmesi uygun bir stratejidir. Bu amaçla, *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden elde edilen ve kimerik ribonükleaz (chimeric ribonuclease) enzimini kodlayan barnase geni, genetik transformasyon yoluyla birçok bitkiye aktararak, çekirdeksiz çeşitler geliştirmek için kullanılmıştır. Turuncğillerde



erkek kısırlığına dayalı çiçek tozu kısırlığı yoluyla çekirdeksiz çeşit geliştirmek amacıyla, barnase geni *A. tumefaciens* yoluyla embriyogenik kalluslar kullanılarak, çok iyi ancak çok çekirdekli bir mandarin çeşidi olan Ponkan çeşidine aktararak çekirdeksiz mandarin geliştirilmeye çalışılmıştır (Li ve ark. 2002).

## Sonuç

Genetik mühendisliği birçok bitkide temel büyüme, gelişme ve fizyolojik olayların anlaşılması ve bu olayları kontrol ederek bitkilerin tarımsal yönden önemli özelliklerinin artırılması ve yeni özellikler geliştirilmesi amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar her geçen gün daha da önem kazanmakta olup, uygulanan bitkilerin sayısı da hızla artmaktadır. Son on yılda bitki genetiği ve moleküler biyolojisi alanında yaşanan hızlı gelişmeler sonucunda ortaya çıkan bilgi birikiminin tarımsal üretimi geliştirmekte kullanılması, genetik mühendisliği uygulamalarının yaygın olarak kullanılmasına bağlıdır. Bu nedenle ülkemizde de tarımda genetik mühendisliği uygulamalarını sağlayacak altyapının geliştirilmesi ve tarımsal eğitim sistemine entegre edilmesi gerekmektedir.

Genetik mühendisliği uygulamalarının gerektirdiği koşullardan birisi de bitkilere gen aktarılmasına olanak sağlayan etkin transformasyon yöntemlerinin bulunmasıdır. Buda bitki doku kültürü ve genetik transformasyon alanında yapılacak çalışmalarla ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde birçok bitkide doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Ancak bu alanda yapılan çalışmalar daha çok doku kültürü yöntemlerinin bitkilerin *in-vitro* çoğaltılmasında ve virüsten ari bitki elde edilmesi alanlarında yoğunlaşmaktadır. Yapılan bitki doku kültürü çalışmaları gen aktarımı ve genetik transformasyon alanlarına da yönlendirilerek, ülkemiz açısından önemli bitki tür ve çeşitleri için genetik mühendisliği uygulamalarında kullanılacak genetik

transformasyon yöntemlerinin geliştirilmesi için de amaçlanmalıdır. Turunçgillerde birçok transformasyon yöntemi geliştirilmiş bulunmaktadır. Bu yöntemler daha çok yöntemin geliştirildiği ülke veya bölge açısından önemli tür ve çeşitler için sınırlı kalmakta ve bunlar üzerinde geliştirilen transformasyon ve rejenarasyon sistemleri tür ve çeşide bağlı olarak bazı değişiklikler gerektirmektedir. Geliştirilen bu transformasyon yöntemlerinin ülkemiz açısından önemli ve yaygın olarak kullanılan turunçgil anaç ve kalemlerine uyarlanmalı veya bunlar için kullanılacak daha uygun yöntemler geliştirilmelidir. Bu amaca uygun çalışmalar başlatılmış olup ülkemizin önemli bir limon çeşidi olan Kütdiken limonunda genetik transformasyon yapılarak, transformasyonda etkili faktörler belirlenmeye çalışılmıştır (Kayım, 1997). Genetik mühendisliği uygulamalarının ikinci gereksinimi ise istenilen özelliklerde gen veya genlerin ve bu genlerin sağlanacağı kaynakların bulunmasıdır. Bu amaçla, ülkemiz gen kaynaklarının moleküler düzeyde belirlenmesi ve gerekli genlerin izolasyonu ve karakterizasyonunda çalışmaların yapılıp, genetik mühendisliği uygulamalarında kullanılacak genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

## Kaynaklar

- Almeida, W.A.B, Mourão-Filho, F.A.A., Pino, L.E., Boscariol, R.L., Rodríguez A.P.M., Mendes, B.M.J. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science* 164: 203–211.
- Bond, J.E. and Roose, M.L. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep.* 18: 229–234.
- Boscariol R. L., Almeida, W.A.B., Derbyshire, M.T.V.C., Mourao-Filho, F.A.A. and Mendes, B.M.J. 2003. The use

- of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep.* 22:122–128.
- Ceccardi, T.L., Barthe, G.A. and Derrick, K.S. 1998. A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Mol. Biol.* 38: 775–783.
- Cervera, M., Ortega C., Navarro, A., Navarro, L. and Pena, L. 2000. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-tosality gene HAL2 from yeast, *J. Hort. Sci. Biotech.* 75 26–30.
- Cervera, M., Pina, J.A., Juarez, J., Navarro, L. and Pena, L. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 18: 271–278.
- Cevik, B., Lee, R.F., Moore, G.A. and Niblett, C.L. 2000. Genetic Transformation of *Citrus paradisi* with the RNA-Dependent RNA Polymerase Gene of Citrus Tristeza Closterovirus. In: Proceedings of the 9th International Citrus Congress. (Ed.:L. G. Albrigo), Vol. 1, CREC-UF/IFAS, Lake Alfred, pp. 205.
- Cevik, B. 2001. Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase gene of citrus tristeza closterovirus. Ph.D Thesis. University of Florida, Gainesville, Florida, 138 pp.
- Cevik, B., Lee, R.F. and Niblett, C.L. 2006. Genetic Transformation of *Citrus paradisi* with antisense and untranslatable constructs of the RNA-Dependent RNA Polymerase Gene of Citrus Tristeza Closterovirus. *T. J. Agric. Forest.* In press.
- Champ, K. 2004. Isolation and characterization of components of low temperature-induced signal transduction pathways in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and *Citrus paradisi* Macf. . Ph.D Thesis. University of Florida, Gainesville, Florida, 125 pp.
- Chávez-Vela, N.A., Lucía, I., Chávez-Ortiz, E. And Pérez-Molphe B. 2003. Genetic transformation of sour orange using *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia.* 37: 629-639.
- Chiba, H., Uehara, M., Wu, J., Wang, X., Masuyama, R., Suzuki, K., Kanazawa, K. and Ishimi, Y. 2003. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J. Nutr.* 133:1892–1897.
- Costa, M.G.C., Otoni, W.C. and Moore, G.A. 2002. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 21: 365–373.
- Derrick, K.S., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Timmer, L.W., Hewitt, B.G. and Barthe, G.A. 1990. Proteins associated with citrus blight. *Plant Dis.* 74:168–170.
- Derrick, K.S. and Timmer, L.W. 2000. Citrus blight and other diseases of recalcitrant etiology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:181–201.
- Dominguez, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P. and Peña L. 2000. Efficient production of citrus transgenic plants expressing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. *Plant Cell Rep.* 19: 427–433.
- Febres, V.J., Niblett, C.L., Lee, R.F. and Moore, G.A. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Rep.* 21:421–428.
- Frydman, A., Weisshaus, O., Bar-Peled, M., Huhman, D.V., Sumner, L.W., Marin, FR., Lewinsohn, E., Fluhr, R., Gressel, J. and Eyal, Y. 2004. Citrus fruit bitter flavors: Isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *The Plant Journal* 40: 88–100.
- Gmitter, F.G.J., Grosser, J.W., and Moore, G.A. 1992 *Citrus*. (ed.): Hammerschlag, F.A., and Litz, R.E. Biotechnology in

- agriculture, vol 8. CAB International. pp 335-336, Wallingford, Oxford.
- Ghorbel, R., Dominguez, A., Navarro, L. and Peña, L. 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange *Citrus aurantium* L. and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. *Tree Physiol.* 20: 1183–1189.
- Ghorbel, R., Lopez, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R. and Peña L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus Tristeza Virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Mol. Plant Pathol.* 2: 27–36.
- Gross, J. 1987. Carotenoids: Pigments in Fruits. Academic Press, London.
- Gutierrez M.A., Luth, E.D. and 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 Rep.* 16:745–753
- Harborne, J. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Alan R. Liss. pp. 163–175, New York.
- Hidaka, T., Omura, M., Ugaki, M., Tomiyama, M., Kato, A., Ohshima, M. and Motoyoshi, F., 1990. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Citrus* from suspension cells. *Jpn. J. Breed.* 40, 199–207.
- Hidaka, T. and Omura, M. 1993. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 62:371–376.
- Horowitz, R.M. 1986. Taste effects of flavonoids. (ed.): Cody, V., Middleton, E. Jr. and
- Kaneyoshi, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N. and Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), *Plant Cell Rep.* 13: 541–545.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. and Masamichi, Y. 2004. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol.* 134: 824–837.
- Kayım, M. 1997. Genetic transformation of Kutdiken lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f] variety and regeneration of transgenic plants. PhD thesis, University of Cukurova, Adana.
- Kayım, M., Grosser, J.W., Barthe, G.A. and Derrick, K. S. 2003. Shoot regeneration from epicotyl segments of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). In: Proc. Int. Soc. Citrus. Int. Congr. 2000. Int. Soc. Citriculture. Orlando, Fla., p 212.
- Kayım, M., Ceccardi, T.L., Berretta, M.J.G., Barthe, G.A. and Derrick, K.S. 2004. Introduction of a citrus blight-associated gene into Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbc. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by *Agrobacterium*-mediated transformation *Plant Cell Rep.* 23:377–385.
- Kayım, M. and Koç, N.K. 2005. Improved transformation efficiency in citrus by plasmolysis treatment. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14 (1), 15-20.
- Kim, H.K., Jeon, W.K. and Ko, B.S. 2001. Flavanone glycosides from *Citrus junos* and their anti-influenza virus activity. *Planta Med.* 67:548–549.
- Kobayashi, S. and 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.,
- Koca, U. 2005. Manipulation of the flavanoid pathway in citrus. Ph.D Thesis. University of Florida, Gainesville, Florida, 110 pp.
- Li, D.D., Shi, W. and Deng, X.X. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep.* 21:153–156.
- Luth, D. and Moore, G.A. 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

- transformation. *Plant Cell Tiss. Org.* 57: 219–222.
- Manthey, J.A., Grohmann, K. and Guthrie, N. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 8: 135–153.
- Manthey, J.A. and Guthrie, N. 2002. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5837–5843.
- Middleton, Jr.E., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673–751ç
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Bessalho, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite, R.P., Protasio-Pereira, L.P. and Esteves-Vieira, L.G. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science.* 167: 1375–1381.
- Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D. and Cline, K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants, *Plant Cell Rep.* 11: 238–242.
- Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D. and Cline, K. 1993. Transformation in citrus. In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 23, plant protoplasts and genetic engineering IV. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 194–208.
- Peña, L., Cervera, M., Navarro, A., Pina, J.A., Duran-Vila, N. and Navarro, L. 1995a. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14:616–619.
- Peña, L., Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Durán-Vila, N. and Navarro, L. 1995b. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus*. *Plant Sci.* 104:183–191.
- Peña, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A. and Navarro, L. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 16:731–737.
- Pérez-Molphe-Balch, E. and Ochoa-Alejo, N. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant Cell Rep.* 17 :591–596.
- Rahbe, Y. and Febvay, G. 1993. Protein toxicity to aphids: an *in vitro* test on *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol Exp. Appl.* 67: 149–160.
- Rock, C.D. and Zeevaart, J.A.D. 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7496–7499.
- Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S, Spence, J., Gatehouse, A.M, and Gatehouse J.A. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* 15:469–477.
- Gatehouse, J.A., Gatehouse A, and Fitches, E. 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *J Insect Physiol.* 43:727–739.
- Silalahi, J. 2002. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 11(1),79–84.
- Şahin-Çevik, M. 2003. Identification and Characterization of cold-regulated genes in cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Ph.D Thesis. University of Florida, Gainesville, Florida, 130 pp.
- Sahin-Çevik M, and Moore GA. 2006a. Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

- Plant Mol Biol. 262: 83-97.
- Şahin-Çevik, M. and Moore, G.A. 2006b. Isolation and characterization of a novel RING-H2 finger gene induced in response to cold and drought in the interfertile *Citrus* relative *Poncirus trifoliata*. *Physiologia Plantarum*. 126: 153-161.
- Şahin-Çevik, M. and Moore, G.Aç 2006c. Two AP2 domain containing genes isolated from the cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* are induced in response to cold. *Functional Plant Biology* 33: 863–875
- Sauvion, N., Rahbe, Y., Peumans, W.J., van Damme, E., Gatehouse, J.A. and Gatehouse, A.M.R. 1996. Effects of GNA and other mannosebinding lectins on development and fecundity of the peachpotato aphid. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 285–293.
- Wong, W.S., Li, G.G., Ning, W., Xu, Z.F., Hsiao, W.L.W., Zhang, L.Y. and Li, N. 2001. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by overproduction of antisense1-aminocyclopropa ne-1-carboxylate synthase RNA. *Plant Science* 161: 969–977.
- Van Damme, E.J.M., DeClerq, N., Claessens, F., Hemschoote, K., Peeters, B. and Peumans, W. 1991. Molecular cloning and characterisation of multiple isoforms of the snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. *Planta*. 186: 35–43.
- Vardi, A., Bleichman, S. and Aviv, D. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci.* 69:199–206.
- Yang, Z.N., Ingelbrecht, I.L., Louzada, E., Skaria, M. and Mirkov, T.E. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Rep.* 19:1203-1211.
- Yao, J.L., Wu, J.H., Gleave, A.P. and Morris, B.A.M. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci.* 113; 175–183.