

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ALLIUM SANDRASICUM* 'DA *IN VITRO* KÜLTÜR
OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA ELVER

DENİZLİ, 2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



***ALLIUM SANDRASICUM* 'DA *IN VITRO* KÜLTÜR
OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA ELVER

DENİZLİ, 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

ESRA ELVER tarafından hazırlanan “*ALLIUM SANDRASICUM* ‘DA *IN VITRO* KÜLTÜR OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE EDİLMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.07.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı olarak kabul edilmiştir.

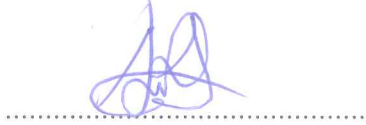
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak
Pamukkale Üniversitesi



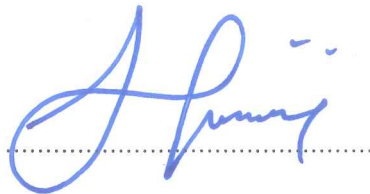
Üye
Prof. Dr. Ali Ramazan Alan
Pamukkale Üniversitesi



Üye
Prof. Dr. Bayram Çevik
Süleyman Demirel Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16/08/2018 tarih ve 33/11.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017FEBE010 nolu proje ile desteklenmiştir

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ESRA ELVER



ÖZET

***ALLIUM SANDRASICUM* 'DA *IN VITRO* KÜLTÜR
OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE
EDİLMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ESRA ELVER
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)
DENİZLİ, 2018**

Çalışmada, Türkiye'nin güneybatı bölgesinde yetişen ve endemik bir tür olan *Allium sandrasicum*'da *in vitro* kültür oluşturulması ve rejenerantların karakterize edilmesi araştırılmıştır. Çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (PAÜ BİYOM) yetiştirilen altı adet *A. sandrasicum* genotipi kullanılmıştır. Kullanılan altı genotipin 2 tanesi farklı sukroz ve bitki büyüme düzenleyici içeren MS ve BDS temelli 15 adet besi yerine ekilmiştir. Kalan dört genotip ise sekiz adet besi yeri kullanılarak kültüre alınmıştır.

Bu çalışmada yaklaşık 20 bin adet açmamış çiçek tomurcuğu kültüre alınmıştır. Altı genotip için kullanılan 15 besi yerinin yedi tanesindeki tomurcuklar somatik ve sekiz tanesindeki tomurcuklar ginogenik uyartıma cevap vermiştir. Kullanılan besi yerlerine ekilen tomurcuklardan alınan cevaplar somatik uyartım için % 0,07 ile % 25,30 arasında değişmekte olup bu oran ginogenik uyartım için % 0,09 ile % 16,7 arasında yer almaktadır. Denemelerde elde edilen sonuçlar *A. sandrasicum*'un ginogenik uyartımı için tomurcukların en iyi cevap verdiği besi yerinin bitki büyüme düzenleyici içermeyen ve 100 g/l sukroz içeren F4 besi yeri (% 2,42) olduğunu göstermiştir. Somatik embriyogenesis için en iyi cevap veren tomurcukların olduğu besi yeri 1 mg/l NAA, 8 mg/l 2İP ve 50 gr/l sukroz içeren F7 besi yeri (% 23,55) olarak belirlenmiştir. *A. sandrasicum*'da ginogenesis için bitki büyüme düzenleyici içermeyen ve yüksek konsantrasyonda sukroz (50 g/l ve 100 g/l) bulunduran besi yerlerinin daha etkili olduğu bulunmuştur.

Elde edilen ginogenik bitkilerin 59 tanesi ve somatik bitkilerin 99 tanesi flow sitometri ile analiz edilmiştir. Ginogenik bitkilerin 32 (% 54,2) tanesi haploid, 16 (% 27,1) tanesi diploid ve 11 (% 18,6) tanesi miksploid olduğu tespit edilmiştir. Somatik bitkilerin 84 tanesi diploid, 12 tanesi tetraploid ve üç tanesi miksploid olarak bulunmuştur.

Flow sitometri analizi yapılan bitkiler dış ortama alıştırılmak 2:1 oranında torf – perlit içeren karışıma dikilerek önce büyüme kabinine konmuş daha sonra seraya transfer edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Allium sandrasicum*, ginogenesis, *in vitro*

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* CULTUR OF *ALLIUM SANDRASICUM* AND CHARACTERIZATION OF REGENERANTS
MSC THESIS
ESRA ELVER
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY
(SUPERVISOR: PROF.DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)
DENİZLİ, 2018

In this thesis, making *in vitro* tissue culture and characterizing regenerants in *Allium sandrasicum* which is one of the endemic species and grown in southwestern part of Turkey was studied. Six *A. sandrasicum* genotypes were grown in Pamukkale University Plant Genetics and Agricultural Biotechnology Application and Research Center (PAU BIYOM) and used in this study. MS and BDS based 15 media containing different concentrations of sucrose and plant growth regulators were used for two of six genotypes. Rest of them (four genotypes) were cultured in eight of these 15 media.

In this study, approximately twenty thousands unopened flower buds were cultured. Seven of 15 media gave a response to somatic induction and eight of those were responsive to gynogenic induction. The ratio of somatic and gynogenic plantlet formation from all six genotypes were from 0.07% to 25.30% and 0.09% to 16.7%, respectively. The results showed that the best responsive media for gynogenesis induction for *A. sandrasicum* is MS-based medium containing 100 gr/l sucrose and no plant growth regulator (F4) with 2.42% ratio. It was resulted that the best responsive medium for somatic embryogenesis is MS-based medium containing 50 gr/l sucrose and 1 mg/L NAA, 8 mg/L 2IP (F7) with 1.30% ratio. It was concluded that media without plant growth regulators and high sucrose concentration (50 g/l and 100 g/l) were more effective for gynogenic induction in *A. sandrasicum*.

DNA content of 59 gynogenic and 99 somatic plants were tested by using flow cytometer. 32 (54.2%), 16 (27.1%) and 11 (18.6%) of tested gynogenic plants were determined as haploid, diploid and mixoploid, respectively. 84 (84.84%) of 99 tested somatic plants were diploid and 12 (12.12%) of them were found as tetraploid. Three (3%) of tested somatic plants were determined as mixoploid.

All plants were planted into small pots filled with peat and perlite (2:1) mixture after ploidy determination. After that, they were put into growth chamber for acclimation process and then transferred into green house for further growth..

KEYWORDS: *Allium sandrasicum*, gynogenesis, *in vitro*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Allium</i> 'ların Genel Özellikleri	2
1.2 Türkiye'deki <i>Allium</i> türleri.....	3
1.3 <i>Allium sandrasicum</i> L.	3
1.4 Haploidizasyon	4
1.4.1 Androgenesis	4
1.4.2 Ginogenesis.....	4
1.4.3 <i>Allium</i> 'larda ginogenesis.....	8
1.5 Ploidi Seviyesinin Tespiti.....	9
2. MATERYAL VE METOT	10
2.1 Bitki materyali	10
2.2 <i>A. sandrasicum</i> büyüme koşulları	10
2.3 <i>A. sandrasicum</i> tomurcuklarının alınması ve sterilizasyonu.....	10
2.4 <i>A. sandrasicum</i> 'un ginogenik ve somatik uyartımı için kullanılan besi yerlerinin içerikleri.....	11
2.5 <i>A. sandrasicum</i> tomurcuklarının kültüre alınması	12
2.6 <i>A. sandrasicum</i> kültürlerinde yapılan gözlemler.....	14
2.7 Ginogenik ve somatik <i>A. sandrasicum</i> bitkiciklerinin büyümeleri....	15
2.8 <i>A. sandrasicum</i> bitkilerinin ploidi seviyelerinin analizi.....	16
2.9 <i>A. sandrasicum</i> bitkilerinin <i>in vivo</i> 'ya transfer edilmesi.....	18
2.10 <i>A. sandrasicum</i> 'da yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizi	19
3. BULGULAR	20
3.1 Ginogenesis Uyartımına Gelen Cevaplar	20
3.2 Somatik Uyartıma Gelen Cevaplar.....	27
3.3 Tomurcuk Boyutunun ve Genotipin Ginogenesis Uyartımına Etkisi.32	
3.4 Çalışma sonucunda elde edilen <i>A. sandrasicum</i> bitkilerinin ploidi seviyeleri	34
3.5 Elde edilen bitkilerde yapılan gözlemler	38
3.6 Dış Ortama Aktarılan Bitkilerdeki Gözlemler	39
4. TARTIŞMA	40
5. KAYNAKLAR.....	45
6. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1: *A. sandrasicum* bitkisine ait tomurcukların kültüre alınma aşamaları. 13
- Şekil 2: *A. sandrasicum*'da ginogenik ve somatik cevaplar 16
- Şekil 3: *A. sandrasicum* bitkisinin flow sitometri ile DNA miktarının ve
ploidi seviyesinin tespiti..... 17
- Şekil 4 : *A. sandrasicum* bitkilerinin dış ortama transferi..... 19
- Şekil 5: *A. sandrasicum* materyallerinin flow sitometri analizi sonucu elde
edilen histogramlar (Ls: *Lactuca sativa*, As: *Allium sandrasicum*)37
- Şekil 6 : Tüplere aktarılan *A. sandrasicum* bitkilerinin farklı kök gelişimleri..38

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: <i>A. sandrasicum</i> uyarımı için kullanan besi yeri içerikleri	12
Tablo 2: Besi yerlerine göre altı genotipe ait ekilen tomurcuklar.....	14
Tablo 3: Genotiplere göre tomurcuk boyutlarını ortalama çapları.....	14
Tablo 4: NIB ^a (Nuclei isolation buffer) içeriği	18
Tablo 5: ASL1 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu.....	24
Tablo 6: ASL2 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu.....	25
Tablo 7: ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu	26
Tablo 8: ASL1 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu.....	29
Tablo 9: ASL2 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu.....	30
Tablo 10: ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu	31
Tablo 11: ASL1 ve ASL2 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki tomurcuk boyutuna göre ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu	34
Tablo 12 : Elde edilen ginogenik bitkilerin farklı <i>A. sandrasicum</i> genotiplerine göre ploidi seviyeleri.....	36
Tablo 13: Elde edilen somatik bitkilerin <i>A. sandrasicum</i> genotiplerine göre ploidi seviyeleri	36
Tablo 14: Dış ortama aktarılan bitkilerin ploidi seviyesine göre boy ve yalancı gövde çap ortalamaları.....	39

SEMBOL LİSTESİ

g/l	: Gram/litre
mg/l	: Miligram/litre
µl	: Mikro litre
mM	: Mili-mol
°C	: Santigrad derece
BAP	: Benzil Amino Purin
NAA	: Naftalen Asetik Asit
2İP	: 2-İzopenten Adenin
2,4-D	: 2,4- Dikloro Fenoksi Asetik Asit
PI	: Propodium iodide

ÖNSÖZ

Endemik bir tür *Allium sandrasicum*'da *in vitro* kültür oluşturulması ve rejenerantların karakterize edilmesi amacıyla bu çalışmayı tez konusu olarak öneren danışman hocam Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak'a, tez çalışması süresince bana gösterdiği sabır ve yaptığı yardımlardan dolayı teşekkür ediyor, sevgi ve saygımı yürekten sunuyorum.

Tezimin jüri üyesi olan Prof. Dr. Ali Ramazan Alan'a da tez boyunca yardım ve desteğini esirgemediği için çok teşekkür ediyorum. Ayrıca yaptığı yardımlardan dolayı da Dr. Öğr. Gör. Arzu Kaska'ya da teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca bana vermiş oldukları destek ve yardımlardan dolayı arkadaşlarım Selda Akgün ve Salim Barış başta olmak üzere tüm PAÜ BİYOM ekibine teşekkür ediyorum. Tezimi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (PAU BAP) Araştırma Fonu'na da ayrıca teşekkür ederim.

Okula başladığım ilk günden beri maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman arkamda olacaklarını hissettiren annem Fadim Aslan, babam Memduh Aslan, ablam Ayşe Şafak, abim Halit Aslan'a ve tanıştığımız andan itibaren eğitimim için beni her zaman destekleyen eşim Barış Elver'e de sonsuz teşekkürlerimi ve sevgimi sunuyorum.

Esra ELVER

1. GİRİŞ

Günümüzde bilimsel ve teknolojik gelişmelerden dolayı ortalama insan ömrü uzamış, dünya nüfusu artmıştır. Tarım alanlarının son sınırlarına ulaşmış olmasından dolayı artan dünya nüfusuna var olan besin üretimi yetersiz kalmış, bu yüzden var olan tarım alanlarından daha fazla verim alabilmek için modern bitki ıslahına başlanmıştır.

Bitki ıslahı, bitkilerin genetik açıdan iyileştirilip geliştirilmesi anlamına gelmektedir. Bitki ıslahının tarihi tarımın başlamasına kadar uzanmaktadır. Yerleşik yaşama geçen insanlar besin ihtiyacını karşılamak için çeşitli bitkileri ekip biçmişlerdir. Her yıl en iyi verimde ve özellikteki bitkilerin tohumları alınıp bir sonraki yıla saklanmıştır. Böylelikle bir anlamda yabancı türlerin günümüzdeki bitkiler haline ulaşmasına katkıda bulunmuşlardır. Bu şekilde ilk ıslah çalışmaları başlamıştır. Bilimsel anlamda ise ıslah çalışmalarının başlangıcı 19. yüzyıla uzanmaktadır. Bu dönemde Charles Darwin tarafından ortaya atılan “seleksiyon” kavramı ve Gregor Mendel tarafından yapılan “melezleme” çalışmaları bilimsel anlamda ıslah çalışmalarının başlamasına katkıda bulunmuştur. Bu sayede bilinçli bir şekilde bitkilere istenilen yeni özellikler kazandırılmaya başlanmıştır.

Bilimsel anlamda yapılan bitki ıslahını klasik ve modern ıslah olarak ikiye ayırabiliriz. Klasik ıslah, melezleme ve seleksiyona dayalıdır. Bu yöntemde süreç tür içi çaprazlama yapıp daha sonra seleksiyon ile istenilen özelliklere sahip bitkiler seçilerek ilerlemektedir. Bu şekilde yapılan ıslah uzun zaman almakta ve her bitki türü için uygulanabilirliği aynı ölçüde verimli olmamaktadır. Ayrıca bitkilerin ekilmesi için büyük alanlar ve fazla miktarda iş gücü gerektiği için maliyeti yüksektir. Bu gibi sorunların üstesinden gelmek için modern ıslah yöntemleri kullanılabilir. Modern ıslahta “biyoteknolojik” yöntemler kullanılmaktadır. Mutasyon ıslahı, protoplast füzyonu, haploidizasyon ve transformasyon biyoteknolojik bitki ıslahında kullanılan yöntemler arasında gösterilebilir.

Allium'larda klasik yöntemleri kullanarak ıslah yapmak zordur. Çünkü *Allium*'lar ikinci yıl çiçeklenen, açık tozlanma eğilimi olan, kendileme depresyonu ve yüksek oranda heterozigotluk gösteren bitkilerdir. Klasik ıslah ile iyi özelliklere sahip hatların üretilmesi çok uzun yıllar alabilir. Ayrıca bu yöntemle tamamen homozigot hatların elde edilmesi mümkün değildir. Bu noktada modern ıslah yöntemlerinden yararlanılabilir.

1.1 *Allium*'ların Genel Özellikleri

Allium cinsi diğer 14 cins ile beraber Amaryllidaceae familyasında yer alır (Chase ve diğ., 2009). *Allium* cinsi yaklaşık 850 türü içinde barındırır (Wheeler ve diğ., 2013) ve bu türlerin büyük bir kısmı Kuzey Yarım Küre'de bulunmaktadır (Fritsch ve Friesen, 2002). Kuzey Yarım Küre'de yer alan *Allium*'ların en büyük payını Orta ve Güney Asya'da yer alan türler oluşturmakta olup ikinci en büyük pay Kuzey Amerika'da yayılım gösterenlere aittir (Friesen ve diğ., 2006). Bunların yanında az sayıda Güney Yarım Küre'de bulunan türleri de vardır (De Sarker ve diğ., 1997).

Allium'lar kullanım alanları olarak çeşitlilik gösterebilir. Bazı türleri gıda sektöründe sebze ve baharat olarak kullanılmakta olup ekonomik açıdan oldukça önemli bitkilerdir. *A. cepa* (baş soğan), *A. ampeloprasum* (pırasa), *A. sativum* (sarımsak) ve *A. schoenoprasum* (çayır soğanı) en yaygın yenilebilir *Allium* türleri arasında yer almaktadır (Nguyen ve diğ., 2008). *Allium*'ların birçok çeşidi bahçelerde, fiçılarda, kesme çiçekler, kuru çiçekler veya saksı bitkileri olarak dünya çapında kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitkiler tıbbi ve aromatik bitkiler olarak da kullanılmaktadır (De Hertogh and Le Nard, 1993; Bijl, 1995; Kamenetsky and Fritsch, 2002).

Allium cinsi içerisinde yer alan türler çok yıllık otsu bitkilerdir. Soğanları zarlı yapıdadır. Toprak altında yer alan kısımlarını baş ve kökler oluşturur iken toprak üstü kısımlarını yapraklar, çiçekler, stamenler ve brakteler oluşturmaktadır. Çiçekleri sapın uç kısmında şemsiye şeklindedir. Tepalleri tek halka ya da iç içe geçmiş birbirinden bağımsız iki veya üç halka şeklinde sıralanmıştır. Stamenleri de tepaller ile benzer dizilime sahip olup bazıları dip kısımda birleşmiştir.

Ovaryum üç bölmeli yapıya sahiptir ve her bir bölme iki ya da üç ovul içerir. Tohumları siyah renkte olup köşeli veya yuvarlak yapıya sahip olabilirler (Fritsch ve Friesen, 2002; Kaska, 2013).

1.2 Türkiye'deki *Allium* türleri

Türkiye coğrafik konumu, çeşitlilik gösteren iklimleri, farklı toprak yapısı ve jeolojik özelliklerinden dolayı çok sayıda bitki çeşidine ev sahipliği yapmaktadır. Bu bitki topluluğu içinde en fazla türü barındıran gruplardan biri de *Allium* cinsi bitkilerdir. Türkiye'deki *Allium*'lar ~170 türden oluşur ve bu türlerin ~70 adedi endemiktir (Özhatay, 2000; Güner, 2012). Antalya hem geniş bitki florası hem de endemik türler açısından oldukça zengin bir bölgedir. Avrupa'daki toplam endemik bitki sayısı ~2750 iken Antalya'da ~600 adet endemik bitki türü bulunmaktadır (Ekim ve diğ., 2000; Altan, 2000). Bu endemik türlerden birisi de *A. sandrasicum* L.'dir.

1.3 *Allium sandrasicum* L.

A. sandrasicum L. Türkiye'nin güneybatı bölgesinde yetişen bir *Allium* endemik türüdür. Diploid kromozom sayısına sahiptir ($2n=2x=16$) (Özhatay, 2002). Haziran ayında çiçeklenmesi başlar ve birçok tohum üretebilir. Bu bitkinin yaprakları ve yalancı gövdeleri yetiştiği coğrafyada hem çiğ olarak hem de pişirilerek tüketilmektedir. *Allium*'ların botanik, taksonomik, ve ekolojik özellikleri ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. *A. sandrasicum* ile ilgili yayınlanmış az sayıda yayın mevcuttur. Son olarak *A. sandrasicum* 'da ekim yapılmadan önce soğuk tedavilerinin büyüme ve çiçeklenme üzerindeki etkilerini belirleme çalışmaları yapılmıştır (Karagüzel ve Baktir, 2011). Fakat bu türün ıslahı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. *Allium* çeşitlerinin ıslah sürecini kısaltacak biyoteknolojik yöntemlerden ginogenesis yolu ile endemik hatlarının geliştirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik açıdan önemli kazanımlar sağlayacaktır. Bu çalışmada ülkemizde endemik olan *Allium sandrasicum* L.

hatlarından elde edilecek olan ginogenik bitkilerin özelliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.4 Haploidizasyon

Somatik hücrelerinde gametik hücrelerindeki kadar kromozom bulunduran bitkilere haploid bitkiler denir (Chen ve diğ., 2011). Farklı metodlar kullanarak gametik hücrelerden haploid bitki elde etme sürecine ise haploidizasyon denir. Bazı bitkilerde kendiliğinden haploidizasyon olduğu gözlenmiştir fakat bu oran oldukça düşüktür. Blakeslee ve diğ. (1922) tarafından yapılan çalışmada da kendiliğinden haploid *Datura stramonium* bitkisi elde edilmiştir. Kasha (1974) 100'den fazla angiospermde kendiliğinden haploidizasyon olduğunu belirtmiştir. Ayrıca şeftali, kayısı, erik ve armut gibi bazı meyve ağaçlarında kendiliğinden haploidizasyon olduğu gözlenmiştir (Zhang ve diğ., 1990). Kendiliğinden haploid bitki elde etme oranı çok düşük olduğu için bilim insanları uyartılmış haploidizasyona yönelmiştir. Bu sayede hem kontrollü bir şekilde hem de sayıca fazla haploid bitkiler elde etmeyi amaçlamışlardır. Androgenesis ve ginogenesis bu amaçla kullanılan tekniklerden bazılarıdır.

1.4.1 Androgenesis

Androgenesis, *in vitro*'da mikrospor veya anter kullanılarak yapılan haploidizasyon yöntemidir. 1922'de doğal haploidlerin bulunmasından yaklaşık 40 yıl sonra Guha ve Maheswari (1964) anter kültürü yaparak *Datura innoxia*'dan haploid bitkiler üretmişlerdir. İlerleyen süreçlerde arpa, tütün, buğdayın da içinde bulunduğu birçok bitki türünde erkek gamet temelli embriyogenez (androgenesis) çalışmaları yapılmıştır (Forster ve diğ., 2007).

1.4.2 Ginogenesis

Ginogenesis de androgenesis gibi bir haploidizasyon yöntemidir. Döllenenmemiş ovül ya da ovaryumdan *in vitro*'da haploid bitki elde etme sürecine

ginogenesis denir. Androgenesis ile haploid bitki elde etmenin başarısız olduğu bitkilerde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir (Atanassov ve diğ., 1995). Bu yöntem ilk olarak 1976'da arpada dölllenmemiş yumurta kullanılarak yapılan çalışma ile geliştirilmiştir (San Noeum, 1976). Bugüne kadar ginogenesis ile ilgili arpa dışında da birçok bitkide çalışmalar yapılmıştır. Hosemans and Bossoutrot (1983) şeker kamışı üzerinde yaptıkları çalışmada erkek steril bitkilerin ovüllerini kültüre alarak haploid bitkiler elde etmişlerdir. Van Geyt ve diğ. (1987) yaptıkları çalışmada ise şeker kamışında ginogenesis ile haploid bitki elde etme sürecini bir adım daha ileri taşıyarak sadece erkek steril değil aynı zamanda erkek fertil şeker kamışının ovül ve ovaryumunu kullanarak haploid bitkiler elde etmişlerdir. Castillo & Cistue (1993) yayımlanan çalışmalarında arpada (*Hordeum vulgare* L.) dölllenmemiş ovaryum kültürü kullanarak haploid bitkiler elde etmeyi başarmışlardır. Shalaby (2007) kabakta ginogenesisi uygulamış ve başarılı olmuştur. Ginogenesis uyartımına olumlu cevap veren bir başka bitki de soğandır (Muren, 1989; Bohanec ve diğ., 1995; Alan ve diğ., 2004).

Ginogenesis uyartımı sonucu bitki elde etmeyi etkileyen faktörler vardır. Bu faktörler arasında donör bitkinin genotipi, ovüllerin gelişim aşaması, donör bitkiye uygulanan ön uygulamalar, besiyerinin içeriği ve bitki büyüme düzenleyicileri (Plant Growth Regulators – PGR) en etkili olanlarıdır (Chen ve diğ., 2011).

Donör bitkinin çeşidi, büyüme koşulları ve niteliği ginogenesisise cevap verme oranını etkilemektedir. Gioffriau ve diğ. (1997) soğanda genotip ile ginogenesis arasında bir bağ olduğu göstermişlerdir. F1 hibridleri ve yakın akraba melezlenmesi sonucu elde edilen donör bitkilerden açık tozlanan donör bitkilere oranla daha yüksek oranda haploid bitki elde edildiği ifade edilmiştir. Bu sonuç yapılan başka araştırmalarla da desteklenmiştir (Alan, 2004). Bohanec ve Jakse (1999) tarafından yapılan çalışmada Amerika'dan elde edilen bitkilerin Avrupa ve Japonya'dan gelenlere göre ginogenesis uyartımına çok daha iyi cevap verdiği tespit edilmiştir. Farklı coğrafyalardan elde edilen genotiplerin farklı oranlarda haploid bitki vermesi de genotipin bu uygulamadaki etkisini açıkça göstermektedir. Ayrıca yapılan birçok çalışmada bitki türünün ginogenesisise ya da androgenesise cevap vermeyi etkilediği gözlemlenmiştir. Keller (1990) yaklaşık

100 bin anter ve 25 farklı besi yeri kullanarak yaptığı çalışmada androgenik bitki elde edememiştir. Bir başka çalışmada da Shalaby (2006, 2007) kabakta anter kültürünün cevap verdiği besi yeri içeriğini kullanarak ovaryum kültürü yapmayı denemiş fakat cevap alamamıştır. Başka türlerde de benzer durumlarla karşılaşmıştır. Aynı şartlar altında kültüre alınan *Nicotiana tabacum* ovaryumlarının *N. rustica*'ya ait olan ovaryumlardan yaklaşık 10 kat daha fazla embriyo oluşturduğu tespit edilmiştir (Wu ve Chen, 1982). Tüm bu çalışmalar ve sonuçlar göz önüne alındığında donör bitki seçimi ginogenesis uyartım başarısında oldukça etkilidir.

Ovüllerin kültüre alınırken buldukları gelişim aşaması *in vitro*'da, dişi gametten haploid bitki eldesi uygulamalarında sonucu etkilemektedir. Ovüllerin gelişim aşamasının cevap verme oranına etkisi bir bitki türünden diğer bitki türüne göre değişmekle birlikte, genel olarak ele alındığında en iyi sonuçların olgunlaşmış ya da olgunlaşmaya yakın embriyo kesesine sahip olan bitkiler kültüre alındığında elde edilen sonuçlar olduğu gözlemlenmiştir (Hoseman and Bossoutrot, 1983; San Noeum and Gelebart, 1986; Ge'mes-Juha'sz ve diğ., 2002). *Guizotia abyssinica* bitkisinde yapılan çalışmada antesisten bir gün önce kültüre alınan yumurta kültürleri ginogenesis'e cevap verirken iki ya da üç gün önce alınanların cevap vermediği belirtilmiştir (Bhat ve Murthy, 2007). Birçok bitki türünde embriyo kesesi ya da ovülün gelişim aşamasına ilişkin farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar ile birlikte, sonuçlar farklı olmasına rağmen her bitki türünde dişi gamet hücrelerinden bitki elde etmek için ovülün ve embriyo kesesinin en iyi sonuç verdiği bir gelişim aşaması olduğu gösterilmiştir.

Bitkide gametofit aşamadan sporofit aşamaya geçmek oldukça zor bir süreçtir. Ginogenesis yolu ile dişi gametten bitki eldesi sürecini sağlayabilmek için bazı ön uygulamalar yapılabilir. Bu ön uygulamaların amacı bitkide stres oluşturmaktır. Stres faktörü ile bitki neslini devam ettirmek için döllenme olmaksızın gametten yeniden bitki üretme sürecine girer. Stres için en çok kullanılan ön uygulamalar arasında kültürleri düşük ya da yüksek sıcaklığa maruz bırakma, karanlık ortamda tutma ve aç bırakma gösterilebilir. Hıyarda yapılan bir çalışmada kültürler iki, üç ve dört gün boyunca 35 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sıcaklık şok

uygulamasının bitkicik oluşumunu artırdığı gözlemlenmiştir (Diao ve diğ., 2009). Bhagyalakshmi (1999) safranda karanlık ve sıcaklığın uyartıma etkisini test etmiştir. Elde edilen sonuçlar 15 °C ve 20 °C’de kültür başladıktan 30 gün sonra karanlık ortama konulan örneklerin 16 saat ışıktaki tutulanlara göre daha yüksek oranda cevap verdiğini göstermiştir. Bu ve benzeri çalışmalar ön uygulamaların bitkide stres oluşturarak gamet hücrelerinden embriyogenesise dönüşüm sağlayabileceğini göstermektedir.

Besi yeri ortamının içeriği ginogenesis uyartımını etkileyen bir başka faktör olarak gösterilmektedir. Azot kaynağı, bitki büyüme düzenleyici içeriği, karbonhidrat kaynağı veya konsantrasyonu değiştirilerek modifiye besi yerleri elde edilmektedir (Chen ve diğ., 2011). Genel olarak bakıldığında ginogenesis için uygulanabilecek tek bir besi yeri prosedürü yoktur. İçerikler farklı bitkilerde farklılık gösterebilir. Mısırdaki ovaryum kültürü yaparken %12 oranında sukroz konsantrasyonu etkili iken buğdayda bu oran %6 kadardır (Truong-Andre and Demarly, 1984; Mukhambetzhonov, 1992). Aynı tür içinde dahi farklı sukroz konsantrasyonu tomurcukların cevap verme oranını etkilemektedir. Alan ve diğ. (2016a) pırasada yaptığı çalışmada 12 farklı besi yeri kullanmış olup tomurcukların en iyi verdiği cevaplar 50 g/l ya da daha yüksek oranda sukroz içeren besi yerlerinden gelmiştir. Amino asit ve vitaminler de bazı bitkilerde ginogenesis uyartım oranını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Prolin ve glisin kullanımının dut bitkisinde embriyo oluşumunu olumlu yönde etkilediği ifade edilmiştir (Thomas ve diğ., 1999). Bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve konsantrasyonu da birçok bitki türünde dişi gametten embriyo gelişimine katkı sağlamaktadır. Kielkowska and Adamus (2010), döllenmemiş havuç ovülünü kültüre alırken indol-3-asetik asit (IAA) içeren besiyeri kullandıklarında embriyo oluşumu tetiklenirken (%0.63); 2,4-D ve BAP içeren besi yerleri kullandıklarında kallus oluşumu tetiklenmiştir (%1.34). Tüm bu yapılan çalışmalar ve bulgular besi yeri içeriğinin ginogenesis uyartımında ve rejenerasyonda önemli bir rolünün olduğunu ispatlamaktadır.

Ginogenesis yöntemi dişi gametleri kullanarak çok kısa sürede saf hatlar elde etmeyi sağlamaktadır. Saf hatlar sayesinde o türe ait iyi olan özellikler ortaya çıkarılmaktadır. Ayrıca klasik ıslah ile ortaya çıkartılması oldukça zor olan resesif

özelliklerin ortaya çıkartılmasında da oldukça etkilidir. Ginogenesis; ıslah süresini kısaltmak, saf hatlar elde etmek, ekonomik ve iş gücü bakımından tasarruf etmek için modern bir ıslah yöntemi olarak tercih edilmektedir.

1.4.3 *Allium*'larda ginogenesis

Allium'lar çok yıllık otsu bitkilerdir ve ikinci yıllarında çiçeklenirler. Açık tozlanan bu cinse ait türlerin ıslahı kendileme depresyonu gösterdikleri için klasik yöntemler kullanılarak 6-10 yıl sürebilir. Günümüzde bu sorunu aşmak için kısa sürede saf hatlar elde etmeyi sağlayan ginogenesis yönteminden faydalanılmaktadır (Bohanec ve Jakse, 1995).

Allium türlerindeki ilk ginogenesis uyarımı Muren (1989) tarafından *A. cepa*'da yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda da yine *A. cepa*'da ginogenesis uyarımı Keller (1990), Champion ve Alloni (1990), Champion ve diğ. (1992) ve Bohanec ve Jakse (1995) tarafından denenmiş ve ginogenik bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Öncelikle *A. cepa*'da başlayan döllenmemiş yumurtadan haploid bitki eldesi daha sonra diğer *Allium*'larda da uygulanmaya başlanmıştır. Alan ve diğ. (2003) *A. cepa* ve *A. roylei* türlerini çaprazlayarak oluşturdukları bitkilere ginogenesis uygulamış, sonucunda haploid bitki eldesi sağlamışlardır. Pırasaya (*A. ampeloprasum*) ait açmamış çiçek tomurcuklarının farklı besi yerleri kullanılarak kültüre alındığı ve kromozom sayısı yarılanmış bitkilerin elde edildiği çalışmalar yapılmıştır (Keller ve Korzun, 1996; Chen ve diğ., 2011; Kaska, 2013; Alan ve diğ., 2016a; Akgün, 2018). Çayır soğanı olarak da bilinen *A. tuberosum* türünde de haploid bitki eldesi için ginogenesis uyarım çalışmaları yapılmıştır ve ginogenik bitki oluştuğu belirtilmiştir (Celebi-Toprak ve diğ., 2013).

Allium'larda hem haploid bitki eldesi hem de somatik rejenerasyon ile ilgili birçok doku kültürü çalışması yapılmasına rağmen *A. sandrasicum* ile ilgili böyle bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma *A. sandrasicum*'un doku kültüründe kullanıldığı ilk çalışma olmasının yanı sıra endemik bir tür olan bu bitkinin ıslahı için oldukça büyük bir önem taşımaktadır.

1.5 Ploidi Seviyesinin Tespiti

Ginogenesis ve somatik uyarım sonucu elde edilen bitkilerin karakterize edilirken *in vitro*'dan *in vivo*'ya transfer edilmeden önce ploidi seviyeleri belirlenmektedir. Ploidi seviyesi farklı metotlar kullanılarak yapılabilir. Bitkinin kök uçlarından örnekler alınıp gerekli kimyasallarla hücre bölünmesi durdurulup ve kromozomlar uygun boyalarla boyandıktan sonra metefaz safhasındaki hücreler mikroskop altında bulunarak kromozom sayımı yapılabilir. Bu yöntem oldukça doğru sonuç vermesine rağmen çok zaman almakta ve her zaman kromozom sayımına uygun hücre bulmak zor olmaktadır(Ochatt, 2008). Bunun dışında stoma yoğunluğu ve büyüklüğü (Dolezel ve diğ., 1994; Van Duren ve diğ., 1996), polenlerin büyüklüğü (Zonneveld ve diğ., 2001) veya hücre büyüklüğü (Hao ve diğ., 2002) bazı araştırmacılar tarafından kullanılmasına rağmen güvenilirliği çok yüksek değildir. Nükleer DNA miktarı ve ploidi seviyesi arasında bir ilişki vardır. Bu yüzden bitkinin ploidi seviyesi tespiti yapılırken flow sitometri kullanmak güvenilir ve hızlı sonuçlar vermektedir (Ramulu ve Dijkhuis, 1986; De Laat ve diğ., 1987). Flow sitometri ile ploidi tespiti yapılırken örneklerin uygun dokuları kesilerek ve iç kontrol olarak DNA miktarı bilinen başka bir türe ait dokulardan eklenerek tampon bir çözeltide parçalanır. Hazırlanan süspansiyon lazer ışığının tanıyacağı bir boya yardımı ile boyanarak cihaza yerleştirilir. Cihaz içindeki kanallardan geçip analiz sonucu bilgisayar ekranında ışım oranı olarak görülmektedir (Alan ve diğ., 2003).

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Bitki materyali

Bu çalışmada Akdeniz Bölgesi'ne endemik olan altı farklı *Allium sandrasicum* genotiplerinden bitkiler kullanılmıştır. Bitkisel materyal, Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (PAÜ BİYOM) tedarik edilmiştir. PAÜ BİYOM'dan tedarik edilen bitki materyalinin *A. sandrasicum* türüne ait olduğu PAÜ biyoloji bölümü tarafından teyit edilmiştir. *A. sandrasicum*'a ait bitki örneği PAÜ biyoloji herbaryumunda korunmaktadır. Herbaryum adı ve numarası: Herb. M. Çiçek No:2017-8-1.

2.2 *A. sandrasicum* büyüme koşulları

A. sandrasicum bitkisine ait genotipler 2:1 oranında torf ve perlitten oluşan karışım kullanılarak hazırlanan 7 litrelik saksılara dikilmiştir. Mart-nisan aylarında çiçek sapı oluşmaya başlamıştır. Çiçek sapı oluşuktan sonra umbeller büyümeye devam eder ve antesis dönemi başlar. Antesis çiçeklerin açması ve fonksiyonel olma sürecini tanımlayan bir terimdir. *A. sandrasicum* için antesis ilk olarak haziran ortasında başlamış olup temmuz ortasına kadar devam etmiştir.

2.3 *A. sandrasicum* tomurcuklarının alınması ve sterilizasyonu

Antesis aşamasına gelen umbellerdeki çiçeklerin yaklaşık %20'lik bir kısmı açtıktan sonra tomurcukları ginogenesis uyartımı için hazırdır (Şekil 1B). Bu seviyedeki umbeller kesilip dikkatlice etiketlendikten sonra laboratuvarında içinde su bulunan kaplara alınmıştır. Açmamış olan tomurcuklar makas ile kesilmiştir (Şekil 1C). Kesilen tomurcuklar süzöklere alınmış ve etiketlenmiştir. Öncelikle %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilmiştir. Bu işlemden hemen sonra

% 20 klorak (amaşır suyu) + % 0.1'lik Tween 20 + distile su içeren sterilizasyon solüsyonu içerisinde 30 dakika bekletilmiştir (Şekil 1D). Bu aşamadan sonra süreç steril kabin içerisinde devam ettirilmiştir. Steril kabin içine alına süzeklerin bulunduğu kaplardaki sterilizasyon solüsyonu 30 dakikanın sonunda dikkatlice boşaltılmıştır. 3 kere 10'ar dakikalık periyotlar halinde otoklavlanmış steril su içerisinde yıkanarak tomurcuklarda kalmış sterilizasyon solüsyonunun uzaklaşması sağlanmıştır. Steril hale gelmiş ve yıkanmış tomurcuklar steril kurutma kağıtlarının (Whatman Paper) üzerine boşaltılarak kuruması beklenmiştir (Şekil 1E). Kuruyan tomurcuklar kültüre alınmıştır.

2.4 A. *sandrasicum*'un ginogenik ve somatik uyarımı için kullanılan besi yerlerinin içerikleri

Bu çalışmada temel besi yeri olarak BDS (Dunstan ve Short, 1977) ve MS (Murashige ve Skoog, 1962) kullanılmıştır. Temel besi yerlerine bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek modifiye edilmiştir (Bohanec ve Jakse, 1999; Alan ve diğ., 2004) (Tablo 1). MS ve BDS temel besi yerlerine 2,4-diklorofenoksiasetikasit (2,4-D) ve benzil amino pürin (BAP) ile naftalen asetik asit (NAA) ve 2-izopenten adenin (2IP) eklenerek farklı sukroz konsantrasyonlarında modifiye besi yerleri oluşturulmuştur. Besi yerleri hazırlanırken sıvı stok çözeltiler kullanılmış olup sukroz ilavesi de besi yeri hazırlanırken yapılmıştır. Hazırlanan besi yerleri uygun pH derecelerine NaOH (Sodyum hidroksit) ve HCl (Hidroklorik asit) kullanılarak getirilmiştir. Bu pH değerleri MS için 5.8 ve BDS için 6'dır. Gerekli pH'a ulaştıktan sonra katılaştırıcı madde eklenmiştir. Katılaştırıcı olarak agar kullanılmıştır. Hazırlanan besi yerleri sterilizasyonu sağlamak amacıyla otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınçta 20 dakika boyunca tutulmuştur. Sterilizasyonu sağlanan besi yerleri 65-70°C sıcaklıkta iken 90x15 mm'lik Petri tabaklarına yaklaşık 30 ml dökülerek donmaya bırakılmıştır.

Tablo 1: *A. sandrasicum* uyartımı için kullanan besi yeri içerikleri

İçerik						
Uyartım ortamı	Oksin		Sitokinin		Karbon	Katılaştırıcı
	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	2İP (mg/l)	Sukroz (g/l)	Agar (g/l)
^aBDS temelli						
A ₀	2	-	2	-	0	7
A ₅₀	2	-	2	-	50	7
A ₁₀₀	2	-	2	-	100	7
A4 ₀	-	-	-	-	0	7
A4 ₅₀	-	-	-	-	50	7
A4 ₁₀₀	-	-	-	-	100	7
^bMS temelli						
F	-	-	-	-	0	8
F2	-	-	-	-	50	8
F4	-	-	-	-	100	8
F5	-	1	-	8	0	8
F7	-	1	-	8	50	8
F9	-	1	-	8	100	8
F10	2	-	2	-	0	8
F12	2	-	2	-	50	8
F14	2	-	2	-	100	8

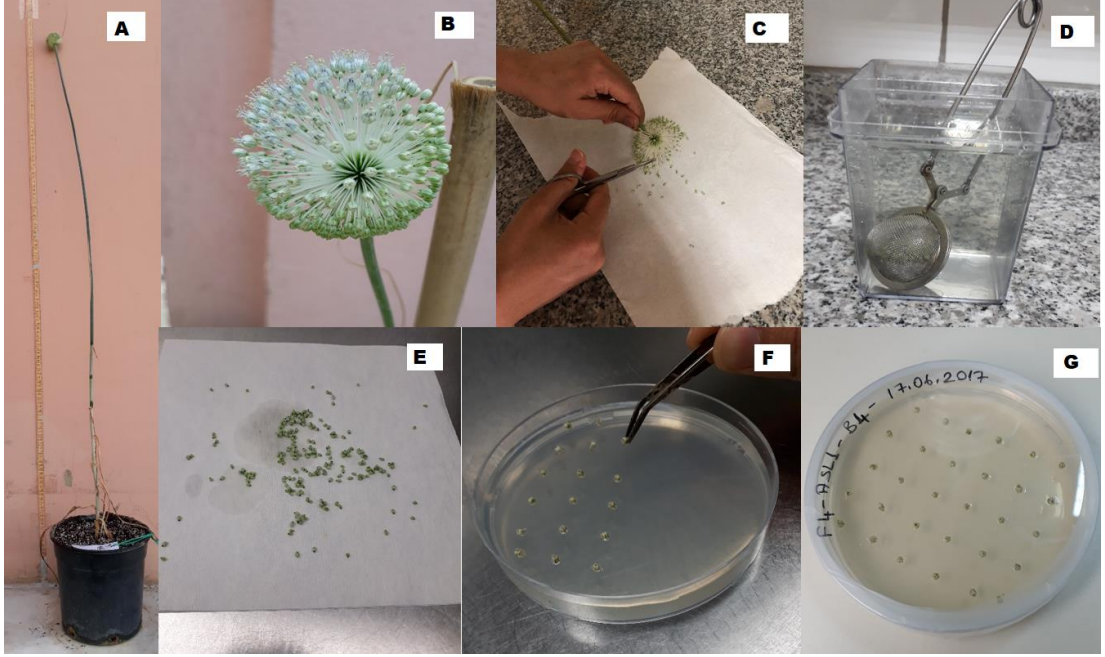
^aBDS (Dunstan ve Short, 1977)

^bMS (Murashige ve Skoog, 1962)

2.5 *A. sandrasicum* tomurcuklarının kültüre alınması

Sterilizasyonu tamamlanan açmamış tomurcuklar boyutlarına göre büyük, orta ve küçük olarak ayrılmıştır. İçerisinde bitki büyüme düzenleyici bulunan veya bulunmayan farklı sukroz konsantrasyonlarına sahip BDS ve MS temelli besi yeri içeren 90x15 mm'lik Petri tabaklarına yaklaşık 20 bin adet tomurcuk boyutlarına göre ayrılarak kültüre alınmıştır (Tablo 2). Boyutlara büyük, orta ve küçük olarak adlandırma yapılmıştır (Tablo 3). Her bir Petri tabağına 30 adet tomurcuk konulmuştur. Kontaminasyonu engellemek için iki sıra Parafilm kullanılarak kapatılmıştır. Bu tomurcukların yaklaşık %3'lük bir kısmı

kontaminasyondan dolayı atılmıştır. Kültüre alına tomurcuklar bilgisayar ve yazılı olarak kayıt altına alınmış olup, ilerleyen süreçlerdeki gözlemler için gerekli düzen oluşturulmuştur. Tüm kültürler 22 °C’de 16 saat ışık alan ve 8 saat karanlık olan doku kültürü odasına ilerleyen süreçte gözlemleri yapılmak üzere konulmuştur.



Şekil 1: *A. sandrasicum* bitkisine ait tomurcukların kültüre alınma aşamaları

A. *A. sandrasicum* bitkisi **B.** Antesis aşamasına gelmiş tomurcuklar **C.** Tomurcukların kesilmesi **D.** Tomurcukların yüzey sterilizasyonu **E.** Kurutma kağıdına alınmış tomurcuklar **F.** Tomurcukların ilgili besi yerine ekilmesi **G.** Ekilen tomurcukların Parafilmlenmesi

Tablo 2: Besi yerlerine göre altı genotipe ait ekilen tomurcuklar

GENOTİP						
MEDYA ADI	ASL1	ASL2	ASL3	ASL4	ASL5	ASL6
A4(0)	210	420	180	180	180	180
A4(50)	120	390	-	-	-	-
A4(100)	720	570	150	240	120	240
A(0)	180	210	150	150	150	150
A(50)	300	120	-	-	-	-
A(100)	839	420	300	240	120	180
F	120	90	120	120	120	120
F2	176	90	-	-	-	-
F4	1379	922	360	330	90	270
F5	300	300	-	-	-	-
F7	502	360	-	-	-	-
F9	1170	240	-	-	-	-
F10	180	120	150	150	150	150
F12	180	150	-	-	-	-
F14	417	540	120	90	90	110

Tablo 3: Genotiplere göre tomurcuk boyutlarını ortalama çapları

TOMURCUK BOYUTU			
	Büyük(mm)	Orta (mm)	Küçük(mm)
ASL1	>2,1	>1,5	>1,1
ASL2	>2,3	>1,7	>1,4
ASL3	>2,3	>1,7	>1,4
ASL4	>2,3	>1,7	>1,4
ASL5	>2,1	>1,5	>1,1
ASL6	>2,3	>1,7	>1,4

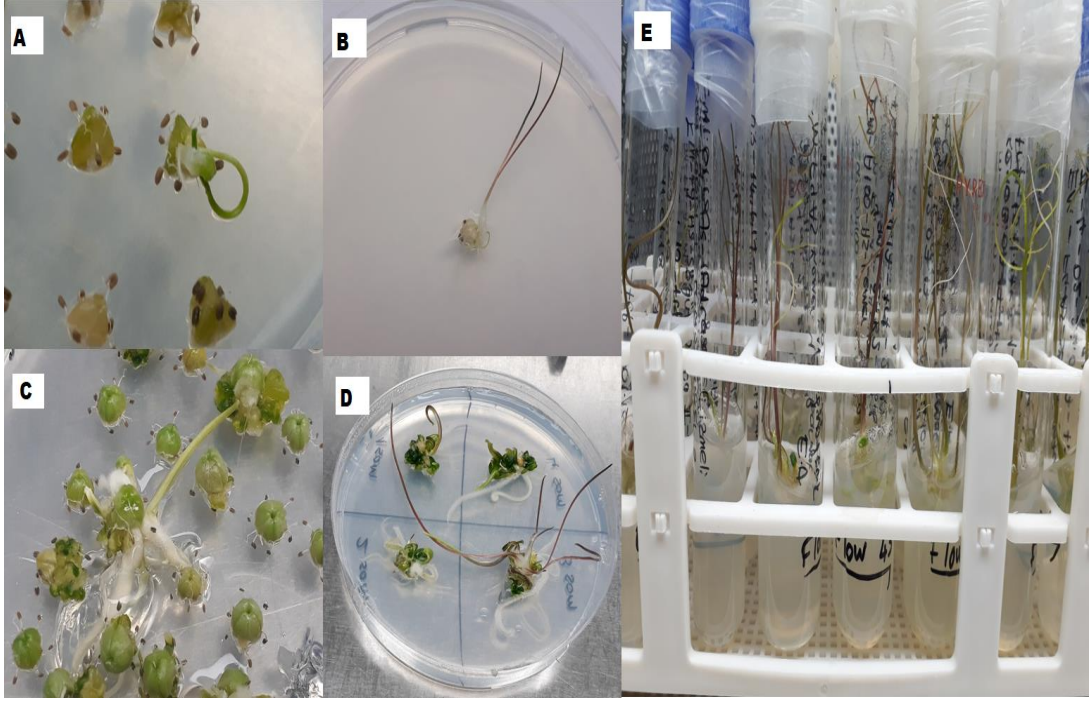
2.6 *A. sandrasicum* kültürlerinde yapılan gözlemler

Doku kültürü odasındaki *A. sandrasicum* kültürleri haftada bir kez kontrol edilmiştir. Bakteri veya mantar kontaminasyonu olan Petri tabakları hemen doku kültüründen uzaklaştırılmıştır. Parafilmli yırpanan tabaklara yeni Parafilm çekilerek olası kontaminasyon riskleri ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Yaklaşık

iki buçuk-üç ay sonra tomurcuklar ginogenesis uyartımına cevap vermeye başlamışlardır. Aynı zamanda somatik rejenerasyon da gözlenmiştir. Oluşan bitkicikler tomurcuğun içinden geliyorsa ginogenik, dış kısmından geliyorsa somatik olarak adlandırılmıştır. Yapılan tüm değişiklik ve gözlemler kayıt altına alınmıştır.

2.7 Ginogenik ve somatik *A. sandrasicum* bitkiciklerinin büyümeleri

Uyartıma ginogenik veya somatik olarak cevap veren tomurcuklar belirlenmiştir (Şekil 2A ve Şekil 2C). Bu tomurcuklar ve bitkicikler, gelişimlerini daha iyi devam ettirebilmeleri için BDS temelli bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ve içerisinde 30 g/l sukroz bulunan büyüme besi yerleri kullanılarak hazırlanan Petri tabaklarına aktarılmıştır (Şekil 2B ve Şekil 2D). Burada gözlemlerine devam edilen bitkicikler belirli büyüklüğe ulaştınca kök ve yaprak gelişiminin daha rahat ilerleyebilmesi için, içerisinde aynı büyüme besi yeri bulunan tüplere alınmıştır. Tüpler tekrardan doku kültürü odasına alınıp gözlemleri yapılmıştır (Şekil 2E). Tüm yapılan çalışmalar bu aşamada da kayıt altına alınmıştır.



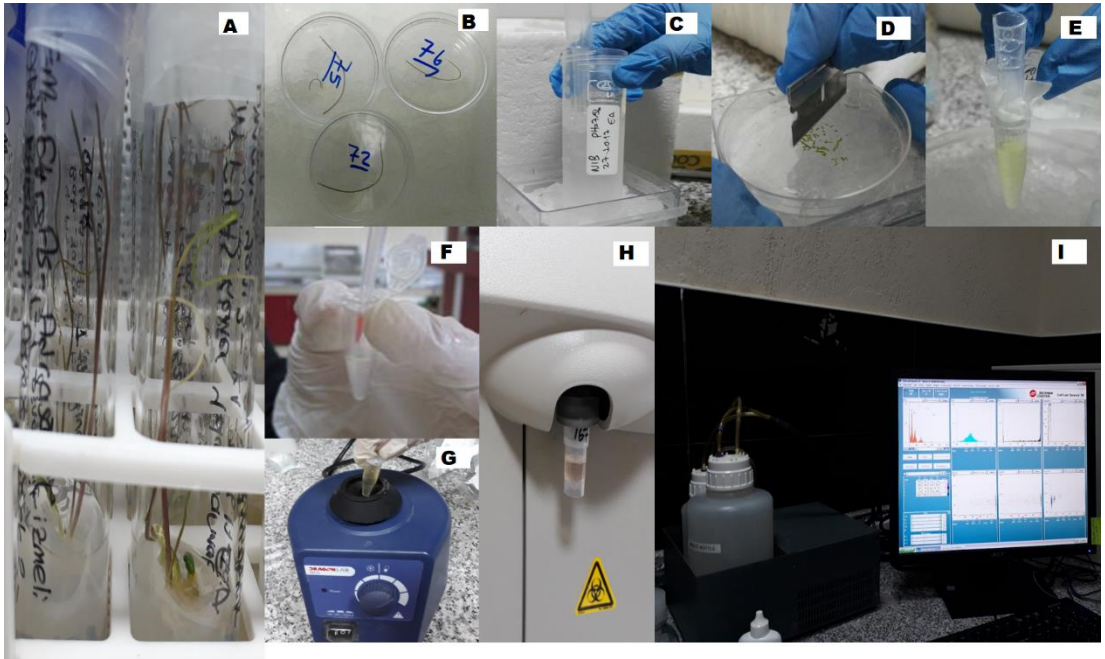
Şekil 2: *A. sandrasicum*'da ginogenik ve somatik cevaplar

A. Tomurcuktan gelen ginogenik bitkicik **B.** Büyüme besi yerinde bitkiye dönüşen ginogenik bitkicikler **C.** Somatik bitkicik oluşumu **D.** Büyüme besi yerinde bitkiye dönüşen somatik bitkicikler **E.** Tüplere aktarılmış ginogenik ve somatik bitkiler

2.8 *A. sandrasicum* bitkilerinin ploidi seviyelerinin analizi

Kök ve yaprakları belirli boyuta gelen bitkiler (üç-dört yapraklı) ploidi analizi için hazırlanmıştır. Ploidi analizi yapılacak her bir bitkiye ileride oluşabilecek karışıklığı engellemek amacıyla bir numara verilmiştir ve bu numaraya karşılık gelen bitki kültüre alınımından itibaren aktarıldığı bütün besi yerleri ile birlikte kayıt altına alınmıştır. Steril kabin içinde, tüplerdeki bitkilerin yapraklarından steril makas yardımı ile dokular kesilmiştir. Petri tabaklarına içerisine alınan dokular zaman kaybetmeden buz üzerine alınmıştır. Ploidi analizi yapılacak bitkilerden 50 mg ve iç kontrol olarak kullanacağımız *Lactuca sativa*'dan (marul) yaklaşık 5 mg alınarak üzerine 1 ml NIB (nuclei isolation buffer) çözeltisi eklenmiştir. NIB çözeltisinin içeriği Tablo 4'de gösterilmiştir. Jilet yardımı ile küçük parçalara kesilerek hücre çekirdeğinin dışarı çıkması

sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 0,5 ml daha NIB çözeltisi eklenerek bir filtre yardımı ile Eppendorf tüplerinin içine süzülmüştür. Hazırlana örnekler buza koyulmuştur. Örnekler test edilmeden önce 10 µl 1 mg/ml'lik propidium iodide (PI) eklenerek vortekslenmiştir ve örneklerin sıcaktan etkilenip bozulmaması için test edilinceye kadar buzda bekletilmiştir. Hazır olan örneklerin ploidi seviyesi ve DNA miktarları flow sitometri (Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer) ile ölçülmüştür (Şekil 3A-3I).



Şekil 3: A. sandrasicum bitkisinin flow sitometri ile DNA miktarının ve ploidi seviyesinin tespiti

A. A. sandrasicum bitkisinin ploidi analizi için uygun seviyeye gelmiş bitki **B.** Analiz için kesilen yapraklar (buzda) **C.** NIB tampon çözeltisi **D.** Marul ve A. sandrasicum içeren örneğin hazırlanması **E.** Filtreden geçirilen örnekler **F.** Örneğin PI ile boyanması **G.** Örneğin vortekslenmesi **H.** Örneğin flow sitometri cihazına yerleştirilmesi **I.** Analizi yapılan örneğe ait DNA miktarını gösteren histogram

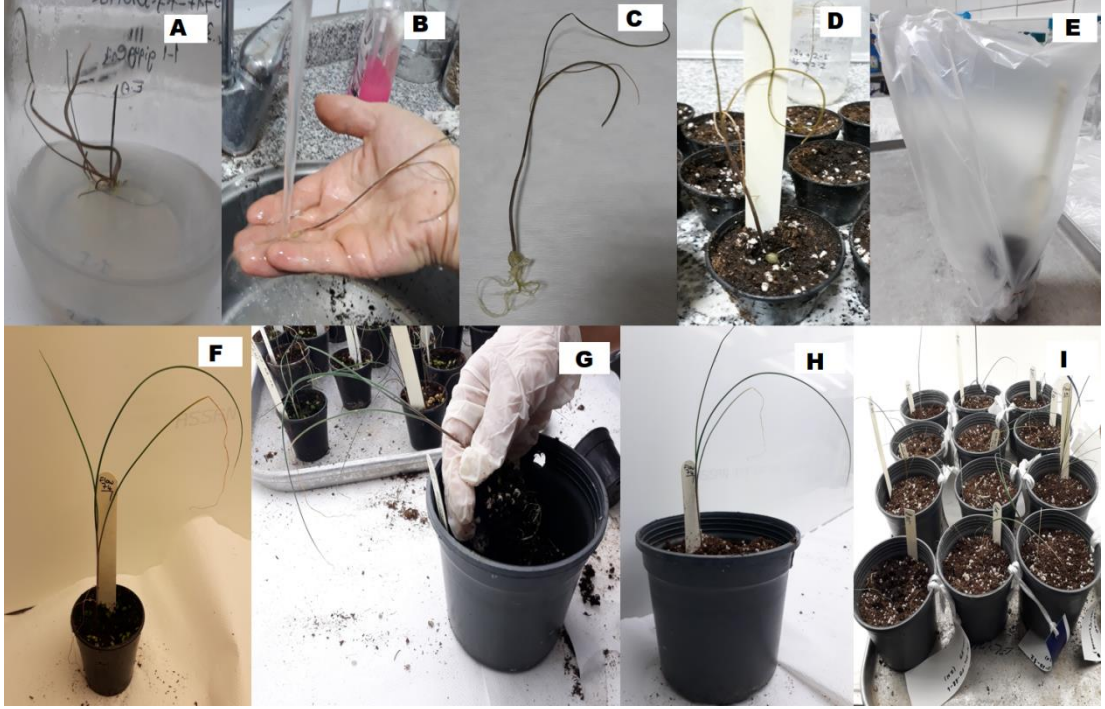
Tablo 4: NIB^a (Nuclei isolation buffer) içeriği

Kimyasal	Kimyasal Miktarı	Final	Konsantrasyon Miktarı
HEPES	360 mg		15 mM
Na ₂ EDT	37,22 mg		1mM
KCl	597 mg		80mM
NaCl	116,9 mg		20 mM
Triton X-100	200µl		% 0,2 (v/v)
Sükroz	10,3		300 Mm
Spermin	17,4mg		0,5Mm
PVP-40	1 g		%1

^a NIB solüsyonu hazırlandıktan sonra pH değeri 7,5 olarak ayarlanır ve kullanım zamanına kadar -20°C’de saklanabilir

2.9 *A. sandrasicum* bitkilerinin *in vivo*’ya transfer edilmesi

Flow sitometri ile DNA miktarları ve ploidi seviyeleri belirlenen *A. sandrasicum* bitkilerinden somatik olanlar ($2n=2x$, $2n=2x+4x$ ve $2n=4x$) dış ortama aktarılmak için hazırlanmıştır. Aktarılabak bitkilere kod verilerek ilerleyen süreçlerde karışıklık yaşanması önlenmiştir. 2:1 oranında torf-perlit kullanılarak hazırlanan karışım aktarım öncesi otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Küçük botyuttaki (~100 ml) saksılara doldurularak gerekli neme ulaşmcaya kadar steril su ilave edilmiştir. Aktarılabak olan bitkiler dikkatlice tüplerden çıkartılmıştır. Kök kısımları musluk suyu ile hasar vermeden yıkanmıştır (Şekil 4B). Daha sonra dikkatlice saksılara dikimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4D). Naylon poşet yardımı ile kapatılmıştır (Şekil 4E). Naylon poşet *in vitro*’dan *in vivo*’ya geçişte gerekli nemi sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan bitkiler büyütme kabininde 17-18°C’de tutulmuştur. Düzenli olarak toprağın nemi kontrol edilmiş ve gerekli olduğu durumlarda su eklenmiştir. Yaklaşık 10 gün sonra naylon poşette yeteri miktarda su damlacığı oluştuğunda, poşetlere jilet yardımı ile çizik atılmıştır. 10-15 gün sonra ise poşetler tamamen çıkartılmıştır. Bitkiler yeterli büyüklüğe ulaştığında daha büyük saksılara aktarılmıştır ve bir süre daha büyütme kabininde tutulmuştur (Şekil 4F-4I). Son aşamada ise bitkiler seraya aktarılmıştır ve büyümeleri gözlenmiştir (Şekil 4A-4I).



Şekil 4 : *A. sandrasicum* bitkilerinin dış ortama transferi

A. Dış ortama transfer edilecek bitki **B.** Köklerin yıkanması **C.** Yıkanmış bitki **D.** Bitkinin toprağa dikilmesi **E.** Naylon poşet ile bitkinin kapatılması **F.** Büyütme kabininde yeterince büyümüş bitki **G.** Bitkinin daha büyük saksıya aktarılması **H.** Daha büyük saksıya aktarılmış bitki **I.** Aktarılmış ve etiketlenmiş saksılar

2.10 *A. sandrasicum*'da yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizi

A. sandrasicum'da ginogenik ve somatik uyartım sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede Minitab programından yararlanılmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırılırken Tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi kullanılmış olup Tukey ile besi yeri kıyaslaması da yapılmıştır.

3. BULGULAR

A. sandrasicum uyartımı çalışmalarında yaklaşık 20 bin kadar tomurcuk kültüre alınmıştır. Bu tomurcuklar boyutlarına göre büyük, orta ve küçük olarak ayrılmıştır. Kültüre alındıktan birkaç gün sonra tomurcuklar açmıştır. 15 günlük süre içerisinde büyüklükleri artmıştır. Yaklaşık üç ay sonra ginogenik bitkicikler tomurcukların içinden çıkmaya başlamıştır. Somatik olanlar ise bazal kısımdan ve oluşan kallus üzerinden rejenere olamaya başlamıştır.

Uyartım besi yerlerine *A. sandrasicum* bitkisinin altı farklı genotipine (ASL1, ASL2, ASL3, ASL4, ASL5, ASL6) ait yaklaşık 20 bin adet tomurcuk kültüre alınmıştır. ASL1 ve ASL2 genotipleri için BDS (A₀, A₅₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) ve MS (F, F2, F4, F5, F7, F9, F10, F12, F14) temelli 15 adet besi yeri kullanılmıştır. ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotipleri için dört adet BDS (A₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₁₀₀) ve dört adet MS (F, F4, F10, F14) temelli besi yerleri denenmiştir. Bu besi yerleri hazırlanırken farklı oranda sukroz (0, 50, 100 gr) ve farklı oran ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyicileri olan oksin (2,4-D, NAA) ve sitokinin (BAP ve 2İP) eklenerek modifiye edilmiştir. Tomurcuk boyutunun ginogenesis uyartımına etkisi bakılırken ASL1 ve ASL2 genotipleri dört adet besi yerine (A₁₀₀, A₄₁₀₀, F4, F14) kültüre alınmıştır. Her bir denemeden farklı oranlarda cevaplar alınmıştır.

3.1 Ginogenesis Uyartımına Gelen Cevaplar

ASL1 ve ASL2 genotipleri için bütün besi yerlerindeki ginogenik cevap verme oranına bakılmıştır. ASL1 genotipinden BDS temelli altı farklı besi yerine (A₀, A₅₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) toplamda 2369 tomurcuk ekilmiştir. Bu ekimlerden yedi (%0,30) adet ginogenik bitkicik elde edilirken, bir (%0,17) tanesi bitkiye dönüşmüştür. Elde edilen bitkicik tamamının A₄₁₀₀ besi yerinde geliştiği gözlenmiştir. A₄₁₀₀ besi yerine toplamda 720 adet tomurcuk ekilmiştir. Bu besi yerindeki tomurcukların cevap verme oranı bitkicik gelişimi için % 0,97 ve bitki için % 0,55 olarak bulunmuştur. Bu besi yerinden elde edilen bitkiciklerin

bitkiye dönüşüm oranı % 57,4 olarak belirlenmiştir. Diğer besi yerlerine (A₀, A₅₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀) ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik elde edilememiştir (Tablo 5). ASL1 genotipi MS temelli dokuz adet besi yeri (F, F2, F4, F5, F7, F9, F10, F12, F14) kullanılarak 4424 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Toplamda 51 (% 1,15) adet bitkicik ve 27 (%0,61) adet bitki elde edilmiştir. Bu bitkicik ve bitkiler F4, F7 ve F9 besi yerlerine kültüre alınan tomurcuklardan elde edilmiştir. F4 besi yerine 1379 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Bu denemeden 37 (%2,68) adet bitkicik ve 23 (%1,67) adet bitki elde edilmiştir. F7 besi yerine 502 adet tomurcuk kültüre alınmış olup deneme sonucunda 10 (% 1,99) adet ginogenik bitkicik ve üç (% 0,59) adet ginogenik bitki oluşumu görülmüştür. ASL1 genotipinden F9 besi yerine 1170 adet tomurcuk ekilmiştir. Ginogenik uyartım denemesi sonucunda bu besi yerinde dört (% 0,34) adet bitkicik ve bir (% 0,09) adet bitki oluşmuştur. MS temelli besi yerlerinden elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı % 25 ile % 62,16 arasında değişmektedir. Diğer altı besi yerinde bitkicik ya da bitki gelişimi gözlenmemiştir (Tablo 5). ASL1 genotipi için kullanılan besi yerlerinin ginogenik bitkicik oluşturma oranları karşılaştırıldığında F4 ve A₁₀₀ besi yerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Ginogenik bitki oluşturmaları kıyaslandığında ise F4 besi yerinin F9 ve A₁₀₀ besi yerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. ASL2 genotipine ait BDS temelli altı besi yerine toplamda 2130 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Bu deneme sonucunda A₄₅₀, A₄₁₀₀ ve A₅₀ besi yerlerine ekilen tomurcuklardan 12 (% 0,56) adet bitkicik ve 6 (% 0,28) adet bitki elde edilmiştir. A₄₅₀ besi yerine 390 tomurcuk kültüre alınmıştır ve 2 (% 0,51) adet bitkicikten 1 (% 0,26) adet bitkiye dönüşüm gözlenmiştir. A₄₁₀₀ besi yerine 570 adet tomurcuk ekilmiş olup sonuç olarak 8 (% 1,40) adet bitkicik ve 3 (% 0,52) adet bitki elde edilmiştir. A₅₀ besi yerine 120 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Cevap olarak iki (% 1,67) adet bitkicik ve iki (% 1,67) adet bitki oluşmuştur. BDS temelli besi yerlerine kültüre alınan tomurcuklardan gelen bitkiciklerden bitki elde edilme oranı % 37,5 ile % 100 arasındadır. A₀, A₁₀₀ ve A₄₀ besi yerlerindeki tomurcuklardan bitkicik oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 5). MS temelli dokuz adet besi yeri için ASL2 genotipinden 2812 adet tomurcuk kullanılmıştır. Bunun sonucunda F2, F4 ve F7 besi yerlerine ekilen tomurcuklardan 17 (% 0,60) adet ginogenik bitkicik ve 12 (% 0,43) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. F2 besi yerine 90 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Bu kültürlerden beş (% 5,55) adet bitkicik ve dört (% 4,44) adet bitki

oluşmuştur. F4 besi yerine 922 adet tomurcuk ekimi yapılmıştır. Kùltùrlerden 10 (% 1,08) adet bitkicik ve yedi (% 0,80) adet bitki elde edilmiştir. Bir başka bitkicik elde edilen besi yeri olan F7 besi yerine 360 adet tomurcuk kùltùre alınmıştır. Bu deneme sonucunda iki (% 0,55) adet bitkicik ve bir (% 0,28) adet bitki oluşumu gözlenmiştir. ASL2 genotipine ait oluşan bitkiciklerin bitkiye dönüşümü MS temelli besi yerlerinde % 50 ile % 80 arasında değişmektedir. MS temelli diğer besi yerlerinde (F, F5, F9, F10, F12, F14) bitkicik ve bitki gelişimi gözlenmemiştir (Tablo 6). ASL2 genotipine ait 15 adet besi yerine kùltùre alınan tomurcukların ginogenik bitkicik oluşturma oranı arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Aynı genotipe ait tomurcukların farklı besi yerlerindeki ginogenik bitki oluşturma oranları arasında ise istatistiksel olarak fark bulunmuştur. ASL1 ve ASL2 genotipleri karşılaştırıldığında ginogenik bitkicik ve bitki sayısına göre yalnızca A₅₀ besi yerinde istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait genotipleri için BDS (A₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₁₀₀) ve MS (F, F4, F10, F14) temelli sekiz adet besiyeri kullanılmıştır. 2910 tanesi BDS temelli besi yerine 2540 tanesi MS temellilere olmak üzere bütün besi yerlerine toplamda 5450 adet tomurcuk ekilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda A₁₀₀, A₄₁₀₀, F4 besi yerlerine kùltùre alınan çiçek tomurcuklarından ginogenik cevap alınmıştır.

A₁₀₀ besi yerine toplamda 840 adet tomurcuk ekilmiştir. Bu besi yerine ekilen ASL3 genotipine ait 300 tomurcuktan iki (% 0,67) adet bitkicik ve bir (% 0,33) adet bitki elde edilmiştir. ASL4 genotipinden 240 adet tomurcuk kùltùre alınmış olup, sonuç olarak üç (% 1,25) adet ginogenik bitkicik ve üç (% 1,25) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. ASL5 genotipine ait 120 adet çiçek tomurcuğu kùltùre alınmıştır. Deneme sonucunda dört (% 3,33) adet ginogenik bitkicik ve dört (% 3,33) adet ginogenik bitki oluşmuştur. ASL6 genotipinden 180 adet tomurcuk ekilmiş olup, ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu gözlenmemiştir. A₁₀₀ besi yeri kullanılarak farklı genotiplerden elde edilen bitkiciklerden bitki oluşma yüzdesi % 50 ile % 100 arasında değişim göstermektedir (Tablo 7). ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait A₁₀₀ besi yerine kùltùre alınan tomurcukların ginogenik bitkicik ve bitki oluşturmaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

A4₁₀₀ besi yerine ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinden toplamda 750 adet çiçek tomurcuğu ekilmiştir. Bu tomurcukların 150 tanesi ASL3 genotipine aittir. Ekilen tomurcuklardan iki adet (% 1,33) bitkicik ve bir (% 0,67) adet bitki elde edilmiştir. ASL5 genotipinden 120 adet tomurcuk kültüre alınmış olup dokuz (% 7,50) adet ginogenik bitkicik ve yedi (% 5,83) adet ginogenik bitki oluşumu gözlenmiştir. ASL6 genotipinden 240 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Sonuç olarak bir (% 0,42) adet bitkicik ve bir (% 0,42) adet bitki elde edilmiştir. ASL4 genotipine ait 240 tomurcuk kullanılmış olup herhangi bir ginogenik cevap gözlenmemiştir. ASL3, ASL5 ve ASL6 genotiplerinden A4₁₀₀ besi yeri kullanılarak elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı sırasıyla % 50, % 77,78 ve % 100 olarak belirlenmiştir (Tablo 7). A4₁₀₀ besi yerine ekilen dört genotipe ait tomurcukların ginogenik bitkicik oluşturması karşılaştırıldığında ASL4 ve ASL5 genotipleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Aynı besi yerindeki bitki oluşturma oranları kıyaslandığında ASL5 genotipine ait oranın ASL4 ve ASL6 genotiplerinin oranından istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir.

F4 besi yerine ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait 1050 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. ASL3 genotipinden 360 adet tomurcuk ekilmiş olup dört (% 1,11) adet bitkicik ve iki (% 0,56) adet bitki elde edilmiştir. F4 besi yerine ASL4 genotipine ait 330 adet tomurcuk ekilmiştir. Deneme sonucunda dokuz (% 2,73) adet ginogenik bitkicik ve dört (% 1,21) adet bitki oluşumu görülmüştür. 90 adet ASL5 genotipinden tomurcuk kullanılmış olup 15 (% 16,7) adet ginogenik bitkicik ve 14 (% 15,6) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. ASL6 genotipinden 270 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Bunun sonucunda altı (% 2,22) adet bitkicik ve iki (% 0,74) adet bitki oluşumu gözlenmiştir. F4 besi yerine ekilen dört genotipe ait tomurcuklardan oluşan bitkiciklerin bitki oluşturma oranı % 33,33 ile % 93,33 arasında değişmektedir (Tablo 7). F4 besi yerine kültüre alınan ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinden elde edilen bitkicik ve bitki oranı karşılaştırıldığında ASL5 genotipiyle diğer üç genotip arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait A₀, A₄₀, F, F10 ve F14 besi yerlerine ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu gözlemlenmemiştir (Tablo 7).

Tablo 5: ASL1 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)	Ginogenik Bitkiye Dönüşüm (%)
A40	210	0	0 AB	0 AB	0
A450	120	0	0 AB	0 AB	0
A4100	720	6 (0,83)	7 (0,97) AB	4 (0,55) AB	57,14
A0	180	0	0 AB	0 AB	0
A50	300	0	0 AB	0 AB	0
A100	839	0	0 B	0 B	0
∑BDS	2369	6 (0,25)	7 (0,30)	4 (0,17)	57,14
F	120	0	0 AB	0 AB	0
F2	176	0	0 AB	0 AB	0
F4	1379	20 (1,45)	37 (2,68) A	23 (1,67) A	62,16
F5	300	0	0 AB	0 AB	0
F7	502	10 (1,99)	10 (1,99) AB	3 (0,59) AB	30
F9	1170	4 (0,34)	4 (0,34) AB	1 (0,09) B	25
F10	180	0	0 AB	0 AB	0
F12	180	0	0 AB	0 AB	0
F14	417	0	0 AB	0 AB	0
∑MS	4424	34 (0,77)	51 (1,15)	27 (0,61)	52,94

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

Tablo 6: ASL2 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)	Ginogenik Bitkiye Dönüşüm (%)
A40	420	0	0	0 B	0
A450	390	2 (0,51)	2 (0,51) A	1 (0,26) AB	50
A4100	570	8 (1,40)	8 (1,40) A	3 (0,52) AB	37,5
A0	210	0	0	0 AB	0
A50	120	2 (1,67)	2 (1,67) A	2 (1,67) A	100
A100	420	0	0	0 B	0
∑BDS	2130	12 (0,56)	12 (0,56)	6 (0,28)	50
F	90	0	0	0 B	0
F2	90	5 (5,55)	5 (5,55) A	4 (4,44) AB	80
F4	922	10 (1,08)	10 (1,08) A	7 (0,80) AB	70
F5	300	0	0	0 B	0
F7	360	2 (0,55)	2 (0,55) A	1 (0,28) AB	50
F9	240	0	0	0 AB	0
F10	120	0	0	0 B	0
F12	150	0	0	0 B	0
F14	540	0	0	0 B	0
∑MS	2812	17 (0,60)	17 (0,60)	12 (0,43)	70,59

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

Tablo 7: ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Genotip	Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)	Ginogenik Bitkiye Dönüşüm (%)
ASL3	A0	150	0	0	0	0
ASL4	A0	150	0	0	0	0
ASL5	A0	150	0	0	0	0
ASL6	A0	150	0	0	0	0
ASL3	A100	300	1 (0,33)	2 (0,67) A	1 (0,33) A	50
ASL4	A100	240	3 (1,25)	3 (1,25) A	3 (1,25) A	100
ASL5	A100	120	4 (3,33)	4 (3,33) A	4 (3,33) A	100
ASL6	A100	180	0	0	0	0
ASL3	A40	180	0	0	0	0
ASL4	A40	180	0	0	0	0
ASL5	A40	180	0	0	0	0
ASL6	A40	180	0	0	0	0
ASL3	A4100	150	2 (1,33)	2 (1,33) AB	1 (0,67) AB	50
ASL4	A4100	240	0	0 B	0 B	0
ASL5	A4100	120	8 (6,67)	9 (7,50) A	7 (5,83) A	77,78
ASL6	A4100	240	1 (0,42)	1 (0,42) AB	1 (0,42) B	100
ASL3	F	120	0	0	0	0
ASL4	F	120	0	0	0	0
ASL5	F	120	0	0	0	0
ASL6	F	120	0	0	0	0
ASL3	F4	360	4 (1,11)	4 (1,11) B	2 (0,56) B	50
ASL4	F4	330	9 (2,73)	9 (2,73) B	4 (1,21) B	44,44
ASL5	F4	90	14 (15,5)	15 (16,7) A	14 (15,6) A	93,33
ASL6	F4	270	6 (2,22)	6 (2,22) B	2 (0,74) B	33,33
ASL3	F10	150	0	0	0	0
ASL4	F10	150	0	0	0	0
ASL5	F10	150	0	0	0	0
ASL6	F10	150	0	0	0	0
ASL3	F14	120	0	0	0	0
ASL4	F14	90	0	0	0	0
ASL5	F14	90	0	0	0	0
ASL6	F14	110	0	0	0	0

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

3.2 Somatik Uyarıma Gelen Cevaplar

ASL1 ve ASL2 genotipleri için bütün besi yerlerindeki somatik cevap verme oranına bakıldı. Somatik uyarım için ASL1 genotipine ait 2369 tomurcuk BDS temelli besi yerlerine (A₀, A₅₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) kültüre alındı. Yapılan denemeler sonucunda A₅₀ besi yerine ekilen tomurcuklardan iki (% 0,67) adet somatik bitkicik elde edilmiş fakat bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. Bir başka besi yeri olan A₁₀₀ besi yerindeki tomurcuklardan 31 (% 3,69) adet bitkicik ve beş (% 0,60) adet bitki oluşmuştur. A₁₀₀ besi yerine kültüre alınan tomurcuklardan elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı % 16,13 olarak belirlenmiştir. Diğer besi yerlerinde (A₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) bitkicik ve bitki oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 8). ASL1 genotipinden MS temelli besi yerlerine (F, F2, F4, F5, F7, F9, F10, F12, F14) 4424 adet tomurcuk ekilmiş olup F4, F7, F9, F12 besi yerlerindeki tomurcuklardan farklı oranlarda cevap alınmıştır. F4 besi yerinden bir (% 0,07) adet bitkicik elde edilmiş olup bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. F7 besi yerine ekilen tomurcuklardan 127 (% 25,30) adet bitkicik ve 37 (% 7,37) adet bitki elde edilmiştir. F9 besi yerindeki tomurcuklardan 157 (% 13,41) adet bitkicik ve 75 (% 6,41) adet bitki oluşumu görülmüştür. F12 besi yerinden yalnızca bir (% 0,55) adet bitkicik eldesi sağlanmış olup bitkiye dönüşüm olmamıştır. MS temelli besi yerlerine ASL1 genotipine ait tomurcuklar ekilerek oluşan bitkiciklerden bitki elde etme oranı % 0 ile % 47,77 arasında değişiklik göstermektedir. Diğer besi yerlerinden (F, F2, F5, F10, F14) somatik bitkicik veya bitki elde edilmemiştir (Tablo 8). ASL1 genotipinin 15 adet besi yerindeki somatik bitkicik oluşturma oranları kıyaslandığında F7 ve F9 besi yeriyle diğer besi yerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Somatik bitki oluşturma oranları karşılaştırıldığında ise F7 ve F9 besi yerinin bazı besi yerleriyle (A₅₀, A₄₁₀₀, A₁₀₀, F4, F5, F14) arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. ASL2 genotipinden BDS temelli besi yerlerine 2130 adet tomurcuk ekilmiş olup toplamda 31 (% 1,45) adet bitkicik ve 11 (% 0,52) adet bitki elde edilmiştir. Bu cevaplar A₅₀ ve A₁₀₀ besi yerlerindeki tomurcuklardan gelmiştir. A₅₀ besi yerindeki tomurcuklardan iki (% 1,67) adet bitkicik elde edilmiştir ve bitkiye dönüşüm olmamıştır. A₁₀₀ besi yerindeki tomurcuklardan ise 29 (% 6,90) adet bitkicik ve 11 (% 2,61) adet bitki oluştuğu görülmüştür. A₁₀₀ besi yerine kültüre alınarak elde edilen bitkiciklerden bitkiye dönüşüm % 37,93 olarak

hesaplanmıştır. Diğer besi yerlerinden (A_0 , A_{40} , A_{50} , A_{100}) somatik bitki elde edilmemiştir (Tablo 9). ASL2 besi yeri kullanılarak MS temelli besi yerlerine 2812 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. F7, F9, F12 ve F14 besi yerlerindeki tomurcuklardan somatik cevap alınmıştır. F7 besi yerine kültüre alınan tomurcuklardan 76 (% 21,11) adet bitkicik ve 17 (% 4,72) adet bitki elde edilmiştir. F9 besi yerindeki tomurcuklardan 115 (% 47,9) adet bitkicik ve 42 (% 17,50) adet bitki elde edilmiştir. F7 ve F9 besi yerlerine kültüre alınan tomurcuklardan gelen bitkicikler için bitkiye dönüşüm oranı sırası ile % 22,37 ve % 36,52 olarak bulunmuştur. F12 besi yerine kültüre alınan tomurcuklardan dört (% 2,66) adet bitkicik ve F14 besi yerine kültüre alınanlardan iki (% 0,37) adet bitkicik olduğu gözlemlenmiştir. Bu iki besi yerinden elde edilen bitkiciklerden bitkiye dönüşüm olmamıştır. Ekilen tomurcukların cevap verdiği dört adet besi yeri için bitkicikten bitkiye dönüşüm oranı % 0 ile % 36,52 arasındadır. Diğer besi yerlerindeki tomurcuklardan ise somatik bitkicik ve bitki uyarımı için cevap alınmamıştır (Tablo 9). ASL2 genotipinden 15 adet besi yerine kültüre alınan tomurcukların somatik bitkicik oluşturma oranları karşılaştırıldığında F9 besi yerinin diğer bütün besi yerleri ile F7 besi yerinin ise A_{50} hariç bütün besi yerleri ile arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Somatik bitki oluşturma oranları kıyaslandığında ise F9 besi yerine ekilen tomurcukların diğer bütün besi yerlerine kültüre alınan tomurcuklar ile arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. ASL1 ve ASL2 genotipleri karşılaştırıldığında somatik bitkicik sayısına göre yalnızca F9 besi yerinde istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait genotiplerin somatik uyarımı için BDS (A_0 , A_{100} , A_{40} , A_{100}) ve MS (F, F4, F10, F14) temelli sekiz adet besi yeri kullanılmıştır. BDS temelli besi yerlerine 2910 adet MS temellilere 2540 olmak üzere bütün besi yerlerine toplamda 5450 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Kullanılan bu dört genotipten ASL3, ASL4 ve ASL6 genotiplerinden ve A_{100} besi yerindeki tomurcuklardan cevap alınmıştır. A_{100} besi yerine ASL3 genotipinden 300 tomurcuk ekilmiştir. Yapılan uyarım çalışması sonucunda 39 (% 13) adet somatik bitkicik ve 20 (% 6,67) adet bitki elde edilmiştir. ASL4 genotipinden 240 adet tomurcuk kültüre alınmış olup 17 (% 7,08) adet somatik bitkicik ve 12 (% 5) adet somatik bitki oluşumu görülmüştür. ASL6 genotipinden 180 adet tomurcuk A_{100} besi yerine ekilmiştir. Bu deneme sonucunda iki adet

bitkicik (% 1,11) ve iki adet bitki (% 1,11) elde edilmiştir. A₁₀₀ besi yerinden farklı genotiplerin tomurcukları kullanılarak elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı % 51,28 ve % 100 arasında değişmektedir. Diğer yedi besi yerinde (A₀, A₄₀, A₄₁₀₀, F, F₄, F₁₀, F₁₄) ASL3, ASL4 ve ASL6 genotiplerinden somatik bitkicik ve bitki oluşumu gözlenmemiştir. ASL5 genotipi için hiçbir besi yerindeki tomurcuklardan somatik bitkicik ya da bitki elde edilmemiştir (Tablo 10). ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait A₁₀₀ besi yerine kültüre alınan tomurcukların somatik bitkicik ve bitki oluşturmaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Tablo 8: ASL1 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Somatik Bitkicik Sayısı (%)	Somatik Bitki Sayısı (%)	Somatik Bitkiye Dönüşüm (%)
A40	210	0	0 C	0 AB	0
A450	120	0	0 BC	0 AB	0
A4100	720	0	0 C	0 B	0
A0	180	0	0 C	0 AB	0
A50	300	2 (0,67)	2 (0,67) C	0 B	0
A100	839	30 (3,58)	31 (3,69) C	5 (0,60) B	16,13
ΣBDS	2369	32 (1,35)	33 (1,39)	5 (0,21)	15,15
F	120	0	0 BC	0 AB	0
F2	176	0	0 C	0 AB	0
F4	1379	1 (0,07)	1 (0,07) C	0 B	0
F5	300	0	0 C	0 B	0
F7	502	117 (23,30)	127 (25,30) A	37 (7,37) A	29,13
F9	1170	118 (10,08)	157 (13,41) B	75 (6,41) A	47,77
F10	180	0	0 C	0 AB	0
F12	180	1 (0,55)	1 (0,55) C	0 AB	0
F14	417	0	0 C	0 B	0
ΣMS	4424	237 (5,35)	286 (6,46)	112 (2,53)	39,16

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

Tablo 9: ASL2 genotipinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Somatik Bitkicik Sayısı (%)	Somatik Bitki Sayısı (%)	Somatik Bitkiye Dönüşüm (%)
A4(0)	420	0	0 C	0 B	0
A4(50)	390	0	0 C	0 B	0
A4(100)	570	0	0 C	0 B	0
A(0)	210	0	0 C	0 B	0
A(50)	120	1 (0,83)	2 (1,67) BC	0 B	0
A(100)	420	29 (6,90)	29 (6,90) C	11 (2,61)	37,93
ΣBDS	2130	30 (1,40)	31 (1,45)	11 (0,52)	35,48
F	90	0	0 C	0 B	0
F2	90	0	0 C	0 B	0
F4	922	0	0 C	0 B	0
F5	300	0	0 C	0 B	0
F7	360	71 (19,7)	76 (21,11) B	17 (4,72) B	22,37
F9	240	83 (34,6)	115 (47,9) A	42 (17,50) A	36,52
F10	120	0	0 C	0 B	0
F12	150	4 (2,66)	4 (2,66) C	0 B	0
F14	540	2 (0,37)	2 (0,37) C	0 B	0
ΣMS	2812	160 (5,69)	197 (7,00)	59 (2,10)	29,95

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

Tablo 10: ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu

Genotip	Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Somatik Bitkicik Sayısı (%)	Somatik Bitki Sayısı (%)	Somatik Bitkiye Dönüşüm (%)
ASL3	A0	150	0	0	0	0
ASL4	A0	150	0	0	0	0
ASL5	A0	150	0	0	0	0
ASL6	A0	150	0	0	0	0
ASL3	A100	300	34 (11,3)	39 (13,00) A	20 (6,67) A	51,28
ASL4	A100	240	17 (7,08)	17 (7,08) A	12 (5,00) A	70,59
ASL5	A100	120	0	0	0	0
ASL6	A100	180	2 (1,11)	2 (1,11) A	2 (1,11) A	100
ASL3	A40	180	0	0	0	0
ASL4	A40	180	0	0	0	0
ASL5	A40	180	0	0	0	0
ASL6	A40	180	0	0	0	0
ASL3	A4100	150	0	0	0	0
ASL4	A4100	240	0	0	0	0
ASL5	A4100	120	0	0	0	0
ASL6	A4100	240	0	0	0	0
ASL3	F	120	0	0	0	0
ASL4	F	120	0	0	0	0
ASL5	F	120	0	0	0	0
ASL6	F	120	0	0	0	0
ASL3	F4	360	0	0	0	0
ASL4	F4	330	0	0	0	0
ASL5	F4	90	0	0	0	0
ASL6	F4	270	0	0	0	0
ASL3	F10	150	0	0	0	0
ASL4	F10	150	0	0	0	0
ASL5	F10	150	0	0	0	0
ASL6	F10	150	0	0	0	0
ASL3	F14	120	0	0	0	0
ASL4	F14	90	0	0	0	0
ASL5	F14	90	0	0	0	0
ASL6	F14	110	0	0	0	0

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

3.3 Tomurcuk Boyutunun ve Genotipin Ginogenesis Uyarımına Etkisi

ASL1 ve ASL2 genotiplerine ait tomurcuklar kullanarak tomurcuk boyutunun (büyük, orta ve küçük) ginogenesis uyarımına etkisine bakıldı. Bu denemede A₁₀₀, A₄₁₀₀, F4 ve F14 besi yerleri kullanıldı.

A₁₀₀ besi yerine ASL1 genotipinden 299 adet büyük, 180 adet orta ve 360 adet küçük, ASL2 genotipinden 240 adet büyük, 210 adet orta ve 150 adet küçük tomurcuk kültüre alındı. ASL1 genotipine ait tomurcuklardan ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu gözlenmemiştir. ASL2 genotipine ait orta büyüklükteki tomurcuklardan iki (% 0,95) adet ginogenik bitkicik ve bir adet (% 0,48) ginogenik bitki oluşumu görülmüştür. Bu genotipe ait küçük boyuttaki tomurcuklardan üç (% 2) adet ginogenik bitkicik ve üç (% 2) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. A₁₀₀ besi yerindeki tomurcuklardan elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı en az % 50 ve en fazla % 100 oranında olmuştur (Tablo 11).

A₄₁₀₀ besi yeri için ASL1 genotipinden 270 adet büyük, 270 adet orta ve 180 adet küçük, ASL2 genotipinden 300 adet büyük, 240 adet orta ve 270 adet küçük boyutta tomurcuk ekilmiştir. ASL1 genotipinin büyük boyuttaki tomurcuklarından ginogenik bitkicik ve bitki eldesi olmamıştır. Aynı genotipin orta boyuttaki üç (% 1,11) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir ve bitkiye dönüşüm olmamıştır. Küçük boyutta ekilen tomurcuklardan ise dört (% 2,22) adet ginogenik bitkicik ve dört (% 2,22) bitki oluşumu görülmüştür. ASL2 genotipine ait ekilen büyük sınıftaki tomurcuklardan bir (% 0,33) adet bitkicik elde edilmiş olup bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. Orta büyüklükteki tomurcukların kültüre alınmasıyla dört (% 1,67) adet bitkicikten iki (% 0,84) adet ginogenik bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Aynı genotipin küçük tomurcuklarından yedi (% 2,59) bitkicik ve dört (% 1,48) bitki elde edilmiştir. A₄₁₀₀ besi yerine kültüre alınan farklı boyuttaki tomurcuklardan oluşan bitkiciklerden bitki eldesinin % 0-100 arasında olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 11).

F4 besi yerine ASL1 genotipinden 450 adet büyük, 509 adet orta ve 420 adet küçük boyutta tomurcuk kültüre alınmış olup her boyuttaki tomurcuklardan

farklı oranlarda cevap alınmıştır. Büyük boyutta kültüre alınan tomurcuklarda altı (% 1,33) adet ginogenik bitkicik ve altı (% 1,33) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. Orta boyuttaki tomurcuk ekiminden 15 (% 2,95) adet ginogenik bitkicik ve 12 (% 2,36) adet ginogenik bitki oluşmuştur. Bu genotipin F4 besi yerine kültüre alınan küçük boyuttaki tomurcuklarından altı (% 1,43) adet ginogenik bitkicik elde edilmiş olup beş (% 1,19) adet bitkiye dönüşüm gözlemlenmiştir. ASL2 genotipinden F4 besi yerine 420 adet büyük, 360 adet orta ve 472 adet küçük boyutta tomurcuk ekilmiştir. F4 besi yerine ekilen ASL2 genotipine ait büyük tomurcuklardan yedi (% 1,67) adet bitkicik ve altı (% 1,43) adet bitki oluşmuştur. Aynı genotipin orta büyüklükteki tomurcukları kullanıldığında iki (% 0,56) adet ginogenik bitkicik ve bir (% 0,28) adet ginogenik bitki elde edilmiştir. ASL2 genotipinin F4 besi yerine ekilen küçük tomurcuklarından 10 (% 2,12) adet bitkicik ve beş (% 1,06) adet ginogenik bitki oluşmuştur. F4 besi yerinden her iki genotipe ait tomurcuklar kullanılarak elde edilen bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı en az % 50 ve en fazla % 100 olarak hesaplanmıştır (Tablo 11).

F14 besi yerine ASL1 genotipine ait tomurcuklardan 180 adet büyük, 297 adet orta ve 300 adet küçük tomurcuk ekilmiştir. ASL2 genotipinden ise aynı besi yerine 180 adet büyük, 240 adet orta ve 270 adet küçük boyutta tomurcuk kültüre alınmıştır. F14 besi yerinden ASL1 ve ASL2 genotiplerinin büyük, orta ve küçük tomurcuklarından bitkicik ve bitki oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 11).

Tablo 11: ASL1 ve ASL2 genotiplerinin MS ve BDS temelli besi yerlerindeki tomurcuk boyutuna göre ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Genotip	Besi Yeri Adı	Tomurcuk Boyutu	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)	Ginogenik Bitkiye Dönüşüm (%)
ASL1	A100	BÜYÜK	299	0	0	0	0
ASL1	A100	ORTA	180	0	0	0	0
ASL1	A100	KÜÇÜK	360	0	0	0	0
ASL2	A100	BÜYÜK	240	0	0	0	0
ASL2	A100	ORTA	210	2 (0,95)	2 (0,95) A	1 (0,48) A	50
ASL2	A100	KÜÇÜK	150	3 (2,00)	3 (2,00) A	3 (2,00) A	100
ASL1	A4100	BÜYÜK	270	0	0	0 B	0
ASL1	A4100	ORTA	270	3 (1,11)	3 (1,11) A	0 B	0
ASL1	A4100	KÜÇÜK	180	3 (1,67)	4 (2,22) A	4 (2,22) A	100
ASL2	A4100	BÜYÜK	300	1 (0,33)	1 (0,33) A	0	0
ASL2	A4100	ORTA	240	4 (1,67)	4 (1,67) A	2 (0,84) A	50
ASL2	A4100	KÜÇÜK	270	7 (2,59)	7 (2,59) A	4 (1,48) A	57,14
ASL1	F4	BÜYÜK	450	4 (0,89)	6 (1,33) A	6 (1,33) A	100
ASL1	F4	ORTA	509	11 (2,16)	15 (2,95) A	12 (2,36) A	80
ASL1	F4	KÜÇÜK	420	5 (1,19)	6 (1,43) A	5 (1,19) A	83,33
ASL2	F4	BÜYÜK	420	7 (1,67)	7 (1,67) A	6 (1,43) A	85,71
ASL2	F4	ORTA	360	2 (0,56)	2 (0,56) A	1 (0,28) A	50
ASL2	F4	KÜÇÜK	472	7 (2,12)	10 (2,12) A	5 (1,06) A	50
ASL1	F14	BÜYÜK	180	0	0	0	0
ASL1	F14	ORTA	297	0	0	0	0
ASL1	F14	KÜÇÜK	300	0	0	0	0
ASL2	F14	BÜYÜK	180	0	0	0	0
ASL2	F14	ORTA	240	0	0	0	0
ASL2	F14	KÜÇÜK	270	0	0	0	0

* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

3.4 Çalışma sonucunda elde edilen *A. sandrasicum* bitkilerinin ploidi seviyeleri

A. sandrasicum'da yapılan uyartım çalışmaları sonucunda elde ginogenik ve somatik edilen bitkiler 3-4 yapraklı aşamaya geldiklerinde ploidi analizi yapıldı. Bütün genotiplerden toplamda 58 ginogenik ve 99 somatik bitki flow sitometri kullanılarak test edildi. İç kontrol olarak *Lactuca sativa* (marul) kullanılmıştır. *L. sativa*'nın DNA miktarı 5,47 pg/2C olarak alınmıştır

(Arumuganathan ve Earle, 1991). Flow sitometri analizi yapılan bitkilerin nükleer DNA miktarı hesaplanırken “Örneğin nükleer DNA miktarı = (Örnek *A. sandrasicum* bitkisinden çıkan floresan değeri / *Lactuca sativa*’nın floresan değeri) X 5,47 pg (Kontrol olarak kullanılan *Lactuca sativa*’nın DNA miktarı” şeklinde bir formül kullanılarak analizi yapılan örneğin DNA miktarı ve ploidi seviyesi tespit edilmiştir(Arumuganathan ve Earle, 1991). Donör olarak kullanılan bitkilerin nükleer DNA miktarı 29,54 ±1,68 pg/2C olarak tespit edildi. Nükleer DNA miktarı donör bitkinin nükleer DNA miktarına yakın olan bitkiler diploid (2x), yaklaşık iki katına (59,09 ±3,33 pg/2C) yakın olanlar tetraploid (4x), yarısına (14,77 ±0,83 pg/2C) yakın olan bitkiler haploid (x) olarak belirlendi. Bazı bitkilerin de miksoploid (x+2x, 2x+4x)olduğu tespit edildi.

Analizi yapılan 59 ginogenik bitkinin 32 (% 54,24) tanesi haploid, 16 (% 27,12) tanesi diploid ve 11 (% 18,64) tanesi miksoploid olarak tespit edilmiştir. ASL1 genotipinden 10 (% 43,5) adet haploid, yedi (% 30,4) adet miksoploid ve altı (% 26,1) adet diploid bitki elde edilmiştir. ASL2 genotipinden elde edilen ginogenik bitkiler analiz edildiğinde 12 (% 66,7) adet haploid, 2 (% 11,1) adet miksoploid ve 4 (% 22,2) adet diploid bitki tespit edilmiştir. ASL3 genotipine ait elde edilen ginogenik bitkilerden yalnızca iki tanesi flow analizi için uygun aşamaya gelmiş olup, analiz sonucunda iki bitkinin de diploid olduğu belirlenmiştir. ASL4 genotipinden beş adet bitki analiz edilmiş, üç (% 60) adet haploid, bir (% 20) adet miksoploid ve bir (% 20) adet diploid bitki elde edildiği gözlemlenmiştir. ASL5 genotipine ait 10 adet bitki test edilmiştir ve bunun sonucunda yedi (% 70) adedinin haploid, bir (% 10) adedinin miksoploid ve iki (% 20) adedinin diploid kromozom sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. ASL6 genotipinden sadece bir bitkinin DNA miktarına bakılmıştır ve elde edilen bu bitkinin diploid olduğu belirlenmiştir (Tablo 12).

Deneme sonucunda 99 tane somatik bitkinin flow sitometri ile DNA miktarı test edilmiş, 84 (% 84,84) adet diploid, 3 (% 3,03) adet miksoploid ve 12 (% 12,12) adet tetraploid bitkinin elde edildiği görülmüştür. ASL1 genotipinden elde edilen somatik bitkilerden 50 tanesi test edilmiş; 43 (% 86) adet diploid, iki (% 4) adet miksoploid ve beş (% 10) adet tetraploid bitki elde edildiği belirlenmiştir. ASL2 genotipine ait analizi yapılan 43 bitkiden 37 (% 86,04) adet

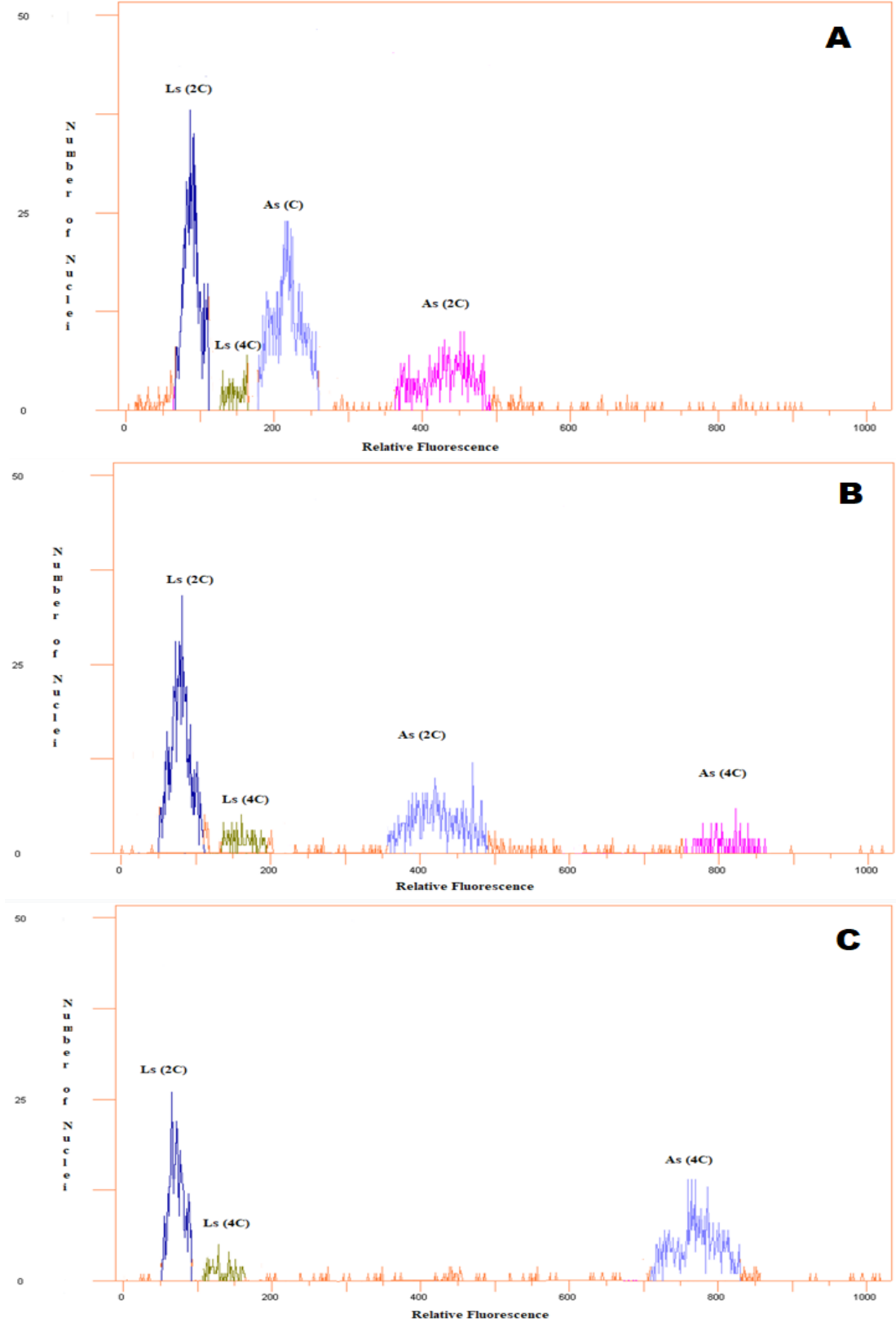
diploid ve altı (% 13,96) adet tetraploid bitki elde edilmiştir. ASL4 genotipinden sadece dört bitkinin DNA miktarı test edilmiştir ve bütün bitkilerin diploid olduğu tespit edilmiştir. ASL6 genotipinden iki adet bitki test edilmiş, bir adedinin miksoploid ve bir adedinin tetraploid olduğu görülmüştür. ASL3 ve ASL5 genotiplerine ait somatik bitkiler yeterince büyümediği için ploidi analizi yapılmamıştır (Tablo 13).

Tablo 12 : Elde edilen ginogenik bitkilerin farklı *A. sandrasicum* genotiplerine göre ploidi seviyeleri

Genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi düzeyi		
		x (%)	x+2x (%)	2x (%)
ASL1	23	10 (43,5)	7 (30,4)	6 (26,1)
ASL2	18	12 (66,7)	2 (11,1)	4 (22,2)
ASL3	2	0	0	2 (100)
ASL4	5	3 (60)	1 (20)	1 (20)
ASL5	10	7 (70)	1 (10)	2 (20)
ASL6	1	0	0	1 (100)
Toplam	59	32 (54,2)	11 (18,6)	16 (27,1)

Tablo 13: Elde edilen somatik bitkilerin *A. sandrasicum* genotiplerine göre ploidi seviyeleri

Genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi düzeyi		
		2x (%)	2x+4x (%)	4x (%)
ASL1	50	43 (86,00)	2 (4,00)	5 (10,00)
ASL2	43	37 (86,04)	0	6 (13,96)
ASL3	0	0	0	0
ASL4	4	4 (100)	0	0
ASL5	0	0	0	0
ASL6	2	0	1 (50)	1 (50)
Toplam	99	84 (84,84)	3 (3,03)	12 (12,12)

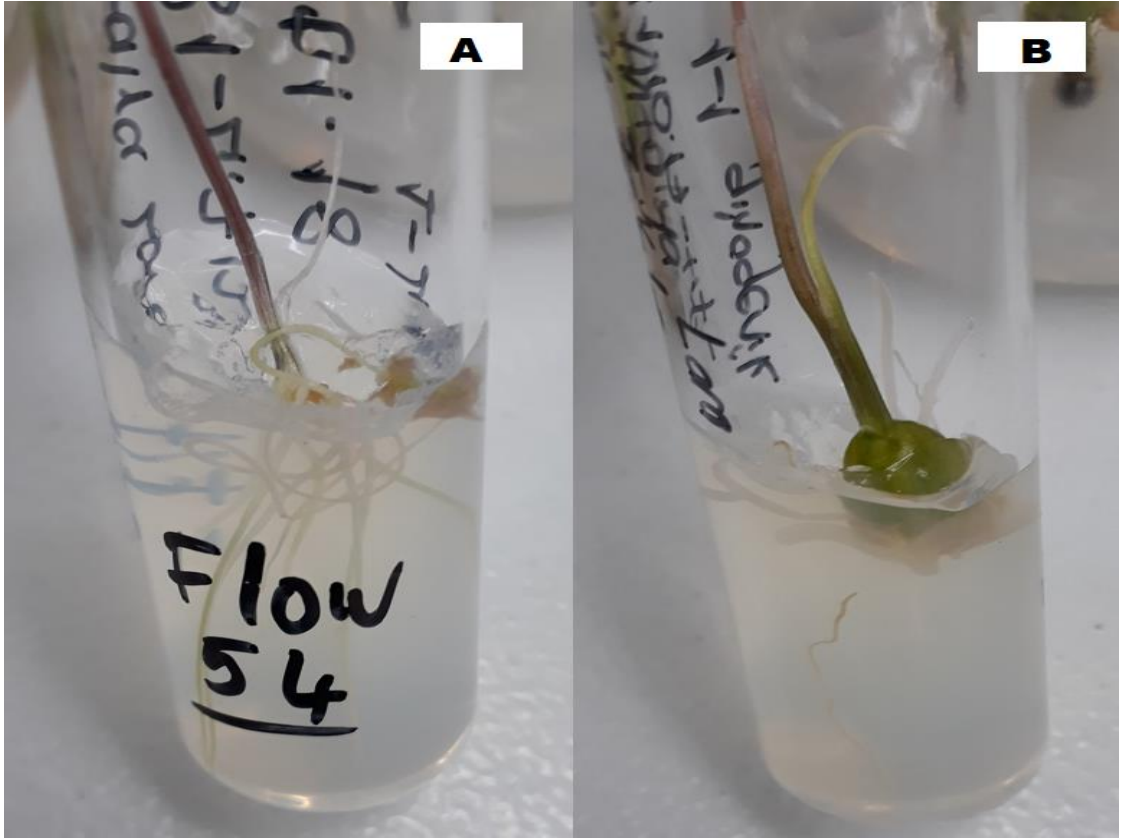


Şekil 5: *A. sandrasicum* materyallerinin flow sitometri analizi sonucu elde edilen histogramlar (Ls: *Lactuca sativa*, As: *Allium sandrasicum*)

A. Haploid (x) *A. sandrasicum* bitkisi **B.** Diploid ($2x$) *A. sandrasicum* bitkisi **C.** Tetraploid ($4x$) *A. sandrasicum* bitkisi

3.5 Elde edilen bitkilerde yapılan gözlemler

A. sandrasicum'da farklı genotiplerden somatik ve ginogenik uyartım sonucu birçok bitki edilmiştir. Elde edilen bitkilerde *in vitro* ortamında kendi coğrafyasında büyürken görülmeyen kök kısımlarında tüberli yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Resim 6). Bu yapıların bitki gelişimini, yaprakların belli bir büyüklükten sonra uzamasını ve sayıca artmasını olumsuz yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Doku kültürü ile elde edilen bitkilerde albino bitki oluşumu genellikle olmaktadır. Bu durum doku kültürü uygulamalarında büyük bir sorun iken, bu çalışmada albino bitki oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 6 : Tüplere aktarılan *A. sandrasicum* bitkilerinin farklı kök gelişimleri

A. Beklenen şekilde kök gelişimi olan bitki **B.** Kök kısmın da tüber oluşturan bitki

3.6 Dış Ortama Aktarılan Bitkilerdeki Gözlemler

Ploidi analizi yapılan bitkilerin 82 tanesi dış ortama adaptasyon için saksılara transfer edilmiştir. Bitkilerin 46 (% 56,09) tanesinin adaptasyon sırasında öldüğü gözlemlenmiştir ve ölen bitkiler kayıt altına alınmıştır. Yaşayan bitkilerin ploidi seviyelerine göre boylarının ortalaması ve yalancı gövde çaplarının ortalaması Tablo 14’de gösterilmiştir.

Tablo 14: Dış ortama aktarılan bitkilerin ploidi seviyesine göre boy ve yalancı gövde çap ortalamaları

Ploidi Seviyesi	Toprağa Aktarılan Bitki Sayısı	Yaşayan Bitki Sayısı (%)	Bitkilerin Boyları ortalaması (cm)	Bitkilerin Yalancı Gövde Çapları Ortalaması (mm)
Haploid (x)	4	1 (25)	13	0,53
Miksoploid (x+2x)	1	0	-	-
Diploid (2x)	68	30 (44,12)	27,36 (\pm 5,72)	1,18 (\pm 0,36)
Tetraploid (4x)	9	5 (55,56)	28,4 (\pm 6,80)	1,42 (\pm 0,31)

4. TARTIŞMA

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre *A. sandrasicum* türüne ait genotiplerin ginogenesis ve somatik uyartıma cevap verdiği fakat bu cevabın farklı oranlarda olduğunu göstermiştir. Literatüre bakıldığında bu tür için yapılan ginogenesis çalışması olmadığı belirlenmiştir. Literatürdeki *Allium*'larla ilgili ginogenesis çalışmaları bulunmaktadır ve bu çalışmalar için farklı *Allium* türleri kullanılmıştır. Bu türler arasında *A. cepa* ve *A. ampeloprasum* en çok çalışma yapılanlardan bazılarıdır. Birçok araştırmacı tarafından yapılan *A. cepa*'da haploid bitki eldesi farklı oranlarda sağlanmıştır (Campion ve diğ., 1992; Bohanec ve diğ., 1995; Alan ve diğ., 2003). *A. ampeloprasum* türüne ait ginogenesis çalışmalarından çok düşük oranda ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Schum ve diğ., 1993). Fakat *A. sandrasicum* şu ana kadar yapılmış herhangi bir ginogenesis çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada toplamda altı *A. sandrasicum* genotipinden büyük, orta ve küçük boyutta yaklaşık 20 bin adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Altı tanesi BDS temelli (A_0 , A_{50} , A_{100} , A_{40} , A_{450} , A_{4100}) ve dokuz tanesi MS (F, F2, F4, F5, F7, F9, F10, F12, F14) temelli olmak üzere toplamda 15 adet besi yeri ortamı denenmiştir. Bütün besi yeri ortamları iki genotipe (ASL1 ve ASL2) denenmiş, ginogenesis için iyi cevap verenlere diğer dört genotip (ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6) kültüre alınmıştır. Tomurcuk boyutunun etkisini anlamak için kurulan deneyde BDS ve MS temelli bitki büyüme düzenleyici içeren (A_{100} ve F14) ve içermeyen (A_{4100} ve F4) besi yerleri kullanılmıştır.

ASL1 ve ASL2 genotipleri için 15 adet besi yeri denenmiştir. ASL1 genotipine ait kültüre alınan tomurcukların ginogenik bitkicik oluşturma oranı % 0,34 ile % 2,68 arasında değişmektedir. ASL2 genotipine ait tomurcukların ekiminden elde edilen verilere bakıldığında cevap verme oranının % 0,55 ile % 5,55 olduğu görülmektedir. ASL1 ve ASL2 genotipleri için en yüksek oran sırasıyla F4 ve F2 besi yerlerindeki çiçek tomurcuklarından gelmiştir. Bu iki besi yerinin ortak özelliği MS temelli olması, bitki büyüme düzenleyici içermemesi ve 50 g/l ve üzeri sukroz içermesi olarak belirlenmiştir. *Allium*'lar ile ilgili daha önce yapılan ginogenesis çalışmaları bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile paralellik

göstermektedir (Celebi-Toprak ve diğ., 2016; Alan ve diğ., 2016b; Celebi-Toprak ve diğ., 2017; Akgün, 2018). Alan ve diğ. (2016b) pırasada yaptıkları çalışmada 133 (% 0,58) adet ginogenik birki elde etmişlerdir. Ayrıca Celebi-Toprak ve diğ. (2016) yine pırasa üzerindeki denemelerinde Bitki büyüme düzenleyici içermeyen ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerine ekilen tomurcuklardan yüksek oranda (% 5) ginogenik bitki elde etmişlerdir.

ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerine ait tomurcuklar için dört tane BDS temelli ve dört adet MS temelli besi yeri denenmiştir. Kullanılan sekiz besi yerine ekilen tomurcuklardan üç tanesindeki tomurcuklar ginogenesis uyartımına cevap vermiştir (A₁₀₀, A₄₁₀₀, F4). Cevap alınan üç besi yerindeki tomurcuklardan bitkicik elde etme oranı dört genotip için % 0,42 ile % 16,7 arasındadır. En iyi cevabın ASL5 genotipinin F4 besi yerine kültüre alınan tomurcuklarından geldiği; üç besi yeri göz önüne alındığında her birinde de en yüksek oranın yine bu genotipten geldiği gözlenmiştir. F4 besi yerinde 100 g/l sukroz bulunmaktadır ve bitki büyüme düzenleyici içermektedir. Elde edilen veriler Celebi-Toprak ve diğ. (2016) yaptığı çalışma ile desteklenmektedir. A₁₀₀ besi yeri BDS temelli olup 2 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4-D içermektedir. *A. cepa*'da yapılan çalışmada (Kaska, 2013) tomurcukların en iyi cevap verdiği besi yeri kombinasyonu % 0,62 ile A₁₀₀ olmasına rağmen bu çalışmada cevap oranı bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerlerindeki tomurcuklarda daha yüksek orandadır.

Çiçek tomurcukları kullanılarak somatik bitki eldesi de sağlanabilir. Somatik uyartım denemelerinde de ASL1 ve ASL2 genotipleri için 15 adet besi yeri kullanılmıştır. ASL1 genotipinden % 0,07 ile % 25,30 arasında somatik bitkicik eldesi sağlanmıştır. 15 besi yerinden altı tanesinde somatik rejenerasyon gözlemlenmiştir ve en iyi cevaplar F7 (% 25,30) ve F9 (% 13,41) besi yerlerine ekilen tomurcuklardan gelmiştir. ASL2 genotipine ait kültüre alınan tomurcukların cevap verdiği altı besi yerindeki bitkicik oluşturma oranı % 0,37 ile % 47,9 arasında değişmektedir. En iyi cevaplar ASL2 genotipi için de F7 (% 21,11) ve F9 (% 47,9) besi yerlerine kültüre alınan tomucuklardan elde edilmiştir. F7 ve F9 besi yerlerine bakıldığında her ikisi de bitki büyüme düzenleyici içermektedir (8 mg/l 2IP ve 1mg/l NAA). Her iki genotipin de cevap verdiği besi yerleri değerlendirildiğinde bir tanesi dışında (F4) hepsinin bitki büyüme

düzenleyici ve 50 g/l ve üzeri sukroz içerdiği gözlemlenmiştir. Somatik rejenerasyon için bitki büyüme düzenleyicisinin varlığının etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı besi yeri kombinasyonu Kaska (2013) tarafından *A. cepa*'da da kullanılmıştır ve somatik bitki elde edildiği gösterilmiştir. Kaska (2013) aynı besi yerlerini kullanarak kültüre aldığı *A. cepa* tomurcuklarından 3230 (% 4,27) somatik sürgün elde etmiştir.

ASL3, ASL4, ASL5 ve ASL6 genotiplerinin somatik rejenerasyonu için ginogenesis uyartımında denenmiş sekiz adet besi yeri kullanılmıştır. Sekiz besi yeri içerisinde sadece A₁₀₀ besi yerine kültüre alınan ASL3, ASL4 ve ASL6 genotipleri somatik uyartıma cevap vermiştir. Cevap verme oranı % 1,1 ile % 13 arasında değişmektedir. En iyi cevap ASL1 genotipinden gelmiştir. ASL5 genotipine ait tomurcuklardan somatik cevap alınmamıştır. A₁₀₀ besi yerinin içeriğine bakıldığında bitki büyüme düzenleyici ve 100 g/l sukroz içerdiği görülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi yerlerinin *Allium*'larda somatik embriyogenesisi tetiklediği başka çalışmalarda da belirtilmiştir (Yan ve diğ., 2009; Luciani ve diğ., 2006).

Ovüllerin gelişim aşamasının haploid bitki elde etme sürecine etkisi olduğu bilinmektedir (Chen ve diğ., 2011). *A. sandrasicum* için ovül gelişiminin etkisini anlayabilmek amacıyla farklı boyutlardaki açmamış çiçek tomurcuklarının haploid bitki elde etme oranı araştırılmıştır. Tomurcuk boyutunun ginogenesis uyartımına etkisi için oluşturulan deneyde ekilen tomurcukların dört adet besi yerinden üç (A₁₀₀, A₄₀₀, F4) tanesine cevap verdiği bir (F14) tanesinden ise cevap alınmadığı tespit edilmiştir. Üç besi yerindeki cevap veren tomurcuklardan elde edilen oranlar % 0,33 ile % 2,95 arasında değişiklik göstermektedir. En iyi cevaplar orta ve küçük büyüklükteki tomurcuklardan gelmiştir. Daha önce Alan ve diğ., (2004) tarafından yapılan çalışmada tomurcuk boyutunun bir *Allium* türü olan *A. cepa*'da ginogenesisise etki ettiği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada tomurcuk boyutunun *A. sandrasicum* türünde de dişi gametten haploid bitki oluşturma oranını etkilediği gösterilmiştir.

Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre altı adet *A. sandrasicum* genotipine ait tomurcukların MS ve BDS temelli besi yerlerine verdiği cevaplar farklılık göstermektedir. Bohanec (2002) tarafından yapılan dişi gametten haploid

bitki üretimi çalışmalarında MS ve BDS temelli besi yerlerine kültüre alınan tomurcukların cevap verme oranının benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Tüm besi yerleri ve tüm genotipler göz önünde bulundurulduğunda ginogenesis uyartımına en iyi cevap veren tomurcukların besi yeri içeriği tüm genotipler için bitki büyüme düzenleyici içermeyen ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerinde olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar *A. ampeloprasum*'da yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (Schum ve diğ., 1993; Celebi-Toprak ve diğ., 2016; Akgün, 2018). 50 g/l ve üzeri sukroz konsantrasyonun da uyartıma katkısı olduğu bu çalışma ile elde edilen veriler sonucunda gösterilmiş, Alan ve diğ. (2016b) tarafından yapılan çalışmalar da bu sonucu desteklemiştir. Somatik embriyogenesis oluşumu için bitki büyüme düzenleyici içeren besi yerlerine ekilen tomurcuklardaki cevap oranının içermeyenlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kaska (2013) tarafından yapılan çalışma bu sonucu desteklemektedir.

Ginogenik ve somatik uyartım sonucu elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerini tespit etme için hızlı ve güvenilir bir yöntem olan flow sitometri tekniği kullanılmıştır. Flow sitometri analizi için örneğin dokusu uygun bir iç kontrol ve gerekli boyalar ile hazırlanır ve ploidi seviyesi belirlenebilir (Alan ve diğ., 2007). Toplamda bütün besi yeri ve genotipler ele alındığında 59 adet ginogenik ve 99 adet somatik bitkinin ploidi seviyesi tespit edilmiştir. Donör olarak kullanılan bitkilerin nükleer DNA miktarı $29,54 \pm 1,68$ pg/2C olarak tespit edildi. Bulunan bu DNA miktarına göre ginogenik bitkilerin % 54,2'si haploid (x), % 18,6'sı miksoploid (x+2x) ve % 27,1'i diploid (2x) olarak tespit edilmiştir. Diploid olarak belirlenen bitkiler haploid bitkilerin kendiliğinden diploid olması ile oluşmuş olabilir. Daha önceki çalışmalarda bu tür durumlara rastlanmıştır (Campion ve diğ., 1995; Geoffriau ve diğ., 1997; Alan ve diğ., 2007). Somatik bitkilerin % 84,84'ü diploid (2x), %3,03'ü miksoploid (2x+4x) ve % 12,12'si tetraploid (4x) olarak bulunmuştur. *In vitro* ortamda yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında bu tür ploidi farklılıkları olabildiği bazı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Tashiro ve Hashimoto, 1985; Sulistyaningsih ve diğ., 2006). Kök hücrelerini boyama ile kromozom sayımı yapmak çok uzun zaman almaktadır bu yüzden flow sitometri kısa sürede güvenilir sonuçlar almak için etkili bir yöntemdir. Kök boyama ile bir günde en

fazla 10-15 adet örnek incelenebiliyorken, flow sitometri ile bu sayı 100 örnek üzerindedir.

Bu çalışma *A. sandrasicum* türünün doku kültürü ortamında ginogenesis ve somatik uyartıma nasıl cevap vereceğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Kültüre alınan *A. sandrasicum* tomurcuklarından hem ginogenik hem de somatik olarak cevap alınmış olup cevap verme oranı genotip, besi yeri içeriği ve tomurcuk büyüklüğüne göre değişmektedir. Literatüre bakıldığında daha önce böyle bir çalışmanın yapılmadığı görülmüştür. İlk defa bu türün genotipleri kullanılarak homozigot hatlar elde etme ve bu elde edilen hatların gelecekte hibrit potansiyellerinin araştırılması konusunda önem taşımaktadır.

5. KAYNAKLAR

Akgün, S., “Farklı Sukroz Konsantrasyonlarının Pırasada (*Allium ampeloprasum* L.) Ginogenesis Uyartımına Etkilerinin Araştırılması” , Yüksek Lisans, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2018).

Alan, A.R., Mutschler, M.A., Brants, A., Cobb, E., Earle, E.D. “Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn”, *Plant Sci.* 165, 1201–1211, (2003).

Alan A. R., Brants A., Cobb E., Goldschmied P. A., Mutschler M.A., Earle E.D., “Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials”, *Plant Science*, 167, 1055–1066, (2004).

Alan, A.R., Lim, W., Mutschler, M.A., Earle, E.D., “Complementary strategies for ploid manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.)”, *Plant Science*, 173, 25–31, (2007).

Alan, A.R., Çelebi-Toprak, F., Kaka, A., “Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants”, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 125:249-259, (2016a).

Alan, AR., Celebi-Toprak, F., “Ploidy manipulation strategies for economically important *Allium* crops”. *European Biotechnology Conference*, Riga, Latvia. *Journal of Biotechnology*, 231:S31 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.127, (2016b).

Altan, T., *Doğal bitki örtüsü*. Ç.Ü. Zir. Fak. ders kitapları, genel yayın No: 235, yayın no: A-76. 1. baskı s.87-90, (2000).

Arumuganathan, K. & Earle, E.D., “Nuclear DNA content of some important plant species”, *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208-218, (1991).

Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P. & Djilianov, D. “*In vitro* production of haploid plants”, *World Journal Of Microbiology and Biotechnology*, 11, 400-408, (1995).

Bhagyalakshmi N., “Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron”, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 58:205–211, (1999).

Bhat J.G.,Murthy H.N., “Factors affecting in vitro gynogenic haploid production in Niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.)”, *Plant Growth Regul.*, 52:241–248, (2007).

Bijl, J.R., “*Allium*-flowering onions”, *Herbertia* 50:88-94, (1995).

Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. & Bergner, A.D., “A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*”, *Science*, 55, 646-647, (1922).

Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A., Javornik, B., “Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants”, *Plant Sci.*, 104, 215–224, (1995).

Bohanec, B., Jakse, M., “Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions”, *Plant Cell Reports*, 18, 737-742, (1999).

Bohanec, B., “Doubled-haploid onions, p. 145-157, In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds). *Allium Crop Science: Recent advances.*”, CABI. Wallingford. UK., (2002).

Campion, B., Alloni, C., “Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules”, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 20, 1–6, (1990).

Campion, B., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M., Falavigna, A., “Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis”, *Plant Sci.* 86, 97–104, (1992).

Campion, B., Perri, E., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M., “Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.)”, *Plant Breed.* 114 :243–246, (1995).

Castillo, A. & Cistué, L., “Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L.”, *Plant cell reports*, 12, 139-43, . (1993).

Celebi-Toprak, F., Kaska, A., Alan, A.R., “Gynogenesis induction in *Allium tuberosum* L.”, *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 41, (2013).

Celebi-Toprak, F., Alan, A.R., “Optimization of gynogenesis induction in leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*)”. *European Biotechnology Conference*, Riga, Latvia. *Journal of Biotechnology*, 230:S30 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.126. (2016).

Celebi-Toprak, F., Akgün, S. and Alan, A.R., “Importance of Sucrose in Gynogenesis Induction in Two Turkish leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) lines”. *The 3rd International Symposium on Euro Asian Biodiversity Minsk - BELARUS* Page.98, (2017).

Chase, M. W., Reveal, J. L. ve Fay, M. F., “A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and

Xanthorrhoeaceae”, *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 : 132 – 136, (2009) .

Chen, J.F., Cui, L., Malik, A.A. & Mbira, K.G. “*In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture”, *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 104, 311-319, (2011).

De Hertogh, A.A. & Zimmer, K. *Allium* ornamental species. p.187-200. In: A. A. De Hertogh & M. Le Nard (eds.), *The Physiology of flower bulbs*, Chapter 12. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, (1993).

De Laat A.M.M., Gohde, W., Vogelzakg, M.J.D.C., “Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry”, *Plant Breed*, 99:303–307, (1987).

De Sarker, D., Johnson, M.A.T., Reynolds, A. ve Brandham, P.E. Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (*Alliaceae*), and of some Eurasian relatives. *Botanical Journal of the Linnean Society* 124, 361–373, (1997).

Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q., Lou Q.F., Chen J.F., “Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers”, *Sci Horti* 119:246–251, (2009).

Dolezel, J., Lucretti, S., Schubert, I., “Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry” *Crit Rev Plant Sci.*, 13:275–309, (1994).

Dunstan, D. I., Short K.C., “Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium Cepa*”, *Physiologia Plantarum*, 41, 70-72, (1977).

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. and Adıgüzel, N., “Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. (Eğrelti ve tohumlu Bitkiler)”, Ankara, 196s., (2000).

Forster B.P., Herberle-Bors E., Kasha K.J., Touraev A., “The resurgence of haploids in higher plants”, *Trends Plant Sci* 12(8):368–375, (2007).

Friesen, N., Fritsch, R.M. & Blattner, F.R., “Phylogeny and new infrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences” *Aliso* 22: 372–395, (2006).

Fritsch, R.M. ve Frisen, N., Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch, H.D., Currah, L. (Eds). *Allium* Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing, New York. pp. 5-30, (2002).

Ge'mes-Juha'sz A., Balogh P., Ferenczy A., Kristo'f Z., "Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Plant Cell Rep* 21:105–111, (2002).

Gioffriau E., Kahane R., Rancillac M., "Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.)", *Euphytica* 94:37–44, (1997).

Guha S., Maheshwari S.C., "In vitro production of embryos from anthers of *Datura*", *Nature*, 204:497–498, (1964).

Güner, A., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, 1290 pp., (2012).

Hao, J., You, C., Deng, X., "Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus", *Plant Cell Rep.*, 20:1123–1127, (2002).

Hosemans D., Bossoutrot D., "Induction of Haploid Plants from *in vitro* Culture of Unpollinated Beet Ovules (*Beta vulgaris* L.)", *Z Pflanzenzt~cht* 91:74-77, (1983).

Kamenetsky, R. and Fritsch, R., "Ornamental *Alliums*." Invited Review. p.409-430. In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.), CAB International Allium Crop Science: Recent Advances. Wallington, UK., (2002).

Karagüzel, Ö and Baktir, İ., "The Effects of Cold Treatments on Growth and Flowering Characteristics of Endemic *Allium sandrasicum* L. Bulbs under Antalya Ecological Conditions", *Acta Hort.*, 886:123-130, (2011).

Kasha, K.J. (ed), Haploids in higher plants: advances and potential, The Office of Continuing Education, University of Guelph Press, Guelph, (1974).

Kaska, A., "Bazı yenilebilir *Allium* Türlerinde Ginogenesis Uyarımı Ve Klonal Çoğaltma Olanaklarının Araştırılması" , Doktora, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2013).

Keller, J. "Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)", *Euphytica*, 47, 241–24, (1990).

Keller J., Korzun L., "Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species", In: Jain MS, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants, vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 51–75, (1996).

Kielkowska, A., Adamus, A., "In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.)", *Plant Cell Tiss Org Cult*, 102:309–319, (2010).

- Luciani, G. F., Ana K. M., Pellegrini, C. & Curvetto, N. R. "Effects of Explants and Growth Regulators in Garlic Callus Formation and Plant Regeneration.", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87:139-43, (2006).
- Mukhambetzhanov, S.K., "Growth and morphogenesis of nonfertilized ovaries of wheat *in vitro*", PhD Thesis, Main Botanical Garden Acad. of Sci. of Kazakhstan, Alma-Ata, (1992).
- Murashige, T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cell culture, *Plant Physiology*, 15, 473-497, (1962).
- Muren, R.C., "Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion", *HortScience*, 24, 833–834, (1989).
- Nguyen, N. H., Driscoll, H. E., & Specht, C. D., "A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(3), 1157-1172, (2008).
- Ochatt, S. J., "Flow cytometry in plant breeding", *Cytometry Part A*, 73A(7), 581-598, (2008).
- Özhatay, N., *Allium* L. In: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K.H.C. (Eds), *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Vol. 11., Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, pp. 224–232, (2000).
- Özhatay, N., "Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers", *Pure Appl. Chem.*, 74(4):547-555, (2002).
- Ramulu, K.S., Dijkhuis, P., "Flow cytometric analysis of polysomaty and in vitro genetic instability in potato", *Plant Cell Rep.*, 5:234–237, (1986).
- San Noeum L.H., "Haploides d'*Hordeum vulgare* L. Par culture *in vitro* d'ovaries non fécondes", *Ann Amélior Plant* 26: 751–754, (1976).
- San Noeum L.H., Gelebart P., *Production of gynogenic haploids*. In: Vasil IK (ed) *Cell culture and somatic cell genetics of plants* vol 3. Academic, New York, pp 305–322, (1986).
- Schum, A., Mattiesch, I., Timmann, E., Hofmann, M., "Regeneration of diploids via gynogenesis in *Allium porrum* L.", *Gartenbauwissenschaft*, 58,227–232, (1993).
- Shalaby T.A., "Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (*Cucurbita pepo* L.) as affected by different genotypes", *J Agric Res Tanta Univ* 32:173–183, (2006).

Shalaby, T.A. “Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.)”, *Sci. Hortic.* 115, 1–6, (2007).

Sulistyaningsih, E., Aoyagi, Y. & Tashiro, Y., “Flower Bud Culture of Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) with Cytogenetic Analysis of Resulting Gynogenic Plants and Somaclones”, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 86:249-255, (2006).

Tashiro, Y., Hashimoto, H., Miyazaki, S. and Kanazawa, K., “*Allium* protoplasts isolated from different organs and tissues”, *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.*, 57: 115-119, (1984).

Thomas D.T., Bhatnagar A.K., Razdan M.K., Bhojwani S.S., “A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba* L.”, *Euphytica*, 110:169–173, (1999).

Truong-Andre, I. & Demarly, Y., “Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of gynogenetic plant. Z.”, *Pflanzenzucht*, 92:309–320, (1984).

Van Duren, M., Morpurgo, R., Doležal, J., Afza, R., “Induction and verification of autotetraploids and diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques”, *Euphytica*, 88:25–34, (1996).

Van Geyt, J., Speckmann, G.J., D'Halluin, K. & Jacobs, M., “*In vitro* Induction of Haploid Plants from Unpollinated Ovules and Ovaries of the Sugarbeet (*Beta Vulgaris* L.)” *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 73, no. 6, pp. 920–925, (1987).

Wheeler, E.J., Mashayekhi, S., Mcneal, D.W., Columbus, J.T. & Pires, C., “Molecular Systematics Of *Allium* Subgenus Amerallium (Amaryllidaceae) in North America”, *American Journal of Botany*, 100(4), 701-711, (2013).

Wu B.J. & Chen K.C., “Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L.”, *Acta Botanica Sinica*, 24:125–129, (1982).

Yan, M.M., Xu, C., Kim, C., Um, Y., Bah, A. A., & Guo, D., “Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*)”, *Scientia Horticulturae*, 123(1), 124-128, (2009).

Zhang Y.X., Lespinasse Y. & Chevreau E. “Induction of haploidy in fruit trees”, *Acta Hort.* 280: 293–304, (1990).

Zonneveld B.J.M., Van Iren, F., “Genome size and pollen viability as taxonomic criteria: Application to the genus *Host*”, *Plant Biol.*, 3:176–185, (2001).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Esra ELVER
Doğum Yeri ve Tarihi	: Denizli – 24.11.1990
Lisans Üniversitesi	: Boğaziçi Üniversitesi
Elektronik posta	: esra.aslan.bu@gmail.com
İletişim Adresi	:Atalar Mah. 1336 Sok. No:2 Doğan Apart Daire:2 Pamukkale/ DENİZLİ

Yayın Listesi

ALAN, A. R., ASLAN, E., KASKA A. and CELEBI TOPRAK F. “Chromosome Doubling in Gynogenic *Allium cepa* and *A. ampeloprasum* materials”, International Symposium On Euroasian Biodiversity 5-8 Temmuz 2017. Minsk, Belarus.

CELEBI TOPRAK, F., AKGUN, S. VE ALAN, A.R. (2017) ‘‘Importance of Sucrose in Gynogenesis Induction in Two Turkish Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) Lines’’, International Symposium On Euroasian Biodiversity 5-8 Temmuz 2017. Minsk, Belarus. (Sözlü sunumunu Esra Elver yapmıştır.)

CELEBI-TOPRAK, F., ASLAN, E., ALAN, A. R.,In vitro studies in *Allium sandrasicum*. II International Symposium on Micropropagation and In Vitro Techniques. 12-16 August 2018. İstanbul, Turkey. (Sözlü sunum)

Katıldığı Çalıştay

ERASMUS+ KA2 workshop about “Multi-purpose center for adult education in clean environment (ECO-Center)” in October 2016, Denizli, Turkey.