

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

***ALLIUM TUNCELIANUM* ‘DA IN VITRO KÜLTÜR
OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP ERGÜN

DENİZLİ, 2019

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



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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP ERGÜN

DENİZLİ, 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zeynep ERGÜN tarafından hazırlanan “*ALLIUM TUNCELIANUM* ‘DA *IN VITRO* KÜLTÜR OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE EDİLMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.09.2019 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 ÇELEBİ TOPRAK
Pamukkale Üniversitesi

F. Çelebi

Üye
Prof.Dr. Ali Ramazan ALAN
Pamukkale Üniversitesi

Ali Ramazan Alan

Üye
Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Mehtap Şahin Çevik

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
04/09/2019 tarih ve 35/33 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Uğur Yücel

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal
Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından desteklenmiştir.**

ZEYNEP ERGÜN

Zach

ÖZET

ALLIUM TUNCELIANUM ‘DA IN VITRO KÜLTÜR OLUŞTURULMASI VE REJENERANTLARIN KARAKTERİZE EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP ERGÜN

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)

DENİZLİ, 2019

Bu tezde Tunceli ilinin belirli bölgelerinde, özellikle Munzur (Mercan) Dağları eteklerinde yer alan Tunceli'nin Ovacık ve Pülümür ilçelerinde yaygın olarak yetişen, endemik bir bitki türü olan *Allium tuncelianum*'da *in vitro* kültür oluşturulması ve rejenerantların karakterize edilmesi araştırılmıştır. Çalışmada, Tunceli Pertek'ten (tarla koşullarında yetiştirilen: AT) ve Pülümür'den (doğal olarak dağda yetişen: ATP) temin edilen *A. tuncelianum*'a ait iki hat kullanılmıştır. Besi yeri olarak BDS (A₀, A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) ve MS (F, F₂, F₃, F₄, F₆, F₇, F₉, F₁₀, F₁₁, F₁₂, F₁₃, F₁₄) temelli farklı konsantrasyonlarda şeker (0, 25, 50, 75, 100 g) ve bitki büyüme hormonları içeren (2,4-D, NAA, BAP ve 2İP) 19 çeşit besi yeri kullanılmıştır. Bu çalışmada 18.414 tanesi açmamış 20.064 çiçek tomurcuğu kültüre alınmıştır. İki hat için kullanılan 19 çeşit besi yerinin altı tanesine (A₁₀₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀, F₄, F₉ ve F₁₄) ekilen tomurcuklar ginogenesis, dokuz tanesine (A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, F₆, F₇, F₉, F₁₁, F₁₂, F₁₄) ekilen tomurcuklar somatik sürgün gelişimine cevap vermiştir. Kullanılan besi yerlerine ekilen toplam tomurcuklardan alınan ginogenik ve somatik cevaplar sırası ile % 0,08 ve % 1,29 dur. Denemelerde elde edilen sonuçlar, *A. tuncelianum*'un ginogenik uyartımı için tomurcukların en iyi cevap verdiği besi yerinin bitki büyüme hormonları içermeyen ve 50 g/l sukroz içeren BDS temelli A₄₅₀ besi yeri (% 0,44) olduğunu göstermiştir. Somatik sürgün gelişimi için en iyi cevap veren tomurcukların olduğu besi yeri ise 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 50 g/l sukroz içeren A₅₀ besi yeri (% 4,44) olarak belirlenmiştir. *A. tuncelianum*'da ginogenesis için bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın yüksek konsantrasyonlarda sukroz (50 g/l ve üzeri) bulunduran besi yerlerinin daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen ginogenik bitkilerin altı tanesi ve somatik bitkilerin altı tanesi flow sitometri ile analiz edilmiştir. Ginogenik bitkilerin bir tanesinin (% 16,66) haploid, dört tanesinin (% 66,66) diploid ve bir tanesinin (% 16,66) miksploid olduğu tespit edilmiştir. Somatik bitkilerin tamamının diploid olduğu bulunmuştur.

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

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* CULTURE OF *ALLIUM TUNCELIANUM* AND CHARACTERIZATION OF REGENERANTS

MSC THESIS

ZEYNEP ERGÜN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF.DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)

DENİZLİ, 2019

In this thesis, making *in vitro* culture and characterizing regenerants in *Allium tuncelianum* which is common in Ovacık and Pülümür districts of Tunceli, which is located in the foothills of Munzur (Mercan Mountains) in certain regions of Tunceli province, was investigated. Two lines of *A. tuncelianum* were obtained from Tunceli Pertek grown under field conditions (AT) and obtained from Pülümür naturally grown on mountain (ATP). MS (F, F2, F3, F4, F6, F7, F9, F10, F11, F12, F13 and F14) and BDS (A₀, A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀ and A₄₁₀₀) based 19 media containing different concentrations of sucrose (0, 25, 50, 75, 100 g) and plant growth regulators (2,4-D, NAA, BAP and 2IP) were used. In this study, approximately 20 thousand unopened flower buds were cultured. Gynogenic buds planted in six (A₁₀₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀, F4, F9 and F14) of 19 types of medium and somatic stimulation of buds planted in nine (A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, F6, F7, F9, F11, F12, F14) of 19 types of media has responded. The gynogenic responses and somatic responses obtained from the total buds planted in the medium used were 0.08 % and 1.29 %, respectively. The results showed that the best responsive media for gynogenesis induction for *A. tuncelianum* was BDS-based (A₄₅₀) medium containing 50 g / l sucrose and no plant growth regulator. A₅₀ medium (4.44 %) containing 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP and 50 g / l sucrose was found to be the best responding bud for somatic embryogenesis. In *A. tuncelianum*, it was found that gynogenesis was more effective in the presence of high concentrations of sucrose (50 g / l and above) regardless of the presence of plant growth hormones. Six of the obtained gynogenic plants and six of the somatic plants were analyzed by flow cytometry. One (16.66 %) of the gynogenic plants were haploid, four (66.66 %) were diploid and one (16.66 %) were mixoploid. All somatic plants were diploid.

KEYWORDS: *Allium tuncelianum*, 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 <i>Allium tuncelianum</i>	3
1.3 Haploidizasyon	5
1.3.1 Androgenesis	6
1.3.2 Ginogenesis.....	7
1.3.3 <i>Allium</i> 'larda Ginogenesis.....	10
1.4 <i>Allium tuncelianum</i> 'da Ploidi Seviyesinin Tespiti	10
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1 Bitki Materyali	12
2.2 <i>A. tuncelianum</i> Tomurcuklarının Eldesi ve Yüzey Sterilizasyonu.....	12
2.3 <i>A. tuncelianum</i> 'un Ginogenik ve Somatik Uyarıtımı İçin Kullanılan Besi Yerlerinin İçerikleri	12
2.4 <i>A. tuncelianum</i> Tomurcuklarının Kültüre Alınması.....	13
2.5 <i>A. tuncelianum</i> Kültürlerinde Yapılan Gözlemler.....	16
2.6 Ginogenik ve Somatik <i>A. tuncelianum</i> Bitkiciklerinin Büyümleri.....	16
2.7 <i>A. tuncelianum</i> Bitkilerinin Ploidi Seviyelerinin Analizi.....	17
2.8 <i>A. tuncelianum</i> 'da Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi	19
3. BULGULAR	20
3.1 Ginogenesis Uyarıtımına Gelen Cevaplar	20
3.2 Somatik Uyarıtıma Gelen Cevaplar.....	24
3.3 Tomurcuk Boyutunun ve Genotipin Ginogenesis Uyarıtımına Etkisi.....	28
3.4 Çalışma sonucunda elde edilen <i>A. tuncelianum</i> bitkilerinin ploidi seviyeleri	29
4. TARTIŞMA	31
5. KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	40

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: <i>Allium tuncelianum</i> 'un kuru (sol) ve canlı örnekten çizimleri (sağ) (Ekşi ve diğ. 2012)	5
Şekil 2: <i>A. tuncelianum</i> bitkisine ait tomurcukların kültüre alınma aşamaları .	15
Şekil 3: <i>A. tuncelianum</i> 'da ginogenik ve somatik cevaplar	17
Şekil 4: <i>A. tuncelianum</i> bitkisinin flow sitometri ile DNA miktarının ve ploidi seviyesinin tespiti.....	18

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: <i>Allium tuncelianum</i> 'un morfolojik özellikleri (Ekşi ve diğ. 2012).....	4
Tablo 2: <i>A. tuncelianum</i> uyarımı için kullanılan besi yerlerinin içerikleri.....	14
Tablo 3: AT ve ATP hatlarının farklı besi yeri çeşitlerine ekilen tomurcuk sayısı	15
Tablo 4: AT hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkiçik ve bitki oluşumu	22
Tablo 5: ATP hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkiçik ve bitki oluşumu	24
Tablo 6: AT hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki somatik bitkiçik ve bitki oluşumu	26
Tablo 7: ATP hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki somatik bitkiçik ve bitki oluşumu	28
Tablo 8: AT ve ATP hatlarının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki tomurcuk boyutuna göre ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu	29
Tablo 9: Elde edilen ginogenik ve somatik bitkilerin ploidi seviyeleri	30

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- Diklorofenoksi Asetik Asit
PI	: Propodium iodide

ÖNSÖZ

Değerli bilgileri ile çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren ve destekleyen, geçirdiğim zor günlerimde hep yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak'a teşekkürü borç bilirim. Prof. Dr. Ali Ramazan Alan'a tez çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve desteklerini esirgemediği için teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarına yaptığı katkılardan dolayı Dr. Öğr. Gör. Arzu Kaska'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarında destek ve yardımlarını benden esirgemeyen tüm BİYOM ekibine teşekkürler. Dostluklarını, güzel yüreklerini benden hiç esirgemeyen Şebnem Kalyoncu, Ali Kalyoncu ve Aras Kalyoncu'ya teşekkür ediyorum.

Yürek ve emeklerini benden hiç esirgemeyen varlıklarından onur duyduğum iki dev kadın annem Makbule Ergün ve ablam Nursel Akyüz'e teşekkürler...
ve Babam Dursun Ergün'ün anısına...



1. GİRİŞ

Bilimsel çalışmaların katkılarıyla artan sağlık hizmetleri, gerek yenidoğan ölümlerini azaltarak gerekse yaşam süremizi uzatarak dünya nüfusu artışına katkı sunmaktadır. Artan nüfusun ev ve işyeri ihtiyaçlarını karşılamak için kullanılan tarım arazileri, nüfus artışına paralel olarak artan yiyecek ihtiyacını karşılayacak tarım arazilerinin daralmasına neden olmuştur. Daralan tarım arazilerinden artan besin ihtiyacını karşılama çabaları modern ıslahın doğuşuna katkı sunmuştur. Her geçen gün modern ıslaha duyulan ihtiyaç artmaktadır. Ayrıca çağımızın vebası kanserden korunmak için antikanserojen madde içeriği fazla olan bitkilerin eldesi ve çoğaltılması ayrı bir önem taşımaktadır. Bu bitkilerin elde edilmesi ve çoğaltılması da modern ıslah yöntemlerinin önemini artırmaktadır.

Bitki ıslahı, bir bitki türünde istenilen özelliklere sahip yeni bitki çeşitleri elde etmek için insan eliyle uygulanan melezleme ve seleksiyon yöntemlerine verilen genel isimdir. Yeni ve daha iyi bitki çeşitlerinin ortaya konulması biyoteknolojinin en belirgin ve yararlı çıktısıdır. Modern tarımsal üretkenliğin üçe katlanmasında bitki ıslahçıların rolünün fazla olduğu kabul edilmekte ve uluslararası düzeyde insanlık adına temel başarılar olarak değerlendirilmektedir (Hoisington ve diğ. 1999).

Bilimsel anlamda bitki ıslahını klasik ve modern ıslah olarak ikiye ayırabiliriz. Klasik ıslah, melezleme ve seleksiyona dayalıdır. Bu yöntemde tür içi çaprazlamalar yapıp daha sonra istenilen özelliklere sahip bitkiler seçilir. Klasik ıslah, kendileme depresyonuna sahip açık tozlanma eğilimi olan, heterozigoti oranı yüksek türlerde uzun yıllar alabilir. Aynı zamanda bu türlerle çalışmaların yapılabilmesi, geniş tarım arazileri ve fazla işgücü gerektirdiği için maliyeti daha da yükseltir. Bu gibi önemli sorunların üstesinden gelmek için modern ıslah yöntemleri kullanılabilir.

Kendileme depresyonuna sahip, açık tozlanma eğilimi olan *Allium*'lar da yüksek oranda heterozigoti gösteren bitkilerdir. Klasik ıslah yöntemleriyle istenen özelliklere sahip yeni çeşitler elde etmek uzun yıllar alabilir. Ayrıca bu yöntemle tamamen homozigot hatların elde edilmesi neredeyse mümkün değildir. Bu problemlerin çözümüne modern ıslah yöntemleri çare olabilir. Biyoteknolojik yöntemlerin de kullanıldığı modern ıslah yöntemleri; mutasyon ıslahı, protoplast füzyonu, haploidizasyon ve transformasyondur.

1.1 *Allium*'ların Genel Özellikleri

Kuzey yarım kürede yayılış gösteren *Allium L.* cinsinin Türkiye'nin dahil olduğu Güneybatı ve Orta Asya'da daha geniş yayılış gösterirken, Kuzey Amerika'da daha dar yayılış gösterdiği saptanmıştır. *Allium* cinsinin 880' den fazla tür içermesi onu tür çeşitliliği bakımından en zengin cinslerden biri yapmaktadır. Türkiye, *Allium* cinsinin geniş yayılış gösterdiği alanlar arasında 175 türle (188 takson) dünyada önemli bir yere sahiptir ve bu türlerin yaklaşık % 40'ı endemiktir (Ekşi ve diğ. 2012).

Allium cinsi içerisinde yer alan türler, çok yıllık otsu bitkilerdir. Soğanları zarlı yapıdadır. Toprak altı kısımlarını baş ve kökler oluştururken toprak üstü kısımlarını yapraklar, çiçekler, stamenler ve brakteler oluşturmaktadır. Çiçekleri sapın uç kısmında şemsiye şeklindedir. Ovaryum üç bölmeli yapıya sahiptir ve her bir bölme iki ya da üç ovul içerir. Köşeli veya yuvarlak yapıya sahip tohumları siyah renktedir (Fritsch ve Friesen 2002; Kaska 2013).

Tür çeşitliliği bakımından zengin olan *Allium*'ların kullanım alanları çeşitlilik gösterir. Bazı türleri gıda sektöründe, sağlık sektöründe (tıbbi ve aromatik bitkiler) ve peyzaj mimarisinde süs bitkisi olarak da kullanılmakta olan ekonomik açıdan oldukça önemli bir cinstir. Gıda sektöründe sebze ve baharat olarak kullanılmakta olup en yaygın yenilebilir *Allium* türleri arasında *A. cepa* (baş soğan), *A. ampeloprasum* (pırasa), *A. sativum* (sarımsak) ve *A. schoenoprasum* (çayır soğanı) yer almaktadır (Nguyen ve diğ. 2008).

1.2 *Allium tuncelianum*

Allium tuncelianum, *Flora of Turkey and East Aegean Island*' da *A. macrochaetum* Boiss. & Hausskn alt tür *tuncelianum* Kollmann olarak yer almaktadır. Endemik bir tür olan *A. tuncelianum* Özhatay, Mathew & Şiraneci tarafından 1995 yılında tür düzeyine çıkarılmıştır (Ekşi ve diğ. 2012).

Tunceli çevresinde yetişen yaklaşık 14 *Allium* türünden sadece *A. tuncelianum* sarımsak özelliklerine sahiptir. *A.tuncelianum*'un yapısında bulunan etken maddeler (alliin, allisin), *A. sativum*'a (kültür sarımsağı) benzemekle beraber kendine has kokusu ve tadı vardır (Tablo 1, Şekil 1). Doğada kendiliğinden yetişen *A. tuncelianum*, yöre halkı tarafından sarımsağın (*A. sativum*) yerine kullanılmak üzere ev içi kullanım ve ticari amaçla toplanan bitkiler arasında yer almaktadır (Ekşi ve diğ. 2012).

Tek diş olması, kendine has kokusu (*A. sativum*'a oranla daha az keskin), kendine has tadı, antikanserojen içeriğinin *A. sativum*'a oranla fazla olması (Takım 2015) gibi bazı sebepler *A. tuncelianum*'a talebi artırmıştır. *A. tuncelianum*, Tunceli'nin yanı sıra Ankara, İstanbul gibi büyük şehirlerde pazarlanmakta ve belli miktarlarda yurt dışı ihracatı da yapılmaktadır. Yöre halkı tarafından önceleri genellikle evde kullanım amacıyla az miktarlarda toplanırken bugün talep artışına bağlı olarak toplanma miktarı da artmıştır. Bilinçsizce yapılan toplama işlemi endemik olan bu türü tehlike altına atmaktadır. Bu nedenle bölgede başlatılmış yöre halkının toplayıcı durumdan üretime geçişini sağlayan tarla ekimleri (tohumdan) desteklenmelidir. Diğer sarımsak türlerinin aksine tohumdan eşeyli olarak üretilen bir tür olması ayrıca önemini artırmaktadır. Eşeyli üreme, tür içi çeşitliliği artırarak gerek doğal gerekse yapay seleksiyonla istenen özelliklere sahip genotiplere ulaşmamızın önünü açmaktadır. Ayrıca bazı virüsler tohum aracılığı ile taşınmadığından temiz materyal ile çalışmaya olanak sağlar (Kritzman ve diğ. 2001). Modern ıslah yöntemleri kullanılarak gerek yöreye gerek yörenin dışındaki bölgelere uyumlu genotiplerde *A. tuncelianum*'ların geliştirilmesi ve çoğaltılması üzerine yapılan çalışmalar artırılmalıdır.

A.tuncelianum ile ilgili daha önce yapılan ginogenesis çalışmaları da bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Kaska (2013) *A.*

tuncelianum ile birinci yıl yaptığı çalışmada BDS ve MS temelli bitki büyüme hormonları ve 30 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları 2.760 adet tomurcuktan, 24 adet (% 0,86) somatik kallus elde ederken somatik bitkicik, bitki ve ginogenik embriyo elde edememiştir. Bu somatik kalluslardan dokuz tanesini (% 0,78) BDSA, iki tanesini (% 0,74) MSB ve 13 tanesini (% 8,66) BDSC besi yerlerinden elde edilmiştir. İkinci yıl yaptığı çalışmada BDS, MS ve B5 temelli bitki büyüme hormonları ve 30 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları 3.110 adet tomurcuktan, 55 adet (% 1,76) somatik kallus elde ederken somatik bitkicik ve bitki elde edememiştir. Somatik kallusların 32 tanesini (% 2,99) BDSA, bir tanesini (% 0,25) MSB ve 22 tanesini (% 2,35) B5B besi yerlerinden elde etmiştir. Bitki büyüme hormonları ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları tomurcuklardan üç tane (% 0,09) ginogenik embriyo elde etmiştir. Ginogenik embriyolardan bir tanesini BDSA, iki tanesini ise MSD besi yerlerinden elde etmiştir.

Tablo 1: *Allium tuncelianum*'un morfolojik özellikleri (Ekşi ve diğ. 2012)

Soğan	1,5-3,5cm çapında, dış tunika kahverengimsi-kirli sarımsı, derimsi, iç tunika sarımsı beyaz, zarımsı; soğancık 2-3, ovoid, akuminat, açık turuncu-kahverengi, sapsız.
Gövde	90-125cm, yaprak kınları gövdenin 1/3-1/2 sine kadar.
Yaprak	3-7, 40-50x1-2 cm, yaprak kını düzgün
Spata	1 valvli, 10-20 cm, tabanda ovat, uca doğru aniden daralan, 8-18 cm boyunda, pembe-mor kirli sarımsı, düşücü.
Umbel	Farklı uzunlukta, ince ve düzgün yüzeyli; brakteoller az sayıda.
Perigon	Kampanulat: tepaller kirli pembe ya da beyazımsı pembe, orta damar belirgin koyu, dış tepaller 2,5-3,5x1 mm, oblong-ovat, iç tepaller 2,5-3x1 mm, oblong-ovat, uç kısımlar obtus-rotundat.
Stamenler	Perigondan bariz uzun, filamentler çıplak, dış halkadakilere basit, dar üçgenimsi, 3,5-4,5 mm; iç halkadakilere 3 parçalı (trikuspidat), lateral kuspisler orta kuspisin 2-3 katı, anterler oblong-ovat morumsu pembe.
Kapsül	Küremsi, 4-6mm çapında; tohumlar siyah 1,5-2x2,5-3,5 mm
Kromozom sayısı	2n=16
Çiçeklenme zamanı	Temmuz-Ağustos
Habitat	Taşlı-çakıllı araziler, kalkerli topraklar, 1500-2000m
Yayılış	Doğu Anadolu'da (Tunceli, Sivas ve Erzincan çevreleri)



Şekil 1: *Allium tuncelianum*'un kuru (sol) ve canlı örnekten çizimleri (sağ) (Ekşi ve diğ. 2012)

1.3 Haploidizasyon

Gametlerinde (eşey hücrelerinde) bulunan kromozom sayısı, somatik hücrelerindeki kromozom sayısına eşit olan bitkilere haploid bitkiler denir. Haploid bitkiler, allelerden yalnız birini taşıdıklarından çekinik mutasyonların açığa çıkarılmasına olanak tanımakla kalmayıp kromozom katlanmalarıyla (dihaploidizasyon) % 100 homozigot hatlar elde edilmesini de sağlar. Çeşitli metodlar aracılığıyla bir türün somatik hücrelerindeki kromozom sayısının yarısına (n) sahip olan gametik hücreleri kullanılarak gametik kromozom sayısına sahip bitkilerin eldesine haploidizasyon denir.

Yabancı döllenen türlerde heterozigoti oranı çok yüksektir. Bu türlerde homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmektedir. Kendine döllenen türlerde bile homozigot hatların elde edilmesi için 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır. Haploid bitkilerin kullanılmasının en önemli avantajı tam bir homozigotiye çok daha kısa sürede elde etme olanağı sunmasıdır. Dihaploidizasyon yöntemi ile homozigot hatlara bir generasyonda ulaşmak mümkündür. Günümüzde dihaploidizasyon yönteminin ıslah programlarında kullanılması arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, kavun, hıyar, gerbera gibi birçok bitki türünde başarıyla uygulanmaktadır. Dihaploidler sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir (Babaoğlu ve diğ. 2002).

Bazı bitki türlerinde çeşitli doğal yollarla kendiliğinden haploid bitkiler oluşabilmektedir. Haploid bitkilerin doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere ve tür içi genotiplere bağlı olarak değişmekle beraber genellikle çok düşük orandadır. Birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pocardve Dumas de Vaulx 1971). Doğada haploidlerin oluşum yolları ginogenesis, androgenesis, semigami, poliembriyoni ve kromozom eliminasyonu olarak beş ana grupta toplanabilir (Babaoğlu ve diğ. 2002).

Islah programlarında kullanılacak sayıda ve düzende doğal haploitlerin bulunmaması bitki ıslahçıları uyarılmış haploidizasyona yöneltmiştir. Uyarılmış haploidizasyon için günümüzde kullanılan en etkin ve verimli yöntemler, *in vitro* ortamda erkek ve dişi gametlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı androgenesis ve ginogenesisidir.

1.3.1 Androgenesis

Androgenesis, içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesine verilen isimdir. Bu yöntemle gametik gelişme yönü normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesi henüz tek

çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece haploid bitkiler elde edilmektedir (Babaoğlu ve diğ. 2002).

İlk olarak Tulecke, 1953 yılında *Ginkgo bloba* bitkisine ait olgun polenlerin kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlemlemiştir. İlk önemli gelişmeyi ise 1964 yılında *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrosporlardan haploid embriyo oluşumunu Guha ve Maheshwari (1966) sağlamıştır. Sonraki yıllarda birçok bitki türünde erkek gamet temelli embriyogenez çalışmaları yapılmıştır (Forster ve diğ. 2007).

1.3.2 Ginogenesis

Bir diğer haploidizasyon yöntemi olan ginogenesis, döllenmemiş yumurta (ovül) ya da yumurtalığın (ovaryum) hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşturma sürecine denir (Babaoğlu ve diğ. 2002). Androgenesis yöntemi ile haploid bitki elde edilemeyen bitki türlerinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir (Atanassov ve diğ. 1995). Dişi gametten haploid bitki elde etme çalışmaları hıyarda spontan partenogenetik haploid bitki elde edilmesine yönelik çalışmalarla 1950'li yılların sonunda başlamıştır (Aalders 1958). 1980'li yıllarda ovül ve ovaryum kültürlerine olan ilgi artmış ve *A. cepa* (ovül), *A. porrum* (ovaryum), *Beta vulgaris* (ovül), *Cucumis melo* (ovül), *Cucurbita pepo* (ovül), *Gerbera jamesonii* (ovül), *Helianthus annuus* (ovaryum), *Hordeum vulgare* (ovaryum), *Lilium davidii* (ovaryum), *Nicotiana rustika* (ovaryum), *N. Tabacum* (ovaryum), *Oryza sativa* (ovaryum), *Petunia axillaris* (ovül), *Triticum aestivum* (ovaryum), *Zea mays* (ovaryum) gibi değişik familyalardan birçok bitki türünde haploid embriyo uyartımına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Babaoğlu ve diğ. 2002).

Ginogenesis uyartımı sonucu bitki elde edilmesini etkileyen birçok faktör vardır. Bu faktörler arasında donör bitkinin genotipi, donör bitkinin yetiştirme koşulları, kültür ortamı, bitki büyüme hormonları, ovüllerin gelişim aşaması ve çiçek tomurcuklarına uygulanan soğuk şokları en etkili olanlarındandır (Babaoğlu ve diğ. 2002).

Donör bitkinin genotipi ve büyüme koşulları, ginogenesisse cevap verme oranını yakından etkilemektedir. Çok sayıda bitki türünde yapılan ovül-ovaryum kültürlerinde genotiplere bağlı olarak haploid bitki oluşum oranlarının da değiştiği bilinmektedir (Truong-Andre ve Demarly 1983; Keller 1990; Özzambak 1992). Gioffriau ve diğ. (1997) soğanda genotip ile ginogenesis arasında bir bağ olduğunu göstermişlerdir. F1 hibritleri ve yakın akraba melezlemesi sonucu elde edilen donör bitkilerden, açık tozlanan donör bitkilere göre daha yüksek oranda haploid bitki elde edildiğini ifade etmiştir. Bu sonuç yapılan başka araştırmalarla da desteklenmiştir (Alan 2004). Sarı ve diğ. (1992) kavunda ışınlanmış polen tekniği ile yaptıkları çalışmada *C. melo* var. *inodorus* kavunlarından *C. melo* var. *cantalupensis* kavunlarına göre daha yüksek oranda haploid embriyolar elde etmiştir. Bir başka çalışmada da Shalaby (2006, 2007) kabakta anter kültürünün cevap verdiği besi yeri içeriğini kullanarak hazırladığı ovaryum kültüründen cevap alamamıştır. Aynı şartlar altında kültüre alınan *N. tabacum* ovaryumlarının *N. rustica*'ya ait olan ovaryumlardan yaklaşık 10 kat daha fazla embriyo oluşturduğu tespit edilmiştir (Wu ve Chen 1982). Yapılan birçok çalışmada bitki türünün ginogenesisse ve androgenesisse cevabı etkilediği gözlemlenmiştir. Tüm bu çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında donör bitki genotipi ginogenesis uyartım başarısında oldukça etkilidir.

Kültür ortamının, içeriği ginogenesis uyartımında başarıyı etkilemektedir. Bitki türlerinde ginogenesis uyartımını sağlayacak tek bir besi yeri prosedürü bulunmamaktadır. Farklı bitkilerde ginogenesis uyartımını sağlayacak besi yeri içerikleri farklılık gösterebilir. Azot kaynağı, bitki büyüme hormonlarının oranları ve kombinasyonları, karbonhidrat kaynağı veya konsantrasyonu değiştirilerek modifiye besi yerleri elde edilmektedir (Chen ve diğ. 2011). Buğdayda ovaryum kültürü yaparken % 6 oranında sukroz konsantrasyonu etkili iken mısırdaki bu oran % 12'dir (Truong-Andre and Demarly 1984; Mukhambetzhanoğlu 1992). Aynı tür içinde dahi farklı sukroz konsantrasyonları tomurcukların cevap verme oranını etkilemektedir. Alan ve diğ. (2016a) pırasada yaptıkları çalışmada en iyi cevapları, kullandıkları 12 farklı besi yerinden sukroz içeriği 50 g/l ya da daha yüksek oranda olan kültürlerdeki tomurcuklardan elde etmiştir. Aminoasit 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 aldıklarında, indol-3-asetik asit (IAA) içeren kültürlerde embriyo oluşumu tetiklenirken (% 0,63); 2,4-D ve BAP içeren kültürlerde kallus oluşumu tetiklenmiştir (% 1,34). Gürel ve diğ. (2000), besin ortamına aktif kömür ilavesi, embriyo oluşumunu artırırken gümüş nitrat ilavesinin embriyo oluşumunu azalttığını ya da tamamen durdurduğunu belirlemiştir. Tüm bu bulgular besi yeri içeriğinin ginogenesis uyartımında ve rejenerasyonda önemli rollerinin olduğunu göstermektedir.

Ovül-ovaryum kültürlerinden başarı eldesinde dikkat edilmesi gereken önemli faktörlerden bir diğeri ise ovaryumların alındığı çiçeğin büyüklüğü yani ovaryumların fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir. Ovaryum gelişme dönemini pratik olarak belirlemenin en etkili yolu, aynı çiçeğin anterlerindeki mikrospor gelişim döneminin izlenmesidir. Arpada yapılan bir çalışmada antesisten önceki dönemde polenlerin bir, iki ya da üç çekirdekli olduğu dönemde aynı çiçeğin ovaryumları kültüre alınmış ve haploid embriyo oluşumu için en uygun dönemin iki ya da üç çekirdekli polenlere sahip çiçeklerden izole edilen ovaryumlardan geldiği belirlenmiştir (San Noeum 1976). Buna karşılık buğday ve tütünde aynı çiçeğin polenlerinin tek çekirdekli olduğu dönemde alınan ovaryumların haploid bitkiler oluşturduğu belirlenmiştir (Zhu ve diğ. 1979). Ovüllerin gelişim döneminin cevap verme oranına etkisi bir bitki türünden diğeri bitki türüne göre değişmekle birlikte, genel olarak ele alındığında en iyi sonuçların olgunlaşmış ya da olgunlaşmaya yakın embriyo kesesine sahip olan bitki kültürlerinden elde edilmiştir (Hoseman and Bossoutrot 1983; San Noeum and Gelebart 1986; Ge'mes-Juha'sz ve diğ. 2002). Sıcaklığın bitki doku ve hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimi ve birikimine etkili olduğuna dair literatür bilgileri mevcuttur (Babaoğlu ve diğ. 2002).

1.3.3 *Allium*'larda Ginogenesis

Allium'lar çok yıllık otsu bitkiler olup ikinci yıllarında çiçeklenir. Yabancı tozlanan bu cinse ait türlerin kendileme depresyonu gösteriyor olmaları klasik yöntemlerle ıslah sürelerini uzatmaktadır. Bu sorunu aşmak için günümüzde, 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. *A. cepa*'da daha sonraki yıllarda da yine ginogenesis uyarımı Keller (1990), Campion ve Alloni (1990), Campion 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. Celebi-Toprak ve diğ. (2013) *A. tuberosum* (çayır soğanı) türünde haploid bitki eldesi için ginogenesis uyarım yöntemini kullanmış ve ginogenik eldesi sağlamışlardır. Alan ve diğ. (2003) *A. cepa* ve *A. roylei* türlerini çaprazlayarak oluşturdukları bitkilerde ginogenesis yöntemini kullanmış ve haploid bitki eldesi sağlamışlardır. Pırasada (*A. ampeloprasum*) açmamış çiçek tomurcuklarını farklı besi yerlerinde kültüre almış ve haploid bitki eldesi sağlamışlardır (Keller ve Korzun 1996; Chen ve diğ. 2011; Kaska 2013; Alan ve diğ. 2016a; Akgün 2018).

A. tuncelianum ile ilgili kapsamlı bir ginogenesis çalışması bulunmamaktadır (Kaska 2013). Yapılan bu çalışma nesli tükenme tehlikesi taşıyan endemik bir bitki türü olan *A. tuncelianum*'un ıslahı için ayrı bir öneme sahiptir.

1.4 *Allium tuncelianum*'da 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 metafaz evresindeki hücreler mikroskop altında tespit edilerek 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 seviyesinin tespiti yapılırken flow sitometri kullanmak güvenilir ve hızlı sonuçlar verir (Ramulu ve Dijkhuis 1986; De Laat ve diğ. 1986).

Bu tezin amacı, Türkiye'nin endemik türlerinden biri olan *A. tuncelianum*'un biyoteknolojik yöntemler kullanılarak ginogenesis ve somatik uyarım metodları ile kısa sürede ıslah edebilmek için *in vitro* yöntemlerin geliştirilmesi ve regenerantların karakterize edilmesidir.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Bitki Materyali

Bu çalışmada, Tunceli'nin Pertek ve Pülümür ilçelerinde endemik bir bitki türü olarak yayılış gösteren *Allium tuncelianum*'un iki hattı kullanılmıştır. Tunceli Pertek'ten gelen tarla koşullarında yetiştirilmiş hat AT olarak, Pülümür'den gelen doğal olarak dağda yetişmiş hat ise ATP olarak kodlanmıştır.

2.2 *A. tuncelianum* Tomurcuklarının Eldesi ve Yüzey Sterilizasyonu

Her bir genotipe ait tomurcuklar makas yardımı ile kesilip, kesilen tomurcuklar genotiplerine göre ayrı ayrı metal süzgeçlere alınmıştır. Metal süzgeçler içerisindeki tomurcuklar öncelikle % 70'lik etil alkolde 30 saniye bekletildikten hemen sonra % 20'lik klorak (çamaşır suyu) + % 0,1'lik Tween 20 + distile su içeren sterilizasyon solüsyonu içerisinde arada karıştırılarak 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra steril kabin içine alınan sterilizasyon solüsyonu içerisindeki metal süzgeçlerin bulunduğu kaplardaki solüsyon boşaltılmıştır. Sterilizasyon solüsyonu boşaltılan tomurcuklar, 10'ar dakikalık periyotlarla art arda üç kere steril su ile yıkanmıştır. Daha sonra tomurcuklar steril kabin içerisinden çıkarılmadan steril kurutma kağıtlarının üzerine yayılarak kurutulmuştur. Kuruyan tomurcuklar, steril kabinde besi yeri bulunduran 90x15 mm'lik Petri kaplarına ekilmiştir (Şekil 2A-G).

2.3 *A. tuncelianum*'un Ginogenik ve Somatik Uyartımı İçin Kullanılan Besi Yerlerinin İçerikleri

Bu çalışmada temel besi yeri olarak BDS (Dunstan ve Short 1977) ve MS (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. BDS ve MS temelli besi yerleri, bitki büyüme hormonları ve sukroz eklenerek modifiye edilmiştir (Bohanec ve Jakse 1999; Alan ve diğ. 2004) (Tablo 2). Farklı miktarlarda sukroz (0, 25, 50, 75, 100 g) ile farklı oran ve kombinasyonlarda bitki büyüme hormonları olan oksin (2,4-D,

NAA) ve sitokinin (BAP ve 2İP) eklenerek modifiye edilmiş; BDS (A₀, A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀ ve A₄₁₀₀) ve MS (F, F2, F3, F4, F6, F7, F9, F10, F11, F12, F13 ve F14) temelli toplam 19 farklı besi yeri hazırlanmıştır (Tablo 2). Besi yerleri hazırlanırken sıvı stok çözeltiler kullanılmış olup sukroz ilavesi de besi yeri hazırlanırken yapılmıştır. Besi yerleri, Sodyum hidroksit (NaOH) ve Hidroklorik asit (HCl) kullanılarak uygun pH derecelerine getirilmiştir. Bu pH değerleri MS için 5,8 ve BDS için 6'dır. Bu besi yerleri uygun pH'a ulaştıktan sonra katılaştırıcı olarak agar eklenmiştir. Hazırlanan besi yerleri sterilizasyon için otoklavda 121 °C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınçta 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Sterilizasyonu tamamlanan besi yerleri 60-70 °C sıcaklıkta iken steril kabinde 90x15 mm'lik Petri kaplarına yaklaşık 30 ml dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

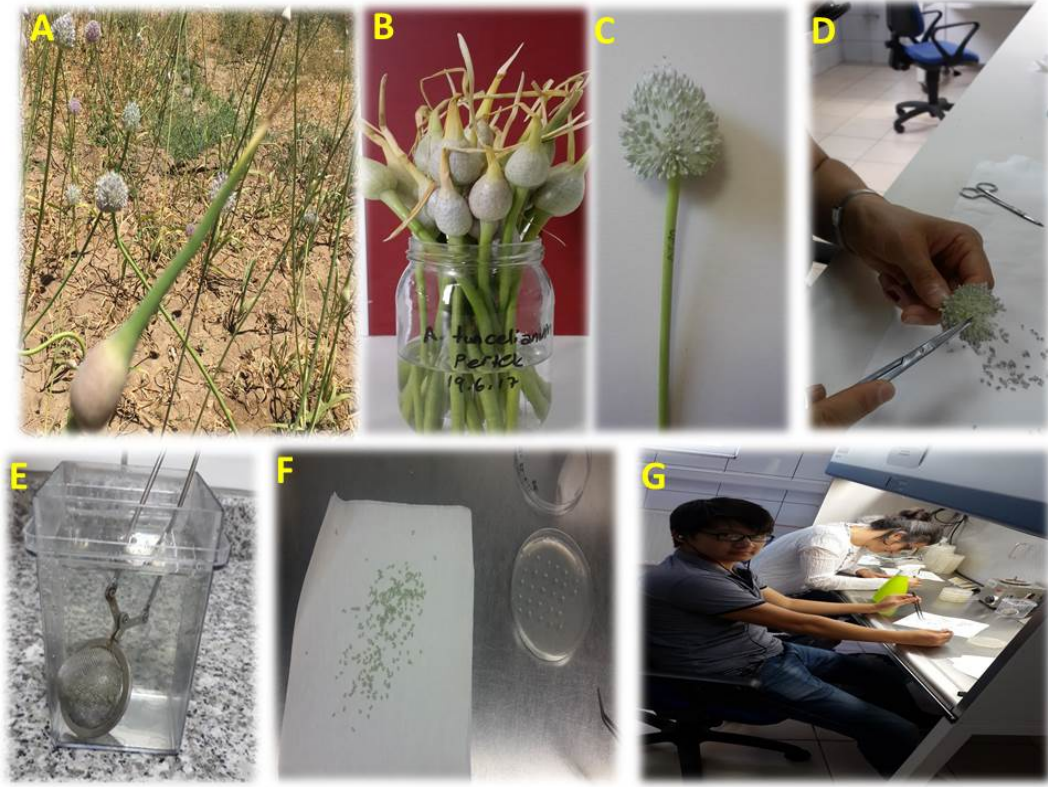
2.4 A. tuncelianum Tomurcuklarının Kültüre Alınması

Steril kabinde yüzey sterilizasyonu tamamlandıktan sonra kurutulan tomurcuklar boyutlarına göre açmış çiçek, büyük, orta ve küçük ebatta olarak ayrılmıştır (Şekil 2E-F). İçerikleri farklı BDS ve MS temelli besi yerleri bulunduran 90x15 mm'lik Petri kaplarına, tomurcuk boyutlarına göre ekimler yapılmıştır. Her bir Petri kabına 30 adet tomurcuk ekildikten sonra kontaminasyonu engellemek için Petri kabının etrafı iki, üç sıra parafilm ile sarılmıştır. Kültüre alma işlemi tamamlanan tomurcukların kayıtları, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere deney defterine ve bilgisayara kaydedilmiştir. Tüm kültürler, 22 °C'de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olan doku kültürü odasına konulmuş ve düzenli aralıklarla gözlemleri yapılmıştır. Kültüre alınan her iki hatta ait tomurcuk sayısı tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2: *A. tuncelianum* uyartımı için kullanılan besi yerlerinin 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 ₇₅	2	-	2	-	75	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
F3	-	-	-	-	75	8
F4	-	-	-	-	100	8
F6	-	1	-	8	25	8
F7	-	1	-	8	50	8
F9	-	1	-	8	100	8
F10	2	-	2	-	0	8
F11	2	-	2	-	25	8
F12	2	-	2	-	50	8
F13	2	-	2	-	75	8
F14	2	-	2	-	100	8

^aBDS (Dunstan ve Short 1977)^bMS (Murashige ve Skoog 1962)



Şekil 2: *A. tuncelianum* bitkisine ait tomurcukların kültüre alınma aşamaları
A. *A. tuncelianum* bitkisi (tarlada) **B.** Kültüre alınan *A. tuncelianum* umbelleri **C.** Antesis aşamasına gelmiş tomurcuklar **D.** Tomurcukların kesilmesi **E.** Tomurcukların yüzey sterilizasyonu **F.** Kurutma kağıdına alınmış ve ekimi yapılmış tomurcuklar **G.** Tomurcukların besi yerine ekilmesi

Tablo 3: AT ve ATP hatlarının farklı besi yeri çeşitlerine ekilen tomurcuk sayısı

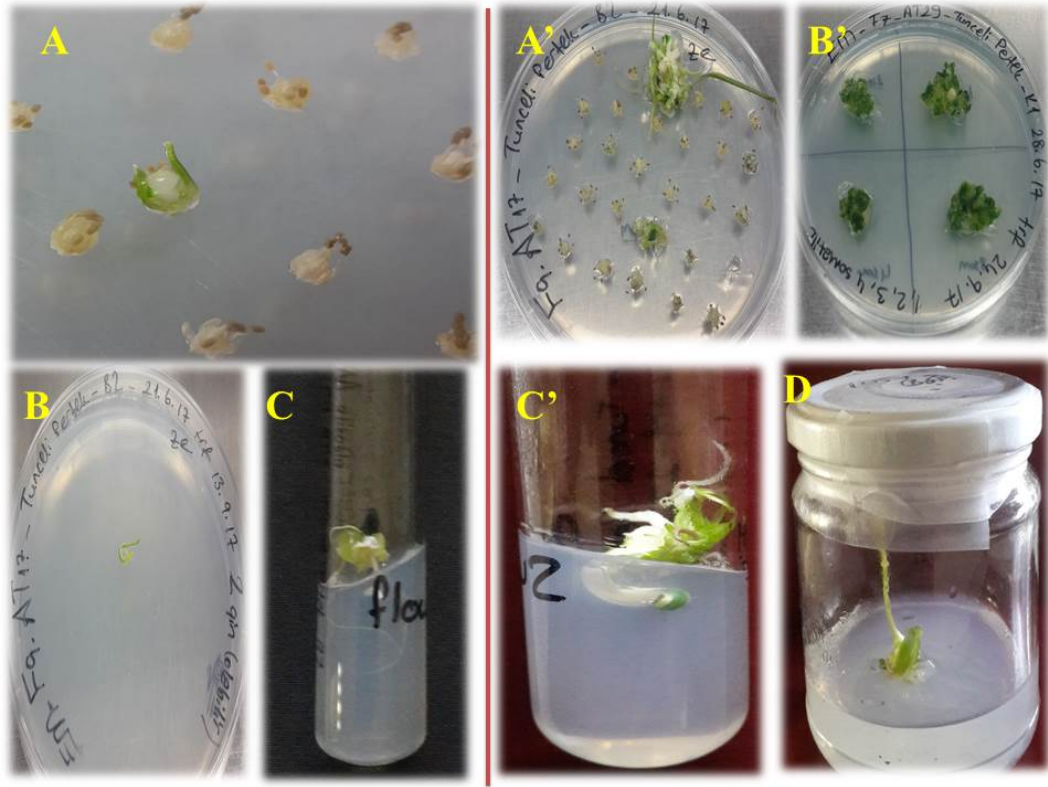
Medya Kodları	Genotip		Medya Kodları	Genotip	
BDS Temelli	AT	ATP	MS Temelli	AT	ATP
A ₀	330	660	F	540	720
			F2	390	210
A ₅₀	180	900	F3	-	390
			F4	720	420
A ₇₅	-	750	F6	-	240
			F7	570	-
A ₁₀₀	2.610	780	F9	1.170	-
			F10	-	720
A4 ₀	330	600	F11	210	-
			F12	-	300
A4 ₅₀	420	900	F13	180	-
A4 ₁₀₀	1.404	1.680	F14	690	1.050
Toplam	5.274	6.270	Toplam	4.470	4.050

2.5 *A. tuncelianum* Kùltürlerinde Yapılan Gözlemler

Doku kùltürü odasındaki *A. tuncelianum* kùltürleri haftada bir kontrol edilmiştir. Kontamine olan (bakteri veya mantar ile) Petri kapları doku kùltürü odası ve laboratuvarından uzaklaştırılmıştır. Olası kontaminasyon risklerini ortadan kaldırılmaya yönelik olarak parafilmli yıpranan Petri kaplarına yeni parafilm çekilmiştir. Yaklaşık üç ay sonra tomurcuklar ginogenesis uyartımına cevap vermeye başlamışlardır. Eş zamanlı olarak somatik rejenerasyon da gözlenmiştir. Tomurcukların içinden rejenerasyonla oluşanlar ginogenik bitkicik, tomurcukların dış kısmından rejenerasyonla oluşanlar ise somatik bitkicik olarak tanımlanmıştır.

2.6 Ginogenik ve Somatik *A. tuncelianum* Bitkiciklerinin Büyümleri

Uyartıma ginogenik veya somatik olarak cevap veren tomurcuklar belirlenmiştir (Şekil 3A, 3A'). Bu bitkiciklerin, gelişimlerini daha iyi devam ettirebilmeleri için BDS temelli bitki büyüme hormonlarını içermeyip ve 30 g/l sukroz bulunduran, büyüme besi yeri içeren Petri kaplarına aktarılmıştır (Şekil 3B, 3B'). Büyüme besi yerlerinde gözlemlerine devam edilen bitkicikler, kök ve yaprak gelişimlerini daha rahat sürdürebilmeleri için aynı büyüme besi yerini içeren tüplere aktarılmıştır (Şekil 3C, 3C', D). Tüpler doku kùltürü odasına alınıp gözlemlerine devam edilmiştir.



Şekil 3: *A. tuncelianum*'da ginogenik ve somatik cevaplar

A. Tomurcuktan gelen ginogenik bitkicik **B.** Büyüme besi yerine aktarılan ginogenik bitkicik **C.** Tüpe aktarılmış ginogenik bitki **A'.** Tomurcuktan gelen somatik bitkicikler **B'.** Büyüme besi yerine aktarılan somatik bitkicikler **C'-D.** Tüplere aktarılmış somatik bitkiler

2.7 *A. tuncelianum* Bitkilerinin Ploidi Seviyelerinin Analizi

Belirli boyuta gelen bitkiler ploidi analizi için hazırlanmıştır. İç kontrol için *Lactuca sativa* (marul) kullanılmıştır. *Lactuca sativa*'nın DNA miktarı 5,47 pg/2C alınmıştır (Arumuganathan ve Earle 1991). Flow sitometri analizi yapılan bitkilerin nükleer DNA miktarı hesaplanırken “Örneğin nükleer DNA miktarı = (Örnek *A. tuncelianum* bitkisinden çıkan floresan değeri/*Lactuca sativa*'nın floresan değeri) X 5,47 pg” şeklinde bir formül kullanılarak analizi yapılan örneğin DNA miktarı ve ploidi seviyesi tespit edilmiştir (Arumuganathan ve Earle 1991).

Ploidi analizi yapılacak her bir bitkiye bir numara verilmiştir. Steril kabin içinde, tüplerdeki bitkilerin yapraklarından steril makas yardımı ile dokular kesilmiştir. Petri kapları içerisine alınan dokular, zaman kaybetmeden buz üzerine konulmuştur. Ploidi analizi yapılacak bitkilerden 50 mg, iç kontrol olarak

kullandığımız *Lactuca sativa*'dan (marul) yaklaşık 5 mg alınarak üzerine 1 ml NIB (nuclei isolation buffer) çözeltisi eklenmiştir. Hücre çekirdeğinin parçalanarak dışarı çıkartılması jilet yardımı ile sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 0,5 ml daha NIB çözeltisi eklenerek bir filtre yardımı ile Eppendorf tüplerinin içine süzümüştür. Hazırlanan örnekler buzda bekletilmiştir. Test edilmeden önce örnekler 10 µl 1 mg/ml'lik propidium iodide (PI) eklenerek vortekslenmiştir. Hazır olan örneklerin ploidi seviyesi ve DNA miktarları flow sitometri (Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer) ile ölçümüştür (Şekil 4).



Şekil 4: A. *tuncelianum* bitkisinin flow sitometri ile DNA miktarının ve ploidi seviyesinin tespiti
A. Ploidi analizi için uygun seviyeye gelmiş *A. tuncelianum* bitkisi **B.** NIB tampon çözeltisi eklenen örnek **C.** İç kontrol ve *A. tuncelianum* içeren örneğin hazırlanması **D.** Filtreden geçirilen örnekler **E.** Örneğin PI ile boyanması **F.** Örneğin vortekslenmesi **G.** Örneğin flow sitometri cihazına yerleştirilmesi **H.** Analizi yapılan örneğe ait DNA miktarını gösteren historam

2.8. *A. tuncelianum*'da Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi

A. tuncelianum'da ginogenik ve somatik uyartım sonucu elde edilen veriler minitab programından yararlanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırılırken Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi kullanılmış olup Tukey ile besi yeri kıyaslaması da yapılmıştır.



3. BULGULAR

A. tuncelianum'un ginogenik ve somatik uyartımı çalışmalarında, BDS ve MS temelli modifiye besi yerlerinde *A. tuncelianum* bitkisinin AT ve ATP hatlarına ait 18.414 tanesi açmamış olmak üzere toplam 20.064 adet tomurcuk, boyutlarına göre (açmış çiçek, büyük, orta ve küçük) ayrılarak kültüre alınmıştır. Bu tomurcuklar kültüre alındıktan yaklaşık üç ay sonra ginogenik bitkicikler tomurcukların içinden gelişmeye başlamıştır. Eş zamanlı olarak somatik bitkicikler de tomurcukların dışından ve oluşan kalluslardan rejenere olamaya başlamıştır.

3.1 Ginogenesis Uyartımına Gelen Cevaplar

Ginogenesis uyartımı için BDS ve MS temelli modifiye besi yerlerinde AT ve ATP hatlarından 18.414 tanesi açmamış olmak üzere toplam 20.064 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Yedi tanesi BDS temelli (A_0 , A_{50} , A_{75} , A_{100} , A_{40} , A_{450} ve A_{4100}); 12 tanesi MS temelli (F, F2, F3, F4, F6, F7, F9, F10, F11, F12, F13 ve F14) olmak üzere toplam 19 farklı besi yeri ortamı denenmiştir. AT ve ATP hatlarının besi yerlerindeki ginogenesis cevap verme oranlarına bakılmıştır.

AT hattından, BDS temelli altı farklı besi yerinde (A_0 , A_{50} , A_{100} , A_{40} , A_{450} ve A_{4100}) toplam 5.274 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. AT hattına ait tomurcukların A_{100} (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) ve A_{4100} (100 g/l sukroz) besi yerlerine ekimlerinden elde edilen verilere bakıldığında besi yerlerine ekilen tomurcuklardan üç tane (% 0,6) ginogenik bitkicik, bir tane (% 0,02) ginogenik bitki elde edilmiştir. A_{100} besi yerine ekilen 2.610 tomurcuktan iki tane (% 0,08) ginogenik bitkicik gelişirken ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir. A_{4100} besi yerine ekilen 1.404 tomurcuktan bir tane (% 0,07) ginogenik bitkicik, bir tane (% 0,07) ginogenik bitki elde edilmiştir. A_0 , A_{50} , A_{40} ve A_{450} besi yerlerine ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik elde edilememiştir. AT hattının ginogenik uyartıma cevap verdiği BDS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın 100 g/l sukroz içerdiği belirlenmiştir (Tablo 4).

AT hattından, MS temelli sekiz farklı besi yerinde ise (F, F2, F4, F7, F9, F11, F13 ve F14) toplam 4.470 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. AT hattına ait tomurcukların F4 (100 g/l sukroz) ve F9 (1 mg/l NAA + 8 mg/l 2İP + 100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurcuklardan beş tane (% 0,11) ginogenik bitkicik, dört tane (% 0,09) ginogenik bitki elde edilmiştir. F4 besi yerine ekilen 720 tomurcuktan bir tane (% 0,14) ginogenik bitkicik ve bir tane (% 0,14) ginogenik bitki elde edilmiştir. F9 besi yerine ekilen 1.170 tomurcuktan dört tane (% 0,34) ginogenik bitkicik, üç tane (% 0,26) ginogenik bitki elde edilmiştir. F, F2, F7, F11, F13 ve F14 besi yerlerine ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik elde edilememiştir. AT hattının ginogenik uyartıma cevap verdiği MS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın 100 g/l sukroz içerdiği belirlenmiştir (Tablo 4).

AT hattına ait tomurcukların BDS ve MS temelli farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilerin tamamı birlikte değerlendirildiğinde ise AT hattı için kullanılan 14 farklı besi yerlerinden dördünde (A₁₀₀, A₄₁₀₀, F4 ve F9) ginogenik bitkicik, üçünde (A₄₁₀₀, F4 ve F9) ginogenik bitki gelişmiştir. AT hattına ait tomurcukların ginogenik bitkicik oluşturma oranları % 0,07 (A₄₁₀₀), % 0,08 (A₁₀₀), % 0,14 (F4) ve % 0,34 (F9) arasında değişmekte olup ginogenik uyartıma en iyi cevabın bitki büyüme hormonları ve 100 g/l sukroz içeren MS temelli F9 besi yerinden geldiği belirlenmiştir (Tablo 4).

AT hattına ait tomurcuklardan ginogenik bitki gelişimi ise A₄₁₀₀, F4 ve F9 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. Bu besi yerlerindeki ginogenik bitki oluşturma oranları ise % 0,07 (A₄₁₀₀), % 0,14 (F4) ve % 0,26 (F9) arasında değişmektedir. A₄₁₀₀ besi yerinde gelişim gösteren ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı % 100; F4 besi yerinde gelişim gösteren ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı % 100; F9 besi yerinde gelişim gösteren ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı ise % 75 olarak belirlenmiştir. A₁₀₀ besi yerlerinde gelişen ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir (Tablo 4).

Bu çalışmada *A. tuncelianum*'un AT hattının, ginogenik uyartıma cevap verdiği BDS ve MS temelli besi yerlerinin ginogenik uyartıma etkileri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Tablo 4).

Tablo 4: AT hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)
A40	330	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A450	420	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A4100	1.404	1(0,07) A	1 (0,07) A	1 (0,07) A
A0	330	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A50	180	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A100	2.610	2 (0.08) A	2 (0.08) A	0 (0) A
ΣBDS	5.274	3(0,06)	3 (0,06)	1 (0,02)
F	540	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F2	390	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F4	720	1 (0,14) A	1 (0,14) A	1 (0,14) A
F7	570	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F9	1.170	4 (0,34) A	4 (0,34) A	3 (0,26)A
F11	210	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F13	180	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F14	690	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
ΣMS	4.470	5 (0,11)	5 (0,11)	4 (0,09)

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

ATP hattından, BDS temelli yedi farklı besi yerinde (A₀, A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀) toplam 6.270 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. ATP hattına ait tomurcukların A₁₀₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz), A₄₅₀ (50 g/l sukroz) ve A₄₁₀₀ (100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurcukların ekimlerinden elde edilen verilere bakıldığında yedi tane (% 0,11) ginogenik bitkicik, iki tane (% 0,03) ginogenik bitki elde edilmiştir. A₁₀₀ besi yerine ekilen 780 tomurcuktan iki tane (% 0,26) ginogenik bitkicik gelişirken ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir. A₄₅₀ besi yerine ekilen 900 tomurcuktan dört tane (% 0,44) ginogenik bitkicik, iki tane (% 0,22) ginogenik bitki gelişmiştir. A₄₁₀₀ besi yerine ekilen 1.680 tomurcuktan bir tane (% 0,06) ginogenik bitkicik gelişirken ginogenik bitkiciğin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir. A₀, A₅₀, A₇₅ ve A₄₀ besi yerlerine ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik elde edilememiştir. ATP hattının ginogenik uyartıma cevap verdiği BDS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın 50 g/l sukroz içerdiği belirlenmiş (Tablo 5).

ATP hattından, MS temelli sekiz farklı besi yerinde (F, F2, F3, F4, F6, F10, F12 ve F14) toplam 4.050 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. ATP hattına ait tomurcukların farklı MS temelli besi yerlerine ekimlerinden elde edilen verilere bakıldığında ise sadece F14 (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) besi yerine ekilen tomurcuklardan bir tane (% 0,02) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. F14 besi yerine ekilen 1.050 tomurcuktan bir tane (% 0,09) ginogenik bitkicik gelişirken ginogenik bitkiciğin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir. F, F2, F3, F4, F6, F10 ve F12 besi yerlerine ekilen tomurcuklardan ginogenik bitkicik elde edilememiştir (Tablo 5).

ATP hattına ait tomurcukların BDS ve MS temelli farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilerin tamamı birlikte değerlendirildiğinde ise ATP hattı için kullanılan 15 farklı besi yerlerinden dördünde (A₁₀₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀ ve F14) ginogenik bitkicik, bir tanesinde (A₄₅₀) ginogenik bitki gelişmiştir. ATP hattına ait tomurcukların ginogenik bitkicik oluşturma oranları % 0,06 (A₄₁₀₀), % 0,09 (F14), % 0,26 (A₁₀₀) ve % 0,44 (A₄₅₀) arasında değişmekte olup ginogenik uyartıma en iyi cevabın bitki büyüme hormonları bulundurmuyup 50 g/l sukroz içeren BDS temelli A₄₅₀ besi yerinden geldiği belirlenmiştir (Tablo 5).

ATP hattına ait tomurcuklardan ginogenik bitki gelişimi ise sadece A₄₅₀ besi yerinde % 0,22 oranında gerçekleşmiştir. A₄₅₀ besi yerinde gelişim gösteren ginogenik bitkiciklerin ginogenik bitkiye dönüşüm oranı % 50 olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

Bu çalışmada, iki hattan 18.414 açmamış tomurcuğun kültüre alınması sonucunda 16 adet (% 0,08) ginogenik bitkicik elde edilmiş olup bu ginogenik bitkiciklerin yedi tanesi (% 0,04) bitkiye dönüşmüştür (Tablo 4 ve 5). Ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranı ise % 43,7 olarak belirlenmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiler laboratuvarında camsılaşmış olup seraya aktarılamamıştır. Bu besi yerlerinin ginogenik uyartıma etkileri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5: ATP hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)
A40	600	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
A450	900	4 (0,44) A	4 (0,44) A	2 (0,22) A
A4100	1.680	1 (0,06) A	1 (0,06) A	0 (0) B
A0	660	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
A50	900	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) B
A75	750	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
A100	780	2 (0,26) A	2 (0,26) A	0 (0) A
ΣBDS	6.270	7(0,11)	7 (0,11)	2 (0,03)
F	720	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F2	210	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F3	390	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F4	420	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F6	240	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F10	720	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F12	300	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) AB
F14	1.050	1 (0,09) A	1 (0,09) A	0 (0) AB
ΣMS	4.050	1 (0,02)	1 (0,02)	0

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

3.2 Somatik Uyartıma Gelen Cevaplar

Somatik uyartım için BDS ve MS temelli 19 farklı besi yerinde AT ve ATP hatlarından 18.414 tanesi açmamış olmak üzere toplam 20.064 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. AT ve ATP hatlarının besi yerlerindeki somatik uyartıma cevap verme oranlarına bakılmıştır.

AT hattından, BDS temelli altı farklı besi yerlerinde (A₀, A₅₀, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀ ve A₄₁₀₀,) toplam 5.274 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. A₅₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 50 g/l sukroz) ve A₁₀₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurcuklardan, 95 tane (% 1,80) somatik bitkicik ve 12 tane (% 0,23) somatik bitki elde edilmiştir. A₅₀ besi yerine ekilen 180 tomurcuktan, sekiz tane (% 4,44) somatik bitkicik ve ve bir tane (% 0,55) somatik bitki elde edilmiştir. A₁₀₀ besi yerine ekilen 2.610 tomurcuktan, 87 tane (% 3,33) somatik bitkicik ve 11 tane (% 0,42) somatik bitki elde edilmiştir. A₀, A₄₀, A₄₅₀ ve A₄₁₀₀ besi yerlerinde

somatik bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. AT hattının somatik uyartıma cevap verdiği BDS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonları ve 50 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerleri olduğu belirlenmiştir (Tablo 6).

AT hattından, MS temelli sekiz farklı besi yerlerinde (F, F2, F4, F7, F9, F11, F13, F14) toplam 4.470 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. AT hattına ait tomurcukların F7 (1 mg/l NAA + 8 mg/l 2İP + 50 g/l sukroz), F9 (1 mg/l NAA + 8 mg/l 2İP + 100 g/l sukroz), F11 (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 25 g/l sukroz) ve F14 (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurcuklardan 39 tane (% 0,87) somatik bitkicik ve altı tane (% 0,13) somatik bitki elde edilmiştir. F7 besi yerine ekilen 570 tomurcuktan altı tane (% 1,05) somatik bitkicik ve bir tane (% 0,18) somatik bitki elde edilmiştir. F9 besi yerine ekilen 1.170 tomurcuktan 27 tane (% 2,31) somatik bitkicik ve beş tane (% 0,43) somatik bitki elde edilmiştir. F11 besi yerine ekilen 210 tomurcuktan bir tane (% 0,48) somatik bitkicik oluşurken bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. F14 besi yerine ekilen 690 tomurcuktan beş tane (% 0,73) somatik bitkicik oluşurken bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. F, F2, F4 ve F13 besi yerlerinde somatik bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. AT hattının somatik uyartıma cevap verdiği MS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonları ve 25 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinin olduğu belirlenmiştir (Tablo 6).

AT hattına ait tomurcukların BDS ve MS temelli farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilerin tamamı birlikte değerlendirildiğinde ise AT hattı için kullanılan 14 farklı besi yerinden altısında (A₅₀, A₁₀₀, F7, F9, F11 ve F14) somatik bitkicik, dördünde (A₅₀, A₁₀₀, F7 ve F9) somatik bitki gelişmiştir. Somatik bitkicik oluşturma oranları % 0,48 (F11), % 0,73 (F14), % 1,05 (F7), % 2,31 (F9), % 3,33 (A₁₀₀) ile % 4,44 (A₅₀) arasında değişmekte olup somatik sürgün gelişimine en iyi cevabın bitki büyüme hormonları ve 50 g/l sukroz içeren BDS temelli A₅₀ besi yerinden geldiği belirlenmiştir (Tablo 6).

AT hattına ait somatik bitkiciklerden bitki gelişimi ise A₅₀, A₁₀₀, F7 ve F9 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. Somatik bitki oluşturma oranları ise % 0,18 (F7), % 0,42 (A₁₀₀), % 0,43 (F9) ile % 0,55 (A₅₀) arasında değişmektedir. Besi yerinde gelişim gösteren somatik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranları % 16,66 (F7), % 12,64 (A₁₀₀), % 18,52 (F9) ve % 12,5 (A₅₀) olarak belirlenmiştir (Tablo 6).

Bu çalışmada BDS ve MS temelli besi yerleri ile *A. tuncelianum*'un AT hattının somatik sürgün gelişimi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Tablo 6).

Tablo 6: AT hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki somatik bitkicik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı (%)	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Somatik Bitkicik Sayısı (%)	Somatik Bitki Sayısı (%)
A40	330	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A450	420	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A4100	1.404	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A0	330	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A50	180	8 (4,44) A	8 (4,44) A	1 (0,55) A
A100	2.610	87 (3,33) A	87 (3,33) A	11 (0,42) A
ΣBDS	5.274	95 (1,80)	95 (1,80)	12 (0,23)
F	540	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F2	390	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F4	720	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F7	570	6 (1,05) A	6 (1,05) A	1 (0,18) A
F9	1.170	27 (2,31) A	27 (2,31) A	5 (0,43) A
F11	210	1 (0,48) A	1 (0,48) A	0 (0) A
F13	180	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F14	690	5 (0,73) A	5 (0,73) A	0 (0) A
ΣMS	4.470	39 (0,87)	39 (0,87)	6 (0,13)

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

ATP hattından, BDS temelli yedi farklı besi yerlerine (A₀, A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, A₄₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀,) toplam 6.270 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. A₅₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 50 g/l sukroz), A₇₅ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 75 g/l sukroz) ve A₁₀₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurculardan 68 tane (% 1,09) somatik bitkicik ve sekiz tane (% 0,13) somatik bitki elde edilmiştir (Tablo 7). A₅₀ besi yerine ekilen 900 tomurcuktan 35 tane (% 3,89) somatik bitkicik ve altı tane (% 0,67) somatik bitki elde edilmiştir. A₇₅ besi yerine ekilen 750 tomurcuktan 13 tane (% 1,73) somatik bitkicik oluşurken bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. A₁₀₀ besi yerine ekilen 780 tomurcuktan 19 tane (% 2,43) somatik bitkicik ve iki tane (% 0,25) somatik bitki elde edilmiştir. A₀, A₄₀, A₄₅₀ ve A₄₁₀₀ besi yerlerinde somatik bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. ATP hattının somatik uyartıma cevap verdiği BDS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme

hormonları ve 50 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinin olduğu belirlenmiştir (Tablo 7).

ATP hattından, MS temelli sekiz farklı besi yerlerine (F, F2, F3, F4, F6, F10, F12, F14) toplam 4.050 adet tomurcuk kültüre alınmıştır. F6 (1 mg/l NAA + 8 mg/l 2İP + 25 g/l sukroz), F12 (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 50 g/l sukroz) ve F14 (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz) besi yerlerine ekilen tomurcuklardan 35 (% 0,86) somatik bitkicik ve yedi (% 0,17) somatik bitki elde edilmiştir. F6 besi yerine ekilen 240 tomurcuktan bir tane (% 0,42) somatik bitkicik ve bir tane (% 0,42) somatik bitki elde edilmiştir. F12 besi yerine ekilen 300 tomurcuktan sekiz tane (% 2,67) somatik bitkicik gelişirken bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. F14 besi yerine ekilen 1.050 tomurcuktan 26 tane (% 2,48) somatik bitkicik ve altı tane (% 0,57) somatik bitki elde edilmiştir. F, F2, F3, F4 ve F10 besi yerlerinde somatik bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. ATP hattının somatik uyartıma cevap verdiği MS temelli besi yerlerinin, bitki büyüme hormonları ve 25 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinin olduğu belirlenmiştir (Tablo 7).

ATP hattına ait tomurcukların BDS ve MS temelli farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilerin tamamı birlikte değerlendirildiğinde ise ATP hattı için kullanılan 15 farklı besi yerinden altısında (A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, F6, F12 ve F14) somatik bitkicik, dördünde (A₅₀, A₁₀₀, F6 ve F14) somatik bitki gelişmiştir. Somatik bitkicik oluşturma oranları % 0,42 (F6), % 1,73 (A₇₅), % 2,43 (A₁₀₀), % 2,48 (F14), % 2,67 (F12) ile % 3,89 (A₅₀) arasında değişmekte olup somatik uyartıma en iyi cevabın bitki büyüme hormonları ve 50 g/l sukroz içeren BDS temelli A₅₀ besi yerinden geldiği belirlenmiştir (Tablo 7).

ATP hattına ait somatik bitkiciklerden bitki gelişimi ise A₅₀, A₁₀₀, F6 ve F14 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. Bu besi yerlerindeki somatik bitki oluşturma oranları % 0,25 (A₁₀₀), % 0,42 (F6), % 0,57 (F14) ile % 0,67 (A₅₀) arasında değişmektedir. Somatik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranları % 10,52 (A₁₀₀), % 100 (F6), % 23,07 (F14) ve % 17,14 (A₅₀) olarak belirlenmiştir (Tablo 7).

Bu çalışmada BDS ve MS temelli besi yerleri ile *A. tuncelianum*'un ATP hattının somatik sürgün gelişimi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7: ATP hattının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki somatik bitkiçik ve bitki oluşumu

Besi Yeri Adı	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Somatik Bitkicik Sayısı (%)	Somatik Bitki Sayısı (%)
A40	600	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A450	900	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A4100	1.680	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A0	660	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
A50	900	35 (3,89) A	35 (3,89) A	6 (0,67) A
A75	750	13 (1,73) A	13 (1,73) A	0 (0) A
A100	780	19 (2,43) A	19 (2,43) A	2 (0,25) A
ΣBDS	6.270	68 (1,09)	68 (1,09)	8(0,13)
F	720	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F2	210	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F3	390	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F4	420	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F6	240	1 (0,42) A	1 (0,42) A	1 (0,42) A
F10	720	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
F12	300	8 (2,67) A	8 (2,67) A	0 (0) A
F14	1.050	26 (2,48) A	26 (2,48) A	6 (0,57) A
ΣMS	4.050	35 (0,86)	35 (0,86)	7 (0,17)

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

3.3 Tomurcuk Boyutunun ve Genotipin Ginogenesis Uyarımına Etkisi

AT (açmış, büyük, orta ve küçük) ve ATP (büyük, orta ve küçük) hatlarına ait tomurcuklar kullanarak tomurcuk boyutunun ginogenesis uyarımına etkisine bakıldı. AT hattından 1.650 açmış çiçek, 1.950 büyük, 3.294 orta ve 2.850 küçük ebatta tomurcuk kültüre alındı. Açmış çiçeklerde ginogenik bitkicik oluşumu gözlenmemiştir. Büyük tomurcuklardan üç tane (% 0,15) ginogenik bitkicik ve iki tane (% 0,10) ginogenik bitki gelişmiş olup ginogenik bitkiciklerin ginogenik bitkiye dönüşüm oranı % 66,66 olarak belirlenmiştir. Orta büyüklükteki tomurcuklardan dört tane (% 0,12) ginogenik bitkicik ve iki tane (% 0,06) ginogenik bitki gelişmiş olup ginogenik bitkiciklerin ginogenik bitkiye dönüşüm oranı % 50 olarak belirlenmiştir. Küçük tomurcuklardan ise bir tane (% 0,04) ginogenik bitkicik ve bir tane (% 0,04) ginogenik bitki gelişmiş olup ginogenik

bitkiciklerin ginogenik bitkiye dönüşüm oranı ise % 100 olarak belirlenmiştir (Tablo 8).

ATP hattından 2.730 büyük, 5.790 orta ve 1.740 küçük tomurcuk kültüre alındı. Büyük tomurcuklardan iki tane (% 0,07) ginogenik bitkicik gelişirken, bitki gelişimi gözlenmemiştir. Orta büyüklükteki tomurcuklardan dört tane (% 0,07) ginogenik bitkicik ve iki tane (% 0,03) ginogenik bitki gelişmiş olup ginogenik bitkiciklerin ginogenik bitkiye dönüşüm oranı % 50 olarak belirlenmiştir. Küçük tomurcuklardan ise iki tane (% 0,12) ginogenik bitkicik gelişirken bitki gelişimi gözlenmemiştir. AT ve ATP hatlarından kültüre alınan tomurcukların boyutları ile ginogenese verdikleri cevap arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır (Tablo 8).

Tablo 8: AT ve ATP hatlarının BDS ve MS temelli besi yerlerindeki tomurcuk boyutuna göre ginogenik bitkicik ve bitki oluşumu

Genotip	Tomurcuk Boyutu	Ekilen Tomurcuk Sayısı	Cevap Veren Tomurcuk Sayısı (%)	Ginogenik Bitkicik Sayısı (%)	Ginogenik Bitki Sayısı (%)
AT	AÇMIŞ ÇİÇEK	1.650	0 (0) A	0 (0) A	0 (0) A
AT	BÜYÜK	1.950	3 (0,15) A	3 (0,15) A	2 (0,10) A
AT	ORTA	3.294	4 (0,12) A	4 (0,12) A	2 (0,06) A
AT	KÜÇÜK	2.850	1 (0,04) A	1 (0,04) A	1 (0,04) A
ATP	BÜYÜK	2.730	2 (0,07) A	2 (0,07) A	0 (0) A
ATP	ORTA	5.790	4 (0,07) A	4 (0,07) A	2 (0,03) A
ATP	KÜÇÜK	1.740	2 (0,12) A	2 (0,12) A	0 (0) A

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

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

A. tuncelianum 'da yapılan uyartım çalışmaları sonucunda elde edilen ginogenik ve somatik bitkiler belirli bir aşamaya geldiklerinde ploidi analizleri yapıldı. Toplamda altı adet ginogenik, altı adet somatik bitki flow sitometri kullanılarak test edildi. Analizi yapılan altı adet ginogenik bitkinin bir tanesi (% 16,66) haploid (13,4 pg/2CDNA), dört tanesi (% 66,66) diploid (26,75 pg/2CDNA),

bir tanesi (% 16,66) haploid ve diploid hücreler için miksoploid olarak tespit edilmiştir (Tablo 9). Altı adet somatik bitkinin flow sitometri ile DNA miktarı test edilmiş ve altı tanesinin de (% 100) diploid olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9: Elde edilen ginogenik ve somatik bitkilerin ploidi seviyeleri

Genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi düzeyi		
		x (%)	x+2x (%)	2x (%)
Ginogenik	6	1 (16,66)	1 (16,66)	4 (66,66)
Somatik	6	-	-	6 (100)

4. TARTIŞMA

Bu çalışma, *A. tuncelianum* türüne ait hatların ginogenik ve somatik uyartıma cevap verdiğini ve bu cevapların farklı besi ortamlarında farklı oranlarda olduğunu göstermiştir. Literatürde *Allium* (*A. cepa* ve *A. ampeloprasum*)’larla ilgili ginogenesis çalışmaları bulunmaktayken, *A. tuncelianum* ile ilgili yapılmış kapsamlı bir ginogenesis çalışması bulunmamaktadır. 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).

Bu çalışmada, iki hattan 18.414 açmamış tomurcuğun kültüre alınması sonucunda 16 tane (% 0,08) ginogenik bitkicik elde edilmiş olup bu ginogenik bitkiciklerin yedi tanesi (% 0,04) bitkiye dönüşmüştür. AT hattı, bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın 100 g/l sukrozun bulunduğu besi yerlerinde ginogenesisise cevap verirken, ATP hattının ise bitki büyüme hormonlarının varlığına bağlı olmaksızın 50 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde ginogenesisise cevap verdiği tespit edilmiştir. *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; Elver 2018). Alan ve diğ. (2016b) pırasada yaptıkları çalışmada 133 (% 0,58) tane ginogenik bitki elde etmişlerdir. Ayrıca Celebi-Toprak ve diğ. (2016) yine pırasa üzerindeki denemelerinde bitki büyüme hormonları içermeyen ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerine ekilen tomurcuklardan yüksek oranda (% 5) ginogenik bitki elde etmişlerdir. Alan ve diğ. (2016a) *A. ampeloprasum* ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri verilere göre ginogenesisise cevap veren besi yerlerinin 50 g/l ve üzerinde sukroz içerdiklerini belirtmişlerdir. Akgün (2018) *A. ampeloprasum* da ginogenesisise cevap veren besi yerlerinin 25 g/l ve üzerinde sukroz içeren besi yerleri olduğunu belirtmiştir. Elver (2018) *A. sandrasicum*’da ginogenesis uyartımına en iyi cevap veren tomurcukların besi yeri içeriği tüm genotipler için bitki büyüme düzenleyicilerini içermeyen ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerinde olduğunu belirtmiştir.

A.tuncelianum ile ilgili daha önce yapılan ginogenesis çalışmaları da bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Kaska (2013), *A. tuncelianum* ile birinci yıl yaptığı çalışmada BDS ve MS temelli besi yerlerinde kültüre aldıkları 2.760 adet tomurcuktan ginogenik embriyo elde edememiştir. İkinci yıl yaptığı çalışmada BDS, MS ve B5 temelli bitki büyüme hormonları ve 100 g/l sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları 3.110 adet tomurcuktan, üç tane (% 0,09) ginogenik embriyo elde ederken ginogenik bitkicik ve bitki elde edememiştir. Ginogenik embriyolardan bir tanesini BDSA (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz), iki tanesini ise MSD (1 mg/l NAA + 8 mg/l 2İP + 100 g/l sukroz) besi yerlerinden elde etmiştir.

Bu çalışmada, *A.tuncelianum*'da ilk kez ginogenik bitkicik ve bitki elde edilmiş olup AT ve ATP hatlarına ait tomurcukların farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilere bakıldığında ginogenik bitkicik gelişimi BDS ve MS temelli A₁₀₀, A₄₁₀₀, A₄₅₀, F4, F9 ve F14 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. AT ve ATP hatlarına ait tomurcuklardan ginogenik bitki gelişimi ise A₄₁₀₀, A₄₅₀, F4 ve F9 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. Ginogenik uyartıma AT ve ATP hatlarının verdiği en yüksek cevaplar sırasıyla bitki büyüme hormonu içeren MS temelli F9 (1 mg/l NAA+ 8 mg/l 2İP + 100 g/l sukroz) ve bitki büyüme hormonu içermeyen BDS temelli A₄₅₀ (50 g/l sukroz) besi yerlerindeki çiçek tomurcuklarından gelmiştir. Bu durumun nedeninin genotip etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, iki hattan 18.414 açmamış tomurcuğun kültüre alınması sonucunda 237 tane (% 1,3) somatik bitkicik elde edilmiş olup bu somatik bitkiciklerin 33 tanesi (% 0,2) bitkiye dönüşmüştür. AT ve ATP hatlarının somatik sürgün gelişimine bitki büyüme hormonları ve 25 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde cevap verdiği tespit edilmiştir. Kaska (2013), *A. tuncelianum* ile birinci yıl yaptığı çalışmada BDS ve MS temelli bitki büyüme hormonları ve 30 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları 2.760 adet tomurcuktan, 24 adet (% 0,86) somatik kallus elde ederken somatik bitkicik ve bitki elde edememiştir. Bu somatik kallusların dokuz tanesi (% 0,78) BDSA (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz), iki tanesi (% 0,74) MSB (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 30 g/l sukroz) ve 13 tanesi (% 8,66) BDSC (1 mg/l NAA + 2 mg/l 2İP + 100 g/l sukroz) besi yerinden elde edilmiştir. İkinci yıl yaptığı çalışmada BDS, MS ve B5 temelli

bitki büyüme hormonları ve 30 g/l ve üzeri sukroz içeren besi yerlerinde kültüre aldıkları 3.110 adet tomurcuktan, 55 adet (% 1,76) somatik kallus elde ederken somatik bitkicik ve bitki elde edememiştir. Somatik kallusların 32 tanesi (% 2,99) BDSA (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 100 g/l sukroz), bir tanesi (% 0,25) MSB (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 30 g/l sukroz) ve 22 tanesi (% 2,35) B5B (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 75 g/l sukroz) besi yerinden elde etmiştir. Kaska (2013), çalışmalarında ginogenik, somatik bitkicik ve bitkilerin elde edilememesinin nedeni genotip etkisi olabilir. Bu çalışmada ise farklı olarak *A. tuncelianum*'un AT ve ATP hatlarına ait tomurcuklardan somatik bitkicik ve bitki elde edilmiştir.

AT ve ATP hatlarına ait tomurcukların farklı besi yerlerine ekiminden elde edilen verilere bakıldığında somatik bitkicik gelişimi BDS ve MS temelli A₅₀, A₇₅, A₁₀₀, F6, F7, F9, F11, F12 ve F14 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. AT ve ATP hatlarına ait tomurcuklardan somatik bitki gelişimi ise A₅₀, A₁₀₀, F6, F7 ve F9 ve F14 besi yerlerinde gerçekleşmiştir. Somatik uyartıma AT ve ATP hatlarının verdiği en yüksek cevaplar BDS temelli A₅₀ (2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP + 50 g/l sukroz) besi yerlerindeki çiçek tomurcuklarından gelmiştir. Bitki büyüme hormonu içeren besi yerlerinin *Allium*'larda somatik uyartımı tetiklediği başka çalışmalarda da belirtilmiştir (Yan ve diğ. 2009; Luciani ve diğ. 2006). Elver (2018) *A. sandrasicum*'da somatik rejenerasyon için bitki büyüme hormonlarının varlığının etkili olduğunu belirtmiştir.

Ginogenik uyartıma açmış çiçeklerden cevap alınamamışken, büyük, orta ve küçük tomurcuklardan cevaplar alınmıştır. AT ve ATP hatlarından beş tanesi büyük, sekiz tanesi orta ve üç tanesi ise küçük tomurcuklardan olmak üzere toplam 16 ginogenik bitkiciğin geliştiği bu ginogenik bitkiciklerden bitkiye dönüşenlerin ise ikisinin büyük, dördünün orta, birinin ise küçük tomurcuklardan geliştiği gözlenmiştir. Ginogenesise verilen en iyi cevapların büyük ve orta büyüklükteki tomurcuklardan geldiği görülmüştür. Ovüllerin gelişim aşamasının haploid bitki elde etme sürecine etkisi olduğu bilinmektedir (Chen ve diğ. 2011). Daha önce Alan ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada tomurcuk boyutunun bir *Allium* türü olan *A. cepa*'da ginogenesise etki ettiği ifade edilmiştir.

Bu çalışma, *A. tuncelianum* türünün ginogenik ve somatik uyartıma cevabının araştırılması için yapılmıştır. Bu çalışma ile ilk defa ginogenik, somatik

bitkicik ve bitki elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada ginogenik ve somatik uyartımı etkileyen önemli faktörlerin besi yeri içeriği, genotip etkisi ve tomurcuk büyüklüğü olduğu gösterilmiştir. Biyoteknolojik yöntemler aracılığı ile Türkiye'nin endemik türlerinden biri olan *A. tuncelianum*'un kısa sürede ıslah edilebilecek potansiyelde olduğu gösterilmiştir. Bundan sonraki *A. tuncelianum*'da ıslah çalışmalarında ginogenesisin performansını artırabilmek için bu çalışmada cevap alınan besi yerleri (A₁₀₀, A₄₅₀, A₄₁₀₀, F4, F9 ve F14) kullanılabilir, daha fazla genotip denenebilir ve kültüre alınacak olan tomurcukların orta ve büyük ebatta olmaları önerilir.



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. and 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. and Earle E.D., “Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials”, *Plant Sci.* 167, 1055–1066, (2004).
- Alan, A.R., Celebi Toprak, F. and Kaska, A., “Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants”, *Plant Cell Tiss Org Cult*, 125, 249-259, (2016a).
- Alan, A. R. and Çelebi 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).
- Arumuganathan, K. and 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. and Djilianov, D. “*In vitro* production of haploid plants”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 400-408, (1995).
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., “Bitki Biyoteknolojisi Doku kültürü ve Uygulamaları” 975-6652-04-7, (2002).
- Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A. and 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. and Jakse M., “Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions”, *Plant Cell Reports*, 18, 737-742, (1999).
- Campion, B. and 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. and Falavigna, A., “Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis”, *Plant Sci.*, 86, 97–104, (1992).

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

CelebiToprak, F. and 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).

CelebiToprak, F., Akgun, 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*, 98, (2017).

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

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

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

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

Ekşi, G. and Koyuncu, M., “*Allium tuncelianum* (Amaryllidaceae) türü üzerine morfolojik ve etnobotanik bir çalışma (Sect. Allium)”, XX. Bitkisel İlaç Hammadedeleri Toplantısı (2012,Ocak).

Elver, E., “*Allium sandrasucum*’da *in vitro* kültür oluşturulması ve rejenerantların karakterize edilmesi”, Yüksek Lisans, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, (2018).

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

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

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

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

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

Gürel, S., Gürel, E. and Kaya, Z., "Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) ", *Plant Cell Rep.*, 19 (12), 1155-1159, (2000).

Hao, J., You, C. and 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).

Hered, J., "Monoploidy in cucumbers", *Aalders KE0*, 49, 41-44, (1958).

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

Kaska, A., "Bazı yenilebilir *Allium* Türlerinde Ginogenesis Uyartımı ve Klonal Çoğaltma Olanaklarının Araştırılması", Doktora Tezi, *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. and Korzun, L., "Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species", (Eds: Jain MS, Sopory SK, Veilleux RE), *In vitro* haploid production in higher plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, vol 3, 51–75, (1996).

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

Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A., "Distribution and transmission of Iris yellow spot virus", *Plant Disease* 85 (8): 838-842, (2001)

Luciani, G. F., Ana K. M., Pellegrini, C. and Curvetto, N. R. "Effects of Explants and Growth Regulators in Garlic Callus Formation and Plant Regeneration.", *Plant Cell, Tiss and Org Cult*, 87, 139-143, (2006).

Mukhambetzhonov, S. K., "Growth and morphogenesis of nonfertilized ovaries of wheat *in vitro*", PhD Thesis, *Main Botanical Garden Acad. of Sci. of Kazakstan*, Alma-Ata, (1992).

Murashige, T. and 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., and 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).

Özzambak, E., 1992. Pırasada ovaryum ve polen kültürü. *Türkiye 1, Ulusal Bahçe Bitk. Kong., Bild.*, 13-16 Ekim 1992, İzmir, 11, 223–236.

Pochard, E. and Dumas de Vaulx, R., “La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*)”, *Z. für Pflanzenzüchtg*, 65, 23–46, (1971).

Ramulu, K.S. and 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 Amelior Plant*, 26, 751–754, (1976).

San Noeum L.H. and Gelebart P., “Production of gynogenic haploids”, (Ed: Vasil, I. K.,) *Cell culture and somatic cell genetics of plants vol 3*. Academic, New York, 305–322, (1986).

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).

Sarı, N., Abak, K., Pitrat, M. ve Dumas de Valux R., “Kavunlarda (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud ve *C. melo* L. var. *reticulatus* Naud.) partenogenetik haploid embriyo uyartımı ve bitki eldesi”, *Doğa Tr. J. Agric. Forest*, 16, 302–314, (1992).

Schum, A., Mattiesch, I., Timmann, E. and 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).

Takım, K., “Tunceli Dağ sarımsağının (*Allium tuncelianum*) *in vitro* antioksidan kapasitesinin ölçülmesi, ratlarda antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etki ve antikanser özelliğinin belirlenmesi”, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, (2015).

Thomas D.T., Bhatnagar A. K., Razdan M.K. ve 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. and 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. and Afza, R., “Induction and verification of autotetraploids and diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques”, *Euphytica*, 88, 25–34, (1996).

Wu, B.J. and 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. and Guo, D., “Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*)”, *Sci.Hortic*, 123(1), 124-128, (2009).

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

Zhu, Z. and Wu H., “*In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*”, *Acta Genet. Sin.* 6, 181-183, (1979).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep Ergün
Doğum Yeri ve Tarihi : Erzincan – 1981
Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi
Elektronik posta : zeynepppergun@gmail.com
İletişim Adresi :Şehit Cevdet Özdemir M. 1346 S. No:4/1
Çankaya / Ankara

2005 tarihinden itibaren biyoloji öğretmeni olarak çalışmaktadır.