

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Başar SEVİNDİK

**SİKLAMENDE ANTER VE OVÜL KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ
İLE HAPLOİD BİTKİLERİN ELDE EDİLMESİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİKLAMENDE ANTER VE OVÜL KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ İLE
HAPLOİD BİTKİLERİN ELDE EDİLMESİ**

Başar SEVİNDİK

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 18/01/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Nebahat SARI
ÜYE

.....
Prof. Dr. Ş. Şebnem. ELLİALTIOĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2015-5009**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

SİKLAMENDE ANTER VE OVÜL KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ İLE HAPLOİD BİTKİLERİN ELDE EDİLMESİ

Başar SEVİNDİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
YIL: 2018, Sayfa: 177
JÜRİ : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Nebahat SARI
: Prof. Dr. Şebnem Ş. ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Yrd. Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK

Bu çalışmada *C. persicum*, *C. coum*, *C. hederifolium*, *C. pseudibericum*, *C. cilicium* ile Melody F1 ticari çeşidinde ovül ve anter kültürü yöntemleri kullanılarak haploid bitki elde etme olanakları araştırılmıştır. Anter eksplantları, 2 gün +4°C soğuk uygulamalarından sonra 0, 1, 3, 5µM NAA, gümüş nitrat (AgNO₃) ve aktif karbon (0.5, 1 g/l) içeren B5 besi yerinde kültüre alınmıştır. Anter kültürü denemeleri sonucunda Melody F1 ticari çeşidinde anter kültüründe 1 g/l aktif karbon, 0.5 mg/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ +1 µM NAA, 0.5 mg/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ + 3 µM NAA ve 0.5 g/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ + 5 µM NAA içeren B5 besi yerinde kallus oluşumları gözlenmiştir. *C. persicum* türünde anter kültürü denemelerinde haploid embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşüm 5µM NAA içeren B5 besi yerinde meydana gelmiştir. *C. hederifolium* türünde ise 5µM NAA içeren B5 besi yerinde sürgün benzeri yapılar meydana gelmiştir. Ovül kültürü denemeleri sonucunda ise *C. persicum* ve Melody ticari çeşidinde kallus, embriyo ve bitkiye dönüşüm sırasıyla 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP ve 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir. *C. coum* ve *C. pseudibericum* türünde yalnızca kallus oluşumları gözlenmiştir. *C. cilicium* türünde embriyolar 0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP, 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. hederifolium* türünde ise 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kallus, embriyo ve sürgün benzeri yapılar oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Cyclamen*, *in vitro*, MS, B5, haploid

ABSTRACT

PhD THESIS

OBTAINING HAPLOID PLANT via ANTHER and OVULE CULTURE TECHNIQUES in CYCLAMEN

Başar SEVİNDİK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ

Year: 2018, Page: 177

Jury : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ

: Prof. Dr. Nebahat SARI

: Prof. Dr. Şebnem Ş. ELLİALTIOĞLU

: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

: Yrd. Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK

In this study, haploidization possibilities via ovule and anther culture were investigated in *C. persicum*, *C. coum*, *C. hederifolium*, *C. pseudibericum*, *C. cilicium* and Melody F1. Anthers were cultured on B5 medium including 0, 1, 3, 5 μ M NAA, charcoal (0.5, 1 mg/l), silver nitrate (AgNO_3) after 2 days +4°C cold pretreatment. Callus were observed from the anthers of Melody F1 commercial variety cultured on B5 medium including 1 g/l charcoal, 0.5 mg/l charcoal + %0.1 AgNO_3 +1 μ M NAA, 0.5 mg/l charcoal + %0.1 AgNO_3 + 3 μ M NAA and 0.5 g/l activated coal + %0.1 AgNO_3 + 5 μ M NAA. In *C. persicum* species, embryo and plants derieved from these embryos formed from anther explants were cultured on BS medium containing 5 μ M NAA. Shoot like formations were formed from anthers cultured on B5 medium including 5 μ M NAA in *C. hederifolium* species. As a result of ovule culture experiments of *C. persicum* and Melody F1 commercial variety, callus, embryo formations and shoots occured from MS medium supplied with 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP and 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP, respectively. In *C. coum* and *C. pseudibericum* species, only callus formations were formed. Embryos occured from MS medium containing 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP, 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP in *C. cilicium*. Callus, embryos, shoot like formations formed in MS medium containing 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP in *C. hederifolium* species.

Key Words: *Cyclamen*, *in vitro*, MS, B5, haploidy

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Türkiye sahip olduğu coğrafi konumu nedeniyle üç farklı floranın kesiştiği bölgede yer almaktadır. Dolayısıyla ülkemiz, bitkisel gen kaynakları açısından oldukça zengindir. Ülkemizde yayılış gösteren 12.500 bitki türünün yaklaşık 3.700 adedi endemiktir. Ülkemizde kültürü yapılan önemli süs bitkileri; zambak, lale, siklamen, anemon ve çiğdem'dir. Türkiye'de yayılış gösteren en önemli geofitlerden bir tanesi de *Cyclamen* cinsidir. Myrsinaceae familyasına ait olan bu tür dünya üzerinde 21, ülkemizde ise 10 tür ile yayılış göstermektedir. Ülkemizde yayılış gösteren siklamen türlerinin 6 tanesi endemiktir. Türkiye'de yayılış gösteren ve ilkbaharda çiçek açan siklamen türleri; *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, sonbaharda çiçek açan türler ise *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile*, *C. graecum*'dur. Endemik türler ise *C. cilicium*, *C. pseudibericum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, *C. mirabile*, *C. parviflorum* olarak bilinmektedir.

Ülkemizde özellikle süs bitkileri sektöründe karşılaşılan en önemli sorunların başında ıslah materyallerinde başka ülkelere bağımlı olmamız gelmektedir (Kaza ve ark., 2015). Üretim materyallerinde dışa bağımlı olmamız her yıl milyonlarca doların ıslahçı hakkı olarak ödenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla kendi çeşitlerimizin geliştirilmesi için ıslah materyali olarak kullanılacak saf hatların üretimi büyük önem kazanmaktadır.

Saf hat elde etmek için yapılan ıslah çalışmalarında biyoteknolojik yöntemler kullanılarak süre ve iş gücü açısından önemli avantajlar sağlanmaktadır. İslahta kullanılan en önemli biyoteknolojik yöntemlerden bir tanesi dihaploidizasyon yöntemidir. Bu teknik haploidizasyon ve dihaploidizasyon olarak iki aşamadan meydana gelmektedir. Haploid bitki, somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, generatif hücrelerindeki kromozom sayısı kadar olan bitkilere denilmektedir. Haploid hatların kromozomlarının kolhisin, oryzalin gibi kimyasallar ile katlanması sonucu dihaploid bireyler meydana gelmektedir.

Bu çalışmada *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. cilicium*, *C. hederifolium* ve Melody F1 ticari çeşidinin ovül ve anterleri eksplant olarak kullanılmıştır. Haploid bitki elde etmek için farklı boylarda alınan tomurcuklarda mikrosporların tek çekirdekli evrede olduğu tomurcuk boyu belirlenmiştir. Tek çekirdekli mikrospor hücrelerine sahip anterlerin bulunduğu tomurcuk boyları, *C. persicum* türünde 6.98-7.66 mm, *C. coum* türünde 5-5.42 mm, *C. pseudibericum* türünde 7.55 mm, Melody F1 ticari çeşidinde 7.05 mm, *C. hederifolium* türünde 8.05-9.05 mm ve *C. cilicium* türünde ise 4.74- 5.93 mm olarak saptanmıştır.

Tek çekirdekli evresi belirlenen tomurcuklara 2 gün boyunca +4°C soğuk uygulaması yapıldıktan sonra anter eksplantları NAA (0, 1, 3, 5µM), gümüş nitrat (%0.1, 0.3), aktif karbon (0.5, 1 g/l) içeren B5 besi yerinde, ovül eksplantları ise 2,4-D (0.5, 1, 1.5, 2 mg/l) ve 2iP (0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg/l) içeren MS besi yerinde kültüre alınmışlardır. Ovül ve anter kültürü denemeleri sonucunda Melody F1 ticari çeşidinde anter kültüründe 1 g/l aktif karbon, 0.5 mg/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ +1 µM NAA, 0.5 mg/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ + 3 µM NAA ve 0.5 g/l aktif karbon + %0.1 AgNO₃ + 5 µM NAA içeren B5 besi yerinde kallus oluşumları gözlenmiştir. *C. persicum* türünde anter kültürü denemelerinde haploid embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşüm, 5µM NAA içeren B5 besi yerinde meydana gelmiştir. *C. hederifolium* türünde ise 5µM NAA içeren B5 besi yerinde sürgün benzeri yapılar oluşmuştur. Ovül kültürü denemeleri sonucunda *C. persicum* ve Melody F1 ticari çeşidinde, kallus, embriyo ve bitkiye dönüşüm sırasıyla 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP ve 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerlerinde meydana gelmiştir. *C. coum* ve *C. pseudibericum* türünde yalnızca kallus oluşumları meydana gelmiştir. *C. cilicium* türünde embriyolar, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP, 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde oluşmuştur. *C. hederifolium* türünde ise 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kallus, embriyo ve sürgün benzeri yapıları meydana gelmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında destek olan ve yardımlarını esirgemeyen “Siklamende Anter ve Ovül Kültürü Yöntemleri ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi” başlıklı doktora tez konusunda çalışmama olanak sağlayan fikirleri, yönlendirmeleri ile bana her daim doğru yolu gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca düşünce ve fikirleri ile manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvarımızın kurucusu Sayın Prof. Dr. Selim ÇETİNER’e, Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Sayın Şebnem Şeküre ELLİALTIOĞLU’na, Prof. Dr. Nebahat SARI’ya doktora tezimde verdikleri destek, emek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora tez jüri üyelerimden lisansüstü öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Biyolog Tolga İZGÜ’ye, Yrd. Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK’e, Dr. Özhan ŞİMŞEK’e, Arş. Gör. Mehmet TÜTÜNCÜ’ye, ayrıca anterlerde tek çekirdekli mikrospor hücrelerinin aşamalarının tespitinde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Esin ARI’ya, histolojik analizler boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sinan ETİ ve Arş. Gör. Şenay KARABIYIK’a, flow sitometri analizleri boyunca yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Metin TUNA hocama teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerine ve bu tezin yapılmasında maddi destek sağlayan Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana desteklerini her zaman hissettiren ve her konuda koşulsuz yanımda olan kardeşim Onur SEVİNDİK’e, annem Sağmiye SEVİNDİK ve babam Necati SEVİNDİK’e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. <i>Cyclamen</i> Türlerinde Ovül Kültürü Çalışmaları	15
2.2. <i>Cyclamen</i> Türlerinde Anter Kültürü Çalışmaları.....	19
2.3. Süs Bitkilerinde Yapılmış Haploidizasyon Çalışmaları.....	21
2.3.1. Süs Bitkilerinde Androgenesis Yöntemi Kullanılarak Yapılmış Haploidizasyon Çalışmaları	21
2.3.2. Süs Bitkilerinde Gynogenesis Yöntemi Kullanılarak Yapılmış Olan Haploidizasyon Çalışmaları	24
2.4. Süs Bitkileri Dışında Diğer Bahçe Bitkilerinde Yapılmış Olan Haploidizasyon Çalışmaları	25
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Bitkisel Materyal.....	35
3.1.1. <i>Cyclamen persicum</i> Mill.	36
3.1.2. <i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i>	37
3.1.3. <i>Cyclamen pseudibericum</i> HILDEBRAND	38
3.1.4. <i>Cyclamen hederifolium</i> AITON.....	39
3.1.5. <i>Cyclamen cilicium</i> BOISS. ET HELDR.	40
3.1.6. Ticari Melody F1 Çeşidi	41

3.2. Metot.....	42
3.2.1. Anter Kùltürü Denemeleri	42
3.2.1.1. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması ve Mikrospor Hücrelerinin Tek Çekirdekli Evrelerinin Belirlenmesi	42
3.2.1.2. Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu	44
3.2.1.3. <i>In vitro</i> Anter Kùltürü Üzerine Soğuk, Aktif Karbon, Gümüş Nitrat (AgNO ₃) Uygulamaları	45
3.2.2. Ovül Kùltürü Denemeleri.....	49
3.2.2.1. Ovül kùltüründe Farklılaşma ve Embriyojenik Kallusların Çimlenmesi	51
3.2.3. Aday Haploid Bitkiciklerin Aklimatizasyonu.....	55
3.2.4. Flow Sitometri Analizleri.....	56
3.2.4.1. Yaprak Örneklerinin Hazırlanışı	56
3.2.4.2. Solüsyonların Hazırlanması	57
3.2.5. Histolojik analiz	59
3.2.5.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması	59
3.2.5.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması	60
3.2.5.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması.....	60
3.2.5.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması	61
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	63
4.1. Anter Kùltürü Bulguları	63
4.1.1. Çiçek Tomurcuklarında Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi.....	63
4.1.1.1. Sonbaharda Çiçeklenen Türlerde Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi.....	63
4.1.1.2. İlkbaharda Çiçeklenen Türlerde Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi	67
4.1.2. İlkbaharda Çiçeklenen <i>Cyclamen</i> Türlerinde Birinci Dönem Anter Kùltürü Bulguları	73

4.1.2.1. İlkbaharda Çiçeklenen <i>C. persicum</i> Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	74
4.1.2.2. <i>C. persicum</i> Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Deneme Bulguları	76
4.1.2.3. <i>C. persicum</i> türünde Anter Kültürü Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitkilerin Flow Sitometri Analizleri Bulguları ...	81
4.1.2.4. İlkbaharda Çiçeklenen <i>C. pseudibericum</i> Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	87
4.1.2.5. İlkbaharda Çiçeklenen <i>C. pseudibericum</i> Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	88
4.1.2.6. İlkbaharda Çiçeklenen <i>C. coum</i> türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	88
4.1.2.7. İlkbaharda Çiçeklenen <i>C. coum</i> Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	89
4.1.2.8. İlkbaharda Çiçeklenen Melody F1 Ticari Çeşidinde Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	90
4.1.2.9. İlkbaharda Çiçeklenen Melody F1 Ticari Çeşidinde Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	91
4.1.3. Sonbaharda Çiçeklenen <i>Cyclamen</i> Türlerinde Anter Kültürü Bulguları	93
4.1.3.1. <i>C. hederifolium</i> Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	93
4.1.3.2. <i>C. hederifolium</i> türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları	93
4.1.3.3. <i>C. cilicium</i> türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları..	95
4.1.3.4. <i>C. cilicium</i> türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları ...	95
4.2. Ovül Kültürü Bulguları	96
4.2.1. İlkbaharda Çiçeklenen <i>Cyclamen</i> Türlerinde Ovül Kültürü Bulguları	96

4.2.1.1. <i>C. persicum</i> L. Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü	
Bulguları	97
4.2.1.2. <i>C. persicum</i> türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Denemeleri	
Sonucunda Elde Edilen Bitkilerin Flow Sitometri Analizler	104
4.2.1.3. <i>C. persicum</i> L. Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları	
.....	106
4.2.1.4. <i>C. persicum</i> Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Sonucu Elde	
Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi	113
4.2.1.5. <i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i> Türünde Birinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları.....	113
4.2.1.6. <i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i> Türünde İkinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları.....	116
4.2.1.7. <i>Cyclamen pseudibericum</i> Türünde Birinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları.....	119
4.2.1.8. <i>Cyclamen pseudibericum</i> Türünde İkinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları.....	122
4.2.1.9. Melody F1 Ticari Çeşidinde Birinci Dönem Ovül Kültürü	
Bulguları	124
4.2.1.10. Melody F1 Ticari Çeşidinde Flow Sitometri Analizleri.....	127
4.2.1.11. Melody F1 Ticari Çeşidinde İkinci Dönem Ovül Kültürü	
Bulguları	130
4.2.1.12. Melody F1 ticari Çeşidinde İkinci Dönem Ovül Kültürü	
Sonucu Elde Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin	
Belirlenmesi.....	133
4.2.2. Sonbaharda Çiçeklenen <i>Cyclamen</i> Türlerinde Ovül Kültürü	
Bulguları	135
4.2.2.1. <i>Cyclamen hederifolium</i> Türünde Birinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları	135

4.2.2.2. <i>Cyclamen hederifolium</i> Türünde İkinci Dönem Ovül	
Kültürü Bulguları	138
4.2.2.3. <i>Cyclamen cilicium</i> Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü	
Bulguları.....	140
4.2.2.4. <i>Cyclamen cilicium</i> Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü	
Bulguları	144
4.3. <i>Cyclamen</i> Türlerinde Histolojik Analiz Bulguları	148
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	153
KAYNAKLAR	159
ÖZGEÇMİŞ	176



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Anter kültürü denemelerinde kullanılacak B5 besin ortamı ve içeriği	47
Çizelge 3.2.	Anter kültürü denemeleri kapsamında kullanılacak türler ve deneme planı	48
Çizelge 3.3.	Ovül kültürü denemelerinde kullanılacak MS besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları	52
Çizelge 3.4.	Ovül kültürü denemeleri kapsamında kullanılan türler ve deneme planı	53
Çizelge 4.1.	<i>C. persicum</i> ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen embriyo ve bitki gelişim oranları	80
Çizelge 4.2.	<i>C. persicum</i> türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda elde edilen embriyoların çimlendirme denemeleri	80
Çizelge 4.3.	Melody F1 ticari çeşidinde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen kallus yapılarının gelişim oranları.....	93
Çizelge 4.4.	<i>C. persicum</i> türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve aklimatizasyon sonrası bitkilerin yaşam oranları	103
Çizelge 4.5.	<i>C. persicum</i> türünde ovül kültüründen elde edilen bitkilerin flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen genom ağırlıkları.....	105
Çizelge 4.6.	<i>C.persicum</i> türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları.....	112
Çizelge 4.7.	<i>C. coum</i> türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları.....	115

Çizelge 4.8. <i>C. coum</i> türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları.....	118
Çizelge 4.9. <i>C. pseudibericum</i> türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	120
Çizelge 4.10. <i>C. pseudibericum</i> türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları.....	123
Çizelge 4.11. Melody F1 ticari çeşitte birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	129
Çizelge 4.12. Melody F1 ticari çeşitte ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	134
Çizelge 4.13. <i>C. hederifolium</i> türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	137
Çizelge 4.14. <i>C. hederifolium</i> türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	139
Çizelge 4.15. <i>C. cilicium</i> türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları	143
Çizelge 4.16. <i>C. cilicium</i> türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları.....	146

Şekil 1.1.	Ülkemizde yayılış gösteren <i>Cyclamen persicum</i> türünün doğada yayılış	3
Şekil 1.2.	<i>Cyclamen</i> bitkisinin morfolojik yapısı (Mendi ve Çürük 2016).....	5
Şekil 3.1.	Doğal yayılış alanında <i>C. persicum</i> türü	36
Şekil 3.2.	Doğal yayılış gösteren <i>C. coum</i> türü	37
Şekil 3.3.	Doğal yayılış gösteren <i>C. pseudibericum</i> türü	38
Şekil 3.4.	Doğal yayılış gösteren <i>C. hederifolium</i> türü resim büyüklükleri aynı	40
Şekil 3.5.	Doğal yayılış gösteren <i>C. cilicium</i> türü	41
Şekil 3.6.	Melody F1 ticari siklamen çeşidi	42
Şekil 3.7.	Anter kültürü denemeleri için tek çekirdekli evrenin belirlenmesi hazırlık aşamaları, A) Farklı boyutlardaki tomurcukları bulunduran bitki, B) Çiçek tomurcuklarının içerisinden çıkarılmış anter eksplantları, C) DAPI boyası ile boyanan anterlerden izole edilmiş tek çekirdekli mikrospor hücresi, D) Farklı boylardaki çiçek tomurcuklarının ölçülmesi	44
Şekil 3.8.	<i>Cyclamen</i> türlerinde uygulanan yüzey sterilizasyonu, A)Çeşme suyu altında bekletilen çiçek tomurcuğu eksplantları, B) Eksplantların %70'lik alkol ile muamele edilmesi, C) Eksplantların %20'lik NaOCl'de bekletilmesi.....	45
Şekil 3.9.	Anter kültürü denemelerinde anterlerin kültüre alınması, A) Aktif karbon uygulamaları, B) Gümüş nitrat uygulamaları	46
Şekil 3.10.	Ovül Kültürü Denemeleri, A)Ovaryum zarları çıkarılmış ovül eksplantları, B)Steril şırınga ile ovüllerin çıkarılması, C)Ovüllerin besi yerinde kültüre alınması, D)Ovüllerden embriyoların oluşması E)Embriyoların bitkiye dönüşümü, F) Bitkiciklerin elde edilmesi.....	50

- Şekil 3.11. Aday haploid bitkilerin aklimatizasyon aşamaları, A) Besi yerinden çıkarılmış bitkilerin çeşme suyu altında yıkanması, B) Bitkilerin %0.2'lik fungusite daldırılma aşaması, C) Bitkilerin saksılara alıştırılmadan önceki köklü yapısı, D) Bitkilerin torf ve perlit içeren saksılarda kültüre alınması 55
- Şekil 3. 12. Haploidizasyon aşamaları..... 56
- Şekil 3.13. Flow sitometri analizleri için örneklerin hazırlanışı, A)Doku kültüründe bulnana bitkilerden yaprak örneklerinin alınması, B) Filtre kağıtlarının petrole konulması, C-D) Yaprakların ıslatılmış filtre kağıtlarının üzerine konulması, E) Yaprakların üzerine kapatılan filtre kağıtlarının ıslatılması..... 58
- Şekil 3.14. Flow sitometri analizleri ve eksplantların hazırlanışı, A) Yaprak örneklerinin ve standartların 1:1 oranında petrilere konulması, B) Solüsyonların yaprak ve standart üzerine eklenerek jilet yardımı ile küçük parçalara ayrılması, C) Eksplantların filtrelerden geçirilerek büyük parçalardan ayrılması, D) DAPI boyasının eksplantları barındıran tüplere eklenmesi 59
- Şekil 3.15. Histolojik analizlerin farklı aşamaları, A) Mikrotomda kesit alınan parafin içerisinde bloklanmış örnekler, B) Kesit alınan örneklerin lam üzerine konulması, C) Lam üzerine yerleştirilmiş ve kesit alınmış örneklerin ısıtıcı üzerinde bekletilme aşaması..... 61
- Şekil 3.16. Histolojik analizlerin aşamaları, A) Mikrotom yardımı ile kesit alınması işlemi, B) 1:1 Oranında yumurta akı ve glisin karışımının lam üzerine sürülmesi, C) Çeker ocak içerisinde boyama aşamaları 62

- Şekil 4.1. *Cyclamen hederifolium* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Farklı tomurcuk boyları, 2. ve 3. tomurcuk boylarında tek çekirdekli evre (8.05 mm), B) Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin genel görünümü, C) Kutuplara çekilmiş haploidizasyon çalışması için uygun geç tek çekirdekli, D) Çift çekirdekli evre..... 65
- Şekil 4.2. *Cyclamen cilicum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Farklı tomurcuk boyları, ikinci sıradaki tomurcukta tek çekirdekli evrenin gözlenmesi (4.74 mm), B) Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin genel görünümü, C) Tek çekirdekli evrede hücre çekirdeğinin kutuplara çekilmesi, D) Çift çekirdekli evre..... 66
- Şekil 4.3. *C. persicum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Tek çekirdekli evrenin, üçüncü sıradaki tomurcuk boyunda gözlenmesi, B) Tek çekirdekli evrenin 6.98 mm boyundaki tomurcuklarda gözlenmesi, C) Birinci sıradaki tomurcuktan alınmış anterlerden elde edilen mikrosporlarda erken tek çekirdekli evrenin görüntüsü 68
- Şekil 4.4. *C. coum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A)Anter kültürü için belirlenen 5 -5.42 mm boyundaki tomurcuklar, B) Haploidizasyon için uygun olan tek çekirdekli evre, C) Geç çift çekirdekli evre 69
- Şekil 4.5. *C. pseudibericum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Mikrospor hücrelerinin mikroskop altında görünümü (10x), B) Erken tek çekirdekli evre, C) Haploidizasyon için uygun olan tek çekirdekli evre 70
- Şekil 4.6. Melody F1 ticari çeşidinde tek çekirdekli evre, A) Erken tek çekirdekli evre, B) 7.05 mm boyundaki tomurcuklardan alınmış anterlerin mikrospor hücrelerinde tek çekirdekli evre..... 72

- Şekil 4.7. Anter kültürü denemeleri, A) Çiçek tomurcuklarının meydana gelmesi ve farklı boylardaki çiçek tomurcukları, B) Tek çekirdekli evresi belirlenmiş olan mikrospor hücrelerini barındıran ve başlangıç materyali olarak kullanılan anter eksplantları, C) Anter kültüründe gümüş nitrat (AgNO_3), D) Anter kültüründe aktif karbon uygulamaları 74
- Şekil 4.8. *C. persicum* türünde birinci dönem anter kültürü, A) Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış çiçek tomurcuğu, B) AgNO_3 içeren besi yerinde kültüre alınan anter eksplantları, C) Birinci alt kültür sonrası anterlerin görüntüsü 75
- Şekil 4.9. *C. persicum* türünde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen yapılar, A) $5\mu\text{M}$ NAA içeren B5 besi yerinde anter duvarlını yırtan embriyoların çıkışı, B-C) $5\mu\text{M}$ NAA içeren B5 besi yerinde meydana gelen embriyolar, D) Anter duvarının kenarından çıkan kalp şeklinde embriyo, E) Farklı aşamalarındaki haploid embriyolar, F) Torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyolar 77
- Şekil 4.10. *C. persicum* türünde anter kültürü sonucu elde edilen yapılar, A) Anterlerin duvarlarını yırtarak çıkan haploid embriyolar, B) Torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyoların kotiledon oluşturmaya başlaması, C) Çimlendirme ortamında embriyoların yeşil renk alması ve bazı embriyoların kallusa dönüşümü, D-E) Haploid embriyolardan elde edilen bitkiler 81
- Şekil 4.11. Flow sitometri analizleri için örneklerin hazırlanması, A) Standart bitki (Arpa) ile *C. persicum* yaprak örnekleri 1'e 2 oranında alınması, B) Ekstrakte edilmiş ve DAPI solüsyonu ilave edilmiş örnekler 83

Şekil 4.12.	Flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen grafikler, birinci grafik diploid konrtol grubu olarak kullanılan <i>C. persicum</i> türünden elde edilen grafik, altta belirtilen haploid embriyolardan elde edilmiş grafik.....	87
Şekil 4.13.	<i>C. coum</i> türünde birinci dönem anter kültürü denemelerinde anter eksplantından meydana gelen kallus yapısı.....	89
Şekil 4.14.	Melody F1 ticari çeşidinde birinci dönem anter kültürü sonrası meydana gelen yapılar, A-B) Anter duvarlarında meydana gelen kalluslardan oluşmaya başlayan globular embriyolar, C-D) Globular embriyoların olgunlaşmaya başlaması ve meydana gelen kalp şeklinde embriyolar.....	91
Şekil 4.15.	Melody F1 ticari çeşitte ikincic dönem anter kültürü sonucu meydana gelen yapılar, A-B) Anter duvarlarının zarar görmesi sonucunda filamentlerin anter duvarlarına bağlandığı yerde meydana gelen sürgün benzeri yapılar	92
Şekil 4.16.	<i>C. hederifloium</i> türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucu 0.1µM NAA içeren B5 besi yerinde elde edilen yapılar, A) Kültüre alınan anter eksplantı, B-C) Anter eksplantında meydana gelen kök ve sürgün benzeri yapılar.....	94
Şekil 4.17.	<i>C. hederifloium</i> türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucu 0.1µM NAA içeren B5 besi yerinde elde edilen yapıların sürgün ve kök benzeri yapıların çoğalması	95
Şekil 4.18.	<i>C. cilicium</i> türünde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde kültüre alınan anter eksplantları, A) Anter eksplantlarının kültüre alındıktan bir hafta sonraki görüntüsü, B) Kültüre alınan anterlerde 8 hafta sonra meydana gelen kararma	96

- Şekil 4.19. *Cyclamen* türlerinde ovül kültürü aşamaları, A)Ovaryumdan çıkarılmış ovül eksplantları, B) Ovül eksplantlarından kallus oluşum başlangıcı, C) Embriyojenik kalluslardan embriyo benzeri yapıların oluşması, D) Farklı embriyo aşamaları E) Torpedo aşamasındaki embriyolar, F) Embriyolardan elde edilen bitkiler..... 97
- Şekil 4.20. *C. persicum* türünde birinc, dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar, A) Ovül eksplantlarından 4. Hafta sonunda Embriyojenik kallusların meydana gelmesi, B) Kalluslardan elde edilen globular ve torpedo aşamasındaki embriyolar, C) Kalluslardan sürgün benzeri yapılar oluşması, D) Torpedo aşamasındaki embriyolar, E) Hormonsuz MS besi yerinde embriyoların çimlenmesi, F) Çimlenen embriyolardan sürgün ve kök benzeri yapıların meydana gelmesi..... 99
- Şekil 4.21. *C. persicum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen bitkiler, A) Ovül eksplantlarından meydana gelen bitkilerin magenta kaplarında meydana getirdiği yumru ve bitkiler, B) Bitkilerin ayrılmış hali ve kök yapıları 100
- Şekil 4.22. *C. persicum* türünde aklimatizasyon aşamaları ,A) Bitkilerin hormonsuz MS besi yerinden çıkarılması, B) Bitkilerin köklerindeki agar artıklarını ayıkladıktan sonra saksılara alınması, C) Bitkilere can suyu verildikten sonraki durumu, D) Bitkilerin çiçek tomurcukları oluşturmaları 102
- Şekil 4.23. *C. persicum* türünde ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen diploid bitkilerden alınan örneklerin flow sitometri analizleri sonucu meydana getirdiği grafik 106

- Şekil 4.24. *C. persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar, A) Embriyojenik kallusların 4. Haftada meydana gelmesi, B) Embriyojenik kalluslardan 8. Hafta sonunda embriyojenik yapıların meydana gelmesi, C) Kalp aşamasındaki embriyolar, D-E) Torpedo aşamasındaki embriyoların çimlenmeye başlaması, F) Ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen bitkiler 109
- Şekil 4.25. *C. persicum* türünde elde edilen bitkiler, A-B) Hormonsuz MS besisi yerinde kültüre alınan embriyolardan elde edilen sağlıklı kök ve yumruları oluşmuş bitkiler, C-D) Aklimatizasyon öncesi aktif karbon içeren MS besisi bulunduran filtreli kaplarda kültüre alınan bitkiler..... 110
- Şekil 4.26. *C. persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü sonucunda elde edilen bitkicikler, A) Bitkilerin toprağa aktarılmadan önceki durumu, B) Bitkilerin aklimatizasyon işleminden sonra saksıdaki durumu..... 111
- Şekil 4.27. *C. coum* türünde ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen kallus yapıları, A) Ovül eksplantlarında 8 hafta sonunda elde edilen kallus yapıları, B) Kallusların yeşil renk alması..... 117
- Şekil 4.28. *C. pseudibericum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar A-B) *C. pseudibericum* ovül eksplantlarında meydana gelen kalluslar,..... 120
- Şekil 4.29. *C. pseudibericum* türünde ovül kültürü sonucu elde edilen yapılar A-B) Ovül kültürü sonucunda elde edilen kalluslar 122

- Şekil 4.30. Melody F1 ticari çeşidinde ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen yapılar, A) Ovül kültüründe 4.haftada elde edilen embriyojenik kalluslar, B) Embriyojenik kalluslardan elde edilen farklı gelişim evrelerindeki embriyolar, C) Embriyoların olgunlaşması ile oluşan kök ve sürgün benzeri yapılar, D) Ovül eksplantlarından elde edilen bitkicikler..... 126
- Şekil 4.31. Melody F1 ticari çeşitte aklimatizasyon aşamaları, A) Hormonsuz MS içeren filtreli kaplardan çıkarılan bitkiler, B) Bitkilerin ayrılması, C) Bitkilerin musluk suyu altında bekletilmesi, D) Bitkilerin %0.1'lik fungusite daldırılması, E) Fungusite daldırılan bitkilerin köklerinin suda yıkanması, F) Bitkilerin saksılara alınması, G) Saksılara aktarılan bitkilerin üzerine magenta kapatılarak serada kültüre almak için hazır hale getirilmesi..... 127
- Şekil 4.32. Melody F1 ticari çeşitte seraya aktarılan bitkilerin genel görünümü ve çiçeklenmesi..... 128
- Şekil 4.33. Melody F1 ticari çeşitte ikinci dönem ovül kültüründe elde edilen yapılar, A) Başlangıç materyali olarak kullanılan ovül eksplantları, B) Embriyojenik kallusların oluşmaya başlaması, C) Embriyojenik kalluslardan meydana gelen embriyolar D) Globular aşamadaki embriyolar, F) Torpedo aşamasındaki embriyoların kotiledon aşamasına geçmeye başlaması..... 131
- Şekil 4.34. Melody F1 ticari çeşitte elde edilen bitkiler, A) Hormonsuz MS besiyeri içeren filtreli kültür kaplarındaki bitkiler, B) Bitkilerde meydana gelen kök yapıları, C) Bitkilerin saksılara aktarılmadan önceki durumu, D) Dış ortama aktarılan bitki 132

- Şekil 4.35. Melody F1 ticari çeşitte dış ortama aktarılan bitkilerin gelişimi ve çiçek tomurcuklarının oluşumu, A) Saksılara aktarılan bitkilerin yapraklarının gelişimi, B) Çiçek tomurcuklarının meydana gelmesi, C) Antesis aşamasındaki çiçek tomurcukları D) Çiçeklerini açmış olan bitkiler 133
- Şekil 4.36. *C. hederifolium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar A-B) Ovül eksplantlarından meydana gelen kallus yapıları..... 136
- Şekil 4.37. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinde elde edilen sürgün benzeri yapılar, A) Ovül eksplantlarından elde edilmiş olan embriyo benzeri yapılardan meydana gelen sürgün benzeri yapılar, B) Sürgün ve kök benzeri yapılar 138
- Şekil 4.38. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonunda elde edilen yapılar, A) Embriyo benzeri yapıların meydana gelmesi, B) Torpedo aşamasındaki embriyo, C) Sürgün ve kök benzeri yapılar, D) Sürgüne oluşumu..... 140
- Şekil 4.39. *C. cilicium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinde elde edilen embriyolar, A-B-C-D) *C. cilicium* türünde elde edilen farklı gelişim aşamalarındaki embriyolar 142
- Şekil 4.40. *C. cilicium* türünde ikinci dönem ovül kültürü sonucu elde edilen yapılar, A) Ovül eksplantlarından elde edilen embriyojenik yapılar, B) Kallusların embriyoya dönüşmesi, C) *C. cilicium* türünde meydana gelen torpedo aşamasındaki embriyolar, D) Embriyolardan elde edilen sürgün benzeri yapıların siyahlaşarak canlılıklarını yitirmesi..... 145
- Şekil 4.41. *C. cilicium* türünde ovül kültürü denemelerinde meydana gelen globular embriyoların histolojik analiz sonucunda görünümü 150

Şekil 4.42. *C. cilicium* türünde ovül kültürü denemelerinde meydana gelen globular embriyoların histolojik analiz sonucunda görünümü 151



SİMGELER VE KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyaceticacid
2iP	: 6-(γ , γ –dimethylallylamino)purine
BA	: Benzyl Adenine
GA ₃	: Giberellic acid
g/l	: Gram/Litre
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
μ l	: Mikrolitre
Mg/l	: Miligram/Litre
ml	: Mililitre
MS	: Murashige & Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
HgCl ₂	: Civa Klorür
FeEDTA	: Demir Etilendiaminetetraasetik asit
mm	: Milimetre
%	: Yüzde
B5	: Gambourg besi ortamı
NN	: Nisch and Nisch Besi ortamı
μ M	: Mikromolar
NaOCl	: Sodyum Hipo Klorür
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
LS	: Linsmaier and Skoog Besi yeri
IAA	: İndol Asetik Asit
NH ₄ Cl	: Amonyum Klorür

NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
ABA	: Absisic Acid
TDZ	:Thidiazuron



1. GİRİŞ

Türkiye coğrafi konumu, farklı iklim kuşaklarına ev sahipliği yapması ve Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz olmak üzere üç farklı gen merkezinin kesiştiği yer olması nedeniyle zengin bir floraya sahiptir. Ülkemizin jeolojik farklılıkları, dağ kuşaklarının son derece engebeli olması, eğimin kısa mesafelerde sık sık değişmesinden kaynaklanan lokal iklim alanlarının meydana gelmesi, zengin su kaynaklarına sahip olması ve üç tarafının denizlerle çevrili olması, bitki çeşitliliğinin fazla olmasına olanak sağlamıştır (Dölarslan ve Gül, 2015; Güner ve ark., 2000). Ayrıca ülkemiz, florasındaki bitki çeşitliliğinin yüksek olmasının yanı sıra endemik türler açısından da oldukça zengindir. Türkiye'nin endemizm oranı yaklaşık %34 olup, bu oran birçok Avrupa ülkesinden (Yunanistan: %14.9; Fransa: %2.9; İspanya: %18.6 ve Polonya: %0.1) daha yüksektir (Dilaver, 2013). Ülkemizde yayılış gösteren 163 familyada bulunan 3.500'e yakın tür endemiktir. Bu familyalarda yaklaşık 12.000 adet takson bulunmakta (tür, alt tür, varyete vb.) ve bu taksonların 3.700'e yakını endemik olarak bilinmektedir. Türkiye'nin yüz ölçümü, dünya yüz ölçümünün %0.53'ünü kaplamaktadır. Ancak ülkemiz florasında bulunan bitki türleri dünyada tanımlanmış bitki türlerinin %3.6'sını kapsamaktadır. Bu oran ülkemiz florasının ne kadar zengin olduğunun önemli bir göstergesidir (Arslan ve ark., 2015). Dünyada 34 biyoçeşitlilik noktasında bulunan bitkilerin %50'sinin endemik olduğu düşünüldüğünde Türkiye'nin endemizm oranının da ne kadar yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır.

Türkiye florasında bulunan yaklaşık 12.000 türden 688 tanesi geofitler olarak bilinen soğanlı, rizomlu, yumru lu bitkilerdir ve ülkemiz florasında %6 oranında bir yer tutmaktadır (Özhatay ve Byfield, 2005). Ülkemizde yayılış gösteren geofitlerden 162 tanesi endemiktir. Fakat Türkiye'de bulunan geofit türleri, tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, kara yollarının yol genişletme, yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar ve ihraç ürünü olarak kullanılması nedeniyle tehdit altındadır (Koçak, 2012).

Geofitler *Spermatophyta* bölümünde, Magnoliophyta alt bölümünde yer alır. Liliopsida (Tek Çenekli) ve Magnoliapsida (Çift çenekli) sınıflarına ayrılmış olsalar da çoğunluğu tek çeneklidir (Kalyoncu Doğan, 2007). Geofitler toprak üstü organları gelişme mevsimini tamamladıktan sonra kuruyarak ölmekte ve yaz aylarını toprak altında depo organlarında bulundurdıkları depo maddeleri ile devam ettirmektedirler (Karagüzel ve ark., 2007). Bu bitkiler ilkbahar ve sonbaharda sıcaklığın normale dönmesi ve yağışların başlamasından sonra vejetasyon dönemine geçerler (Kalyoncu Doğan, 2007). Geofitlerin çoğu 23° kuzey ve 45° güney enlemleri arasında yayılış göstermektedir. Geofitler açısından en zengin ülke, 2000 tür ile Güney Afrika'dır ve bu ülkeyi Akdeniz iklimine sahip ülkeler ve Amerika, Avusturalya gibi ülkeler izlemektedir (Dallman, 1998).

Geofitlerin, süs bitkileri, tıbbi aromatik, endüstriyel bitkiler ve doğrudan besin olarak kullanılan bitkiler olarak çok farklı kullanım alanları vardır. Ülke ekonomisine doğrudan katkı sağlayan kullanımlarından en önemlisi ise süs bitkileri sektöründe iç mekan, dış mekan, kesme çiçek ve doğal soğanlı süs bitkileri olarak kullanılmalarıdır. Süs bitkileri olarak geofitler, doğal çiçek soğanları adı altında sınıflandırılmaktadır ve süs bitkileri sektöründe önemli bir yere sahiptir. Dünyada 1 milyon 750 bin 66 ha alan ve 68 milyar 780 milyon 500 bin € değerinde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır (Kazaz, 2016). Ülkemizde ise bu rakam 45.126 ha olarak hesaplanmıştır. Üretimi yapılan süs bitkilerinde ise doğal çiçek soğanları oranı %1.23 (48.579 da, 25.337.330 adet) olarak bilinmektedir. Türkiye'de türlere göre ihracat oranlarına bakıldığında siklamen türünün yaklaşık %9'luk oranla önemli bir tür olduğu gözlenmektedir (Kazaz ve ark., 2015).

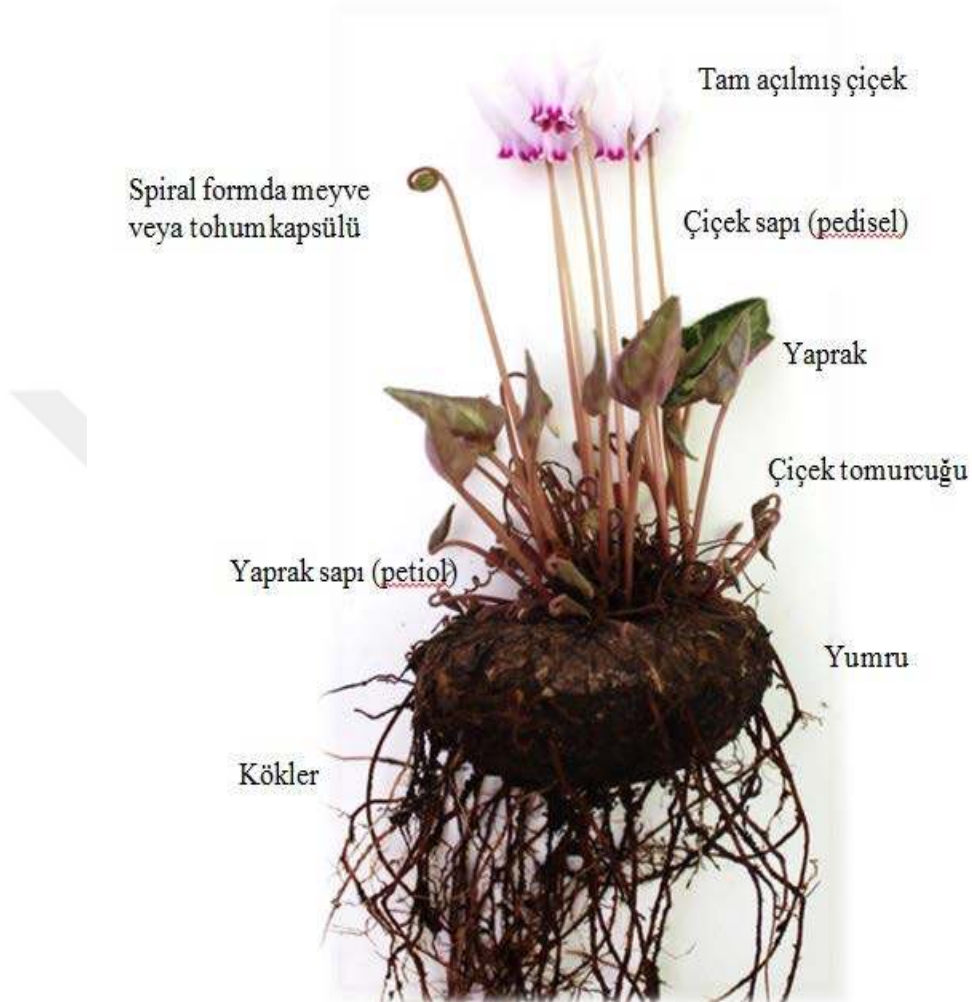
Cyclamen cinsi, *Myrsinaceae* familyasına aittir ve 21 adet tür içermektedir (Addam ve ark., 2017). Orijini Akdeniz havzası olan *Cyclamen* cinsi ülkemizde 12 takson ile yayılış göstermektedir ve bu taksonlardan 6 tanesi ülkemize endemiktir (İzgü ve ark., 2016).



Şekil 1.1. *Cyclamen persicum* türünün doğadaki yayılışı (Mendi ve Çürük, 2016)

Siklamen bitkisinin doğal yayılış gösterdiği iller Adana, Antalya, Amasya, Artvin, Aydın, Balıkesir, Bolu, Çanakkale, Giresun, İzmir, Kahramanmaraş, Muğla, Konya, Mersin, Osmaniye, Rize ve Trabzon olarak sıralanabilir. Ülkemizde yayılış gösteren siklamen türleri ilkbaharda ve sonbaharda çiçek açan türler olmak üzere iki farklı vejetasyon süresince toprak üstü varlığını devam ettirmektedir. *Cyclamen persicum* Miller., *Cyclamen pseudibericum* Hildebr., *Cyclamen coum* Miller., *Cyclamen alpinum* Dammann ex Spreng, *Cyclamen trochopteranthum* O. Schwarz, *Cyclamen parviflorum* Pobed. türleri ilkbaharda çiçek açarken; *C. hederifolium* Aiton., *C. graecum* Link., *C. cilicium* Boiss ve Heldr., *C. mirabile* Hildebr. sonbaharda çiçeklenmektedir (Gündoğan, 2003). Ülkemize endemik olan türler ise *C. parviflorum* Pobed, *C. pseudibericum* Hildebr., *C. cilicium* Boiss ve Heldr., *C. intaminatum* (Meikle) Grey-Wilson, *C. mirabile* Hildebr. türleri olarak bilinmektedir (Ekim ve ark., 1991).

Latince ‘*kuklos*’ veya ‘*cyclos*’ daire anlamına gelmektedir ve Siklamen adının çok eski çağlarda bu kelimelerden köken aldığı bilinmektedir. Bunun sebebi ise toprak altı organlarının yuvarlak, yapraklarının ve meyve saplarının ise daire şeklinde olmasıdır (Tanker ve Türköz, 1984; Çürük, 2013). Morfolojik ve fizyolojik olarak incelendiğinde, meyve saplarındaki bu dairesel yapının bitkinin kendini koruma mekanizması olduğu görülmektedir. Çiçek saplarının döllenmeden sonra spiral şeklinde kıvrılarak tohum kapsüllerini toprağa çektiği; böylece tohumlarını otlayan hayvanlardan, rüzgarın ve güneşin kurutucu etkilerinden uzaklaştırdığı belirtilmiştir (Mathew ve Özhatay, 2001). *Cyclamen* türlerinin toprak altı depo organları ve toprak altı gövdeleri çok yıllık otsudur. Yaprakların sapları uzun, yaprak şekilleri ise oval, dairemsi ve kalp şeklindedir. Yaprakların üzerinde gümüşü desenler bulunur. Yaprakların renkleri açık yeşilden koyu yeşile doğru farklılık gösterir. Ayrıca yaprakların kenarlarında farklı şekillerde dişlilik mevcuttur. Çiçek yapısı incelendiğinde, her çiçek sapında tek çiçek bulunur ve çiçekler genelde uzun çiçek saplarının uçlarından öne doğru eğiktir. Çiçek sapları, meyveler olgunlaşmaya başladığında, spiral şeklinde kıvrılır. Beş loblu çanak yaprakların iç kısmındaki kısa korolla yarım küre şeklinde tüplü eflatun, pembe veya beyaz renklidir. Petaller uçtan geriye kıvrık ve her bir petal merkezden dışa doğru hafif bir kıvrım oluşturmaktadır. Erkek organ 5 stamenlidir ve korolla’nın tabanındadır, filamentler çok kısa, anterler ise geniş olup koni oluşturmuşlardır. Üst durumlu ovaryum, ince bir stilusa sahiptir ve stilus uzun olduğu için anterlerden yüksekte bulunmaktadır (Davis, 1978; Çürük, 2013).



Şekil 1.2. *Cyclamen* bitkisinin morfolojik yapısı (Yalçın Mendi ve Çürük 2016)

Siklamen türleri farklı iklimlere adapte olmuş olsalar da sağlıklı ve kaliteli yetiştiricilik açısından optimum iklim istekleri olarak %60-80 nem oranı, gündüz 16 °C, gece ise 14 °C hava sıcaklığı isteği bulunmaktadır. Bazı türlerde 25°C'nin üzerinde kaba ve büyük yaprakların oluştuğu gözlenmiştir ve bu durumun çiçek oluşumunu olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir. Toprak istekleri incelendiğinde havadar ve kolay drenaja sahip toprak istemektedir. Siklamen türleri ışık isteği

bakımından fotoperyodizme duyarsız görünseler de, yüksek ışık yoğunluğunun çiçek tomurcuklarının sayısını artırdığı bilinmektedir. Ancak kaliteli ve sağlıklı bitkiler elde etmek için yetiştiricilik açısından sera içerisindeki ışık miktarının 30.000 lüks (500W/m^2)'ün üzerinde tutulmaması önerilmektedir. Dolayısıyla bitkilerin aşırı ışıktan etkilenmemesi ve güneş yanıklarından korunması için yazın %60 oranında gölgeleme yapılması tavsiye edilmektedir (Çürük, 2013). Sağlıklı kök gelişimi için ağır ve çok nemli topraklar gelişme bozukluklarına sebep olacak kök zararlarına neden olabilir.

Siklamen türleri, süs bitkisi özelliğinin yanı sıra kozmetikte ve tıbbi aromatik özellikleri ile de birçok ülkede alternatif tıp olarak adlandırılan halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklamen bitkisinin bu özelliğinde yumrularında barındırdığı kristalin, saponin, antosiyanin ve organik asitler gibi sekonder metabolitlerin önemli rolü vardır. Ayrıca yumruların bu özelliğinden kimya ve ilaç sanayinde yararlanılmaktadır (Yılancı, 2016; Gökçeoğlu ve Sukatar, 1985). *C.coum* var. *coum* türünün kısırlık tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (İzgu ve ark., 2016; Çalış ve ark., 1997; Foubert ve ark., 2008). Siklamen türlerinin barındırdığı saponinlerin, sitotoksik, spermisit, antimikrobiyal, ağrı kesici ve antienflamatuvar etkileri olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (İzgu ve ark., 2016, Altunkeyik ve ark., 2012; Çalış ve ark., 1997; Foubert ve ark., 2008). Ayrıca tarımsal zararlılarla biyolojik mücadelede de siklamenlerin yumrularından elde edilen suyun bütün zararlılarını yok etmek için kullanıldığı belirtilmiştir (Yılancı, 2016).

Siklamen bitkisi, doğal yaşam alanlarında tohum ile üremektedir. Siklamen cinsinde bir bitkideki çiçek sayısı ortalama olarak 20-30 arasında değişmekle birlikte, her çiçekten ortalama 20 ile 50 arasında tohum elde edilmektedir (Bossard, 1960). Süs bitkisi olarak ticari kullanıma sahip siklamen türleri de tohum ile çoğaltılmaktadır.

Klasik melezleme yöntemi ile teker teker el ile yapılan melezleme işlemi oldukça zahmetli ve uzun süreli olduğu için siklamen tohumları pahalıdır

(Wellensiek, 1959). Ayrıca siklamen bitkisinin döllenme biyolojisi ile ilgili olarak doğada yayılış gösteren genotiplerde kendine kısırlık ve kendileme depresyonu olduğu belirlenmiştir. Döllenme biyolojisindeki bu bozuklukların sebepleri üzerine yapılan araştırmalarda kendileme depresyonunun kendine döllen poligenik türlerde meydana gelen mutasyonlar olduğu ileri sürülmüştür (Affre ve Thompson, 1999; Lande ve Schemske, 1985). Siklamenin melezleme ıslahında, döllenme biyolojisindeki kendileme depresyonundan dolayı saf hatların elde edilmesi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde sorun yaşanmaktadır.

Ülkemizde süs bitkileri sektöründeki en önemli sorunlarından bir tanesi de üretim materyalindeki dışa bağımlılıktır. Bu problemin temelinde, süs bitkilerindeki yetersiz ıslah çalışmaları ve dolayısıyla sektöre kazandırılan bitki ve tür sayısının neredeyse yok denecek kadar az olması yatmaktadır. Ülkemizde süs bitkileri sektöründe kendi üretim materyalimizin olmayışı ve bu konuda dışa bağımlı olmamız nedeniyle her yıl yüksek miktarlarda ödenen ıslahçı hakkı (royalite), bu sektördeki en büyük gider olarak göze çarpmaktadır. Bu oran yüksek olduğu için süs bitkileri açısından ülkemizdeki süs bitkileri üreticilerinin dünya piyasasındaki rekabet gücü azalmaktadır. Bu sorun izinsiz çoğaltım gibi diğer önemli bir probleme de temel oluşturmaktadır. Süs bitkileri sektöründeki bu önemli sorunların önüne geçebilmek ve dünya piyasasındaki üreticiler ile rekabeti sağlayabilmek için sektörde talep görecektir kaliteli ve verimli yerli süs bitkilerinin üretilmesi gerekmektedir (Kazaz ve ark., 2015). Siklamen bitkisinin süs bitkileri sektöründeki en büyük sorunu ise sektördeki temel problemlerden biri olan üretimin daha pahalı olmasından dolayı doğadan sökülerek ihraç edilmesidir (Koyuncu ve Ekim, 1984). Ayrıca son zamanlarda ülkemizde siklamen ticareti belirli boydaki siklamen fidelerini ithal edip, bu fideleri çiçeklenme aşamasına getirip, daha sonra da ihraç edilmesi şeklinde yapılmaktadır.

Siklamen ıslahı da diğer süs bitkilerinde olduğu gibi genellikle klasik melezleme yöntemleri ile yapılmaktadır. Siklamen bitkisinde tohumdan çiçeğe kadar geçen süre türlere göre değişmekle birlikte, ortalama 150 günün üzerinde

olduğu bilinmektedir. Bu süre ıslah çalışmaları için saf hat elde etme açısından uzun bir süredir. Ayrıca siklamende görülen kendileme depresyonu, farklı ploidi seviyeleri, bazı genotipler arasında homojenite olmaması ve abortif embriyo oluşumuna neden olan kendine uyumsuzluk, yeni çeşitlerin klasik yöntemlerle geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Jalali ve ark., 2012; Schwenkel ve Winkelmann, 1998). Bu noktada bitki biyoteknolojisi önemli avantajlar sunmaktadır.

Bitki biyoteknolojisi temel olarak doku kültürü, moleküler teknikler - genetik mühendisliği olacak şekilde 2 kısımdan oluşmaktadır. Hücresel totipotensi kavramının 19. yüzyılda ortaya çıkması ile bitkilerin yüksek rejenerasyon kapasiteleri olduğu gözlenmiştir. Doku kültürü tekniklerinin ortaya çıkmasında da hücresel totipotensi ve rejenerasyon temel oluşturmaktadır (Hensaw ve ark., 1982). Doku kültürü bitki, hücre, doku, organ gibi bitki parçalarının asetik şartlarda, steril ortamda besi yerlerinde kültüre alınıp, yeni bitki, doku veya bitkisel ürünler elde etme olarak tanımlanmaktadır. Doku kültürü içerisinde amaca yönelik farklı teknikler bulunmaktadır ve ıslah çalışmalarında günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Babaoğlu ve ark., 2001). Bitki ıslahında kullanılan doku kültürü teknikleri, türler arası melezlemeler sonucu oluşan embriyoların kurtarılması, haploid bitki üretimi, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, somatik hücre melezlemesi ve gen transferi olarak sayılabilir. Belirtilen bu yöntemlerden günümüzde en sık kullanılan dihaploidizasyon yöntemidir. Klasik yöntemlerle yapılan ıslah çalışmalarında tek yıllık türlerde saf hatların elde edilmesi için yaklaşık 7 ile 9 jenerasyon kendileme yapılması gerekmektedir. Bu da ıslahçı için en az 7 ile 9 yıl anlamına gelmektedir (Borém ve Miranda, 2009). Çok yıllıklarda ise bu işlem daha uzun sürmektedir.

Ayrıca kendileme işlemi sonunda hiçbir zaman %100 homozigot elde edilememektedir. Bazı araştırmacılar F₄ ve F₅ bireylerde en fazla %96'lık bir homozigoti yakalamışlardır (Germana, 2011). Haploidizasyon yöntemi ile %100 homozigoti elde etmek için geçen sürenin 1-2 yıla kadar indiği göz önünde

bulundurulduğunda ıslah çalışmalarında kullanılan doku kültürü tekniklerinin ne derece önemli olduğu gözlenmektedir.

Siklamende yeni çeşitlerin geliştirilmesi için klasik yöntemlerin yanında biyoteknolojik yöntemler son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Diğer süs bitkilerinde olduğu gibi siklamende de yeni çeşit geliştirmek ve ıslah sürecini kısaltmak için kullanılan en önemli biyoteknolojik yöntemlerden bir tanesi haploidizasyon tekniğidir. Haploid bitkiler gametofitik kromozom sayısına sahip sporofitik bitkiler olarak tanımlanmaktadır (Germana, 2011). Bir başka tanımla haploid bitkiler somatik hücrelerinde ait oldukları o türün gamet hücrelerindeki kromozom sayısı kadar kromozom taşıyan bitkilerdir. Haploid bitkiler tek set kromozom taşırlar (Boren ve Fritsche-Neto, 2014). Bu özellikleri ile haploid bitkiler resesif mutasyonların açığa çıkarılmasında ve homozigot bitkilerin elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca haploidizasyon tekniği ile elde edilen bitkilerin kromozomlarının katlanması ile çok kısa süre içerisinde %100 saf hatlar elde edilebilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Klasik yöntemler kullanılarak saf hat elde etmek çok sayıda geriye melezleme gerektirmektedir ve haploidizasyon tekniği ile ulaşılan %100 homozigotiye ulaşma olasılığı yok denecek kadar azdır (Neuman ve ark., 2009).

Haploid bitkiler, güçsüz, bodur, diploid bireylere göre daha verimsiz, yaprakları küçük, boğum araları kısa, çiçeklenme süreleri daha uzun, abiyotik ve biyotik streslere karşı daha duyarlı, polenleri küçük ve anormal şekilli, plastidleri az, stomaları daha küçük ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar ve yüksek oranda steril bitkiler oldukları için tarımda doğrudan kullanılamazlar (Boren ve Fritsche-Neto, 2014; Arı, 2006). Fakat bunun yanı sıra ıslah çalışmalarında çok önemli avantajlar sağladıkları için önemli ıslah materyalleridirler. Haploid bitkilerin ıslahta kullanım avantajlarını aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür.

1. Kısa sürede %100 homozigoti sağlar.
2. Dioik türlerde ve özellikle siklamen gibi kendileme depresyonu nedeniyle homozigotiye ulaşılması zor olan türlerde bir jenerasyon sonunda bu gibi problemlerin ortadan kaldırılmasına olanak sağlar.
3. Gençlik kısırlığı uzun süren orman ve meyve ağaçları gibi kendileme mümkün olsa bile homozigotiye ulaşmanın zor olduğu odunsu türlerde ıslah sürecini kısaltır.
4. Elde edilen haploid bireyler çeşitli kimyasallarla katlanarak dihaploid hale getirilip, F1 hibrit ıslahında ana ve baba hatlar olarak kullanılabilirler.
5. Diploid bir bireyde dominant genler tarafından örtülen resesif genlerin mutlak homozigotiye sahip bireylerde kendini göstermelerini sağlar.
6. *In vitro* ortamlarda farklı biyotik ve abiyotik stres etkenlerine karşı seçim olanağı sağlar.
7. Somatik hibridizasyon işleminin diploid hücrelere oranla daha kolay yapılmasına olanak verir ve iki haploid protoplast birleşerek diploid hücreyi meydana getirir.
8. Döllenme biyolojilerinde problem olan bazı türlerde haploid uyartım ile yeni bireyler elde edilmesinde önemli rol oynar (*Asparagus officinalis* türünde erkek bireylerin elde edilmesi buna iyi bir örnektir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001)).

Haploid bitkilerin elde edilmesi için farklı teknikler kullanılmakla birlikte haploid bitki oluşumu doğada çok nadir de olsa kendiliğinden de görülebilmektedir (Murovec ve Borut, 2012). Haploid bitkiler aşağıda belirtilen süreçlerle elde edilebilmektedir.

1. Yumurta hücresinin döllenme olmadan zigota benzer bir şekilde bölünmeye başlaması olarak tanımlanan gynogenesis ile elde edilirler. Döllenme meydana geldikten sonra dişi hücresinin çekirdeğinin

kaybolması ile yalnızca erkek gametlerde bulunan genetik materyale sahip hücrelerin gelişmesi olayı androgenesis olarak tanımlanır ve bu şekilde haploid bitkiler oluşur. Bunun yanı sıra semigami, poliembriyoni ve kromozom eliminasyonu ile de doğada spontan haploid bitki oluşumları gözlenmektedir. Fakat semigami, poliembriyoni ve kromozom eliminasyonu ile haploid bitki elde etme frekansları oldukça düşüktür (Arı, 2006; Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Birçok araştırmacı *in vivo* haploidizasyon üzerine araştırma yapmışlardır fakat kesin bir sonuca ulaşamamak ile birlikte bu oluşumun mikrosporlardaki anormalliklerden kaynakladığını belirtmişlerdir (Boren ve Fritshe-Neto, 2014).

2. Maternal haploidlerin *in situ* uyartımı şeklinde tür içi tozlanma ile (mısır), tür içi tozlanma şeklinde yapılabilen ışınlanmış polen tekniği ile, yabancı akrabaların polenleri veya birbiri ile akrabalıkları bulunmayan türlerin polenleri ile türler arası ve hatta cinsler arası tozlanarak, kimyasal uygulamalar ve sıcaklık şokları ile haploid bitkiler elde edilmektedir. Işınlanmış polen tekniğinde emaskülasyon ve embriyo kurtarma aşamaları önemli noktaları oluşturmaktadır (Murovec ve Borut, 2012).
3. *In vitro* uyartım ile haploid bitkilerin elde edilmesi ise dişi ve erkek organların *in vitro* şartlarda kültüre alınması olarak bilinmektedir. Doğada kendiliğinden meydana gelen haploid bitkilerin ıslah programlarına entegre edilmesi zor olduğu için ve ayrıca bu yöntem kontrollü şartlarda yapılmasından dolayı ıslah için çok büyük önem taşımaktadır.

In vitro şartlarda olgunlaşmamış erkek gamet hücrelerinin kültüre alınması ile yapılan haploidizasyon çalışmaları androgenesis olarak tanımlanır. Anter kültürü uygulama açısından teknik olarak basit bir metot olup, başarı şansı eksplantların alındığı bitkisel materyalin kültür koşullarına, besi yeri bileşenlerine, yüzey sterilizasyonuna, tomurcukların doğru zamanda kültüre alınmasına (geç tek çekirdekli evre ve erken çift çekirdekli evre), tomurcuklara uygulanan ön

uygulamalara, *in vitro* aşamadaki kültür koşullarına ve kültüre alınan bitkinin genetik yatkınlığına bağlıdır. Haploidizasyon çalışmalarında en etkili ve en çok kullanılan yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde anterler doğrudan kültüre alındığı gibi mikrosporların izolasyonundan sonra kültüre alınması şeklinde de yapılmaktadır (Murovec ve Borut, 2012). Bu yöntemde temel prensip normal şartlarda iki çekirdekli yapıya sahip olan polen tanesini tek çekirdekli evrede yakalayıp, bu gelişimi somatik yönde ilerlemesini sağlayıp haploid bitkiler elde etmektir.

Gynogenesis ise döllenmemiş dişi gamet hücrelerinin *in vitro*'da kültüre alınması ile meydana gelen haploid bitki uyartımıdır. Genelde ovül kültürü olarak yapılan gynogenesis çalışmalarında başarı şansı türlere göre değişmektedir. Bazı türlerde ise ovaryum kültürü daha etkili sonuç vermektedir. Ovül ve ovaryum kültüründe başarı şansını etkileyen en büyük faktör ise bitkisel materyalin alındığı tomurcuğun boyutudur. Boyutun doğru tespit edilmesi için anter kültüründe olduğu gibi mikrosporların tek çekirdekli olduğu evre baz alınır (Arı, 2006; Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Dihaploidizasyon yönteminin en önemli aşaması olarak bilinen kısım kromozomların katlanma aşamasıdır. Kromozomların katlanması ile %100 homozigot hatlar elde edilir. Bazı türlerde kromozomlar kendiliğinden katlanırlar fakat çoğu türde kromozomların katlanmasında farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Spontan katlanan türlerdeki mekanizmanın nedeni nükleer füzyon olarak bilinmektedir. Ploidi ıslahında kromozom setlerinin sayılarının katlanmasında en çok kullanılan kimyasallar azot peroksit, kafein, chloral hydrate, sülfanilide, hexachlorocyclohexan, acenaphtene, etil merkürü klorid, hegzoklorosikloheksan, kolhisin ve orizalin'dir. Belirtilen bu kimyasallardan en sık kullanılanı ise kolhisindir (Bilir Ekbiç, 2010).

Kolhisin etkileşime geçtiği hücrelerin mitoz bölünme aşamasında metafaz safhasında meydana gelen iğ ipliklerinin oluşmasını engeller ve replikasyona

uğramış kromozomların sayısını ikiye katlar, böylelikle dihaploid hatlar elde edilmiş olur (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid terimi ile ilgili ilk bulgular 1920 yılında yayınlanmıştır. Angiospermilerde ise haploid bitkiler ile ilgili ilk çalışma, pamuk bitkisinde olduğu belirtilmiştir (Dunwell, 2010). Bu çalışmaları sırasıyla *Datura stramonium* (Boru çiçeği) (Blakelsee ve ark., 1922), *Nicotiana tabacum* (Tütün) (Gaines ve Aase, 1926) ve *Triticum compactum humboldtii* (Buğday) (Clausen ve Mann, 1924) izlemişlerdir.

Günümüzde haploidizasyon tekniği kullanılarak yapılan ıslah çalışmaları oldukça fazladır. Fakat siklamen türlerinde yapılan haploidizasyon çalışmaları oldukça sınırlı kalmıştır. Dünyada gün geçtikçe önem kazanan bir süs bitkisi olan siklamenlerde ıslah çalışmaları klasik yöntemlere dayalı olarak yapılmaktadır. Bir siklamen cenneti olan ülkemiz, bu türlerden yeni çeşit geliştirmek için ıslahçılara tür bazında çok büyük olanak sağlamaktadır. Ülkemizin süs bitkilerindeki en büyük problemlerden biri olan ıslah materyalindeki dışa bağımlılığın ortadan kaldırılması için ülkemizin bize sunduğu bu eşsiz zenginlikten yararlanmak gerekmektedir. Siklamen türlerinde kendi çeşitlerimizin geliştirilmesi ve siklamen ıslahında en büyük engellerden biri olan döllenme biyolojisindeki bozuklukların önüne geçilmesi için biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması neredeyse zorunlu hale gelmektedir. Siklamen türlerinde saf hatların geliştirilmesinde ıslah sürecinin kısaltılması ve %100 homozigot bireylerin elde edilmesi amacıyla dihaploidizasyon yöntemi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal yayılış gösteren türler (*C. pseudibericum*, *C. cilicium*, *C. coum*, *C. persicum*, *C. hederifolium*) ile renk ve çiçek özelliklerine göre belirlenen Melody (9246-red) F1 hibrit çeşidinde dihaploidizasyon çalışmaları yapılarak saf hatlar elde edilmesi ve ileride yeni siklamen çeşitlerinin geliştirilmesine olanak sağlamak amacıyla haploid bireylerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Haploidizasyon çalışmasında kullanılan türlerden ikisinin endemik (*C. pseudibericum* ve *C. cilicium*), diğer üç türün ülkemizde doğal yayılış

gösteriyor olması ve ayrıca bu doğal türlere ek olarak ticari bir çeşidin de çalışmada yer alması çalışmaya ayrı bir değer kazandırmaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan doğal siklamen türlerinde ve ticari çeşitte, anter ve ovül kültürü denemeleri kurulmuştur. Denemelerde farklı hormon çeşitleri ve kombinasyonları, soğuk uygulaması, aktif karbon ve gümüş nitrat konsantrasyonları denenmiş ve haploid embriyolar ve diploid bitkiler elde edilmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Cyclamen* Türlerinde Ovül Kültürü Çalışmaları

Ishizaka ve Uematsu (1993) türler arası hibrit (*C. persicum* ve *C. hederifolium*, *C. neapolitanum*) elde etmek için ovül kültürü yöntemini kullanmışlardır. *C. persicum* ($2n=2x=48$, $4x=96$)'un diploid ve tetraploid çeşitleri ana bitki olarak, doğal *C. hederifolium* veya *C. hederifolium* var. *album* ($2n=34$) türü baba hat olarak kullanılmıştır. Tozlamadan sonra melezlenen ovaryumlar, düzenli olarak toplanmış ve ovüller histolojik olarak incelenmiştir. Daha sonra ovüller, ovaryum ile birlikte değişik kültür ortamlarına aktarılmıştır. Histolojik gözlemler ile diploid *C. persicum* ($2n=2x=48$)'un ve *C. hederifolium* var. *album* melezlerinin ovüllerinin tozlamadan 28 gün sonra, tetraploid *C. persicum* ($2n=4x=96$)'un ve *C. hederifolium* melezlerinin ovüllerinin ise tozlamadan 21 gün sonra kültür ortamına aktarılmasının uygun olduğunu belirtmişlerdir. Diploid *C. persicum* ($2n=2x=48$)'un ve *C. hederifolium* var. *album* melezlerinden elde edilen ovüllerin kültüre alınması sonucu en etkili besi yeri %3 sukroz içeren MS ortamı, tetraploid *C. persicum* ($2n=4x=96$)'un ve *C. hederifolium* kombinasyonundaki ovüllerin kültüre alınmasında ise %3 sukroz +%10 hindistan cevizi sütü içeren MS ortamının uygun olduğunu saptmışlardır. Her iki türlerarası hibrit, ovül kültürü ile elde edilmiştir.

Ishizaka (1996) yapmış olduğu çalışmada hastalığa dayanıklılık için türler arası melezleme yapmış ve abortif embriyolar ovül kültürü yöntemi ile kurtarılmıştır. Diploid ve tetraploid *C. persicum* ana bitki olarak, *C. greacum* ise baba olarak kullanılmıştır.

Tozlanmadan sonra periyodik olarak toplanmıştır. Histolojik analizlere göre tozlanmadan sonra ovüller, 35 gün sonra besi yerlerine aktarılmıştır. Ovüller karanlıkta 25°C'de besi yerlerinde kültüre alınmışlardır. Ovüller, %3 sukroz, %10 hindistan cevizi sütü içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Kendileme yapılan bireylerde elde edilen hibritler canlı tohum oluşturamamıştır. CPT ve CG den elde

edilen kendine döllenme ile elde edilen tohumlar cansız ve yüksek polen kısırlığı göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen türlerin *Fusariuma* ve *Pseudomonasa* dayanıklı bireyler olduğu belirlenmiştir.

Ishizaka ve Uematsu (1995) çiçeklerin kokusu üzerine yaptıkları türler arası melezlemelerde, *C. purpurascens* ve *C. persicum* türlerini kullanmışlar ve abortif embriyoları kurtarma amaçlı ovül kültürü yapmışlardır. Diploid *C. persicum* ve tetraploid *C. persicum* ana bitki olarak, *C. purpurascens* ise baba bitki olarak kullanılmıştır. Tozlamadan sonra melezlenmiş ovaryumlar düzenli olarak toplanmış ve parafin bloklarda saklanmıştır. Histolojik analizler sonucunda ovüllerin 35 gün sonra besi yerlerine alınması öngörülmüştür. Daha sonra ovüller, % 3 sukroz içeren MS besi yerinde 25°C'de karanlıkta kültüre alınmıştır. Hibridlerde tohum canlılıkları gözlenmemiştir.

Winkelmann ve Serek (2005), çalışmalarında farklı ıslahçılara ait farklı çiçek rengi ve farklı büyüme tiplerine sahip *C. persicum* türüne ait çeşitlerin somatik embriyogenesis oluşturabilme yeteneklerini test etmişlerdir. Her çeşitten 5 adet bitki ve her bitkiden de 100 ovül alınarak deneme kurulmuştur. Kallus oluşturma kültüründe hormon olarak 9.05 µM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyaceticacid) ve 3.94 µM 2iP (6-(γ,γ-dimethylallylaminopurine) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 32 çeşitten sadece birinde somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Rejenerasyon oranı çeşitlere göre %0 ile %65 arasında değişiklik göstermiştir. Midi tip *C. persicum* çeşitleri, mini ve giganteum tip çeşitlerine göre daha düşük oranda rejenerasyon gösterirken, alev renkli çiçeklere sahip çeşitler, yüksek oranda rejenerasyon göstermişlerdir.

Cyclamen persicum'un embriyojenik süspansiyon kültürlerinden yararlanılarak kriyoprezervasyon protokolü oluşturulmuştur. Kriyoprezervasyon aşamasında hücre gelişimi üzerine farklı kriyoprotektanlar ve uygulama zamanları denenmiştir (**Fari ve ark. 2006**).

Takamura ve ark. (2006) *Cyclamen persicum* Mill. türünde yapmış oldukları çalışmada farklı azot kaynaklarının somatik embriyogenesis üzerine

etkisini araştırmışlar ve vitamin varlığında azotsuz ortamlarda hiçbir gelişmenin gerçekleşmediğini gözlemlemişlerdir. Somatik embriyoların gelişimi için en etkili besi yerinin 20 mM KNO₃ veya 2 mM NH₄Cl + 18 mM KNO₃ içeren besi yeri olduklarını gözlemişlerdir. Ayrıca bu denemede gelrite miktarının somatik embriyo üzerine etkilerini incelemişlerdir. Gelrite miktarının %1 olduğu besi yerinde yaprak ve kök gelişiminin etkili olduğu gözlenmiştir. Gelrite miktarının %1 ve %2 olduğu besi yerinde hiperhidrat bitki oluşumu gözlenmemişken, gelrite miktarının %0.25 olduğu besi yerinde hiper hidrat bitkilerin varlığı dikkat çekmiştir.

Winkelmann ve ark. (2006), *Cyclamen persicum* Mill.'in embriyojenik süspansiyon kültürlerinden yararlanarak rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Protoplastları embriyojenik süspansiyon kültürlerinden enzimatik öğütme ile elde etmişlerdir. Ovül eksplantları kullanılarak, 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyaceticacid) ve 0.8 mg/l 2iP (6-(γ,γ -dimethylallylamino) pürine) içeren 1/2 MS besi ortamından embriyojenik kallusları elde etmişlerdir. Çalışılan 11 genotipin 9 tanesinde somatik embriyogenesis başarılı sonuçlar vermiştir.

Savona ve ark. (2007), çalışmada, *Cyclamen persicum* Mill cv. 'Halios'a ait olgunlaşmamış ve farklı gelişme dönemlerinde almış olduğu ovülleri kullanarak somatik embriyoları elde etmişlerdir. Besiyeri ortamı olarak **Schwenkel and Winkelmann (1998)**'ın bildirdiği ortam kullanılmıştır. Elde edilen kalluslarda farklı renk, kompaklık ve farklı somatik embriyo oluşturma potansiyelleri saptanmıştır. Embriyojenik genotiplerin tümü olgunlaşma, çimlenme ve tamamen bitkiye dönüşme potansiyeli göstermiştir. Elde edilen bitkilerin homojenitesini tespit etmek için, bitki ağırlığı, yaprak uzunluğu, çiçek genişliği ve petal sayısı gibi morfolojik özellikleri ölçülmüştür. Morfolojik incelemeler, elde edilen bitkilerde yüksek düzeyde homojenite olduğunu göstermiştir.

Winkelmann (2010), *C. persicum*'da somatik embriyo aracılığı ile klonal çoğaltımı hedeflemiştir. Çalışmada eksplant kaynağı olarak ovul kullanmış, kallus oluşturma ortamına ise 2 mg/l 2,4-D ve 0.8 mg/l 2iP eklemiştir. Somatik

emriyogenesis ile elde edilen bitkilerin düşük bir oranının somaklonal varyasyon gösterdiğini belirtmiştir.

Prange ve ark. (2010) üç farklı yabancı *Cyclamen* türünde (*Cyclamen graecum* Link, *Cyclamen mirabile* Hildebrand, *Cyclamen trochopteranthum* Schwarz) embriyojenik kallus kültürü kurmuşlar ve somatik embriyogenesis aracılığı ile rejenerasyon protokolünü geliştirmişlerdir. Embriyojenik kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi genotiplere bağlı olarak değişmiştir. *C. mirabile* türünde 0.5 g embriyojenik kallustan 1461 somatik embriyo elde edilmiştir.

Koçak ve ark. (2014) 15 farklı *C. persicum* genotipinden alınan farklı eksplant tiplerini (ovül, ovaryum, yaprak, yaprak sapı) 2,4-D ve 2iP büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır. Kallus gelişiminin en iyi olduğu eksplantların petioller olduğunu fakat en çok embriyo oluşumunun ovaryum eksplantlarında meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ovül eksplantlarında ise embriyo gelişim oranını %2.83 olarak belirtmişlerdir.

İzgü ve ark. (2016) Türkiye’de yetişen dört farklı *Cyclamen* türlerinde (*C. mirabile*, *C. parviflorum*, *C. coum*, *C. pseudibericum*) somatik embriyogenesis üzerine yapmış oldukları çalışmada ovaryum, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını kullanmışlardır. Eksplantları 2,4-D ve 2iP’nin 13 farklı kombinasyonunu içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır. Kallus oluşumu için en etkili eksplant tipi *C. cilicium* ve *C. parviflorum* için yaprak, *C. mirabile* ve *C. pseudibericum* için ise yaprak sapı olduğunu belirtmişlerdir. *C. pseudibericum* türünde embriyo benzeri yapıların en iyi görüldüğü eksplant tipi ovaryum olarak saptanmıştır. Embriyo benzeri yapıların oluşum yüzdeleri sırasıyla *C. mirabile* için %38, *C. cilicium* için %31, *C. pseudibericum* için %16 ve *C. parviflorum* için %15 olarak belirtmişlerdir.

2.2. *Cyclamen* Türlerinde Anter Kültürü Çalışmaları

Pirrie, (1985) yaptığı çalışmada, *C. persicum*, *N. tabacum* ve *N. glutinosa*'da anter kültürü ile haploid bitkiler elde etmeye çalışmıştır. *C. persicum*'da farklı sürelerde (0, 4, 8, 12 gün) ön soğuk uygulamalarının (4-6.5 °C) etkisini araştırmışlardır. Anter kültürü için tek çekirdekli aşamanın, çiçek tomurcuklarının 6-12 mm boyunda oldukları zaman olduğunu belirlemiştir. Anterlerden kallus ve embriyo yapıları oluşmadığını bildirmiştir.

Ishizaka ve Uematsu (1993) diploid *C. persicum* ($2n=2x=96$) ve tetraploid *C. persicum* ($2n=4x=96$) bitkilerinin anterlerini, 0.002 ve 0.2 mg/l NAA içeren ve %6 sükroz ve % 12 sükroz içeren N6, B5, ve MS besi yerlerinde kültüre almışlardır. Karanlık ortamda N6 ve B5 ortamında embriyo oluşumu için optimum sükroz konsantrasyonunu %9 olarak belirtmişlerdir. Embriyo oluşumunun yüksek sıcaklıkta inhibe edildiği gözlemlenmişken, + 5°C'de 2 gün bekletilen anterlerin gelişimlerinin teşvik edildiği saptanmıştır. Embriyoidler bitkiciklere dönüştürülmek üzere %3 sükroz içeren B5 besi yerine aktarılmıştır. Anter kültürü boyunca polenlerin gelişimleri sitolojik olarak incelenmiş ve çok hücreli görünümün farklı aşamaları belirlenmiştir.

Ishizaka (1998) *C. persicum* ($2n=2x=48$) ile *C. purpurascens* ($2n=2x=34$)'in melezlenmesiyle elde edilen F1 hibrit ($2n=41$) bitkilerin anterleri, haploid bitki üretimi için kültüre alınmıştır. Polen gelişiminin erken tek çekirdekli aşamasındaki mikrosporları içeren anterler, 90 g/l şeker ve 0.1, 1 mg/l NAA veya 0.1 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamında 5 °C'de 4 gün, daha sonra 25 °C'de 60 gün karanlık koşullarda kültüre alınarak embriyolar üretilmiştir. Embriyolar genellikle 30 g/l şeker içeren B5 ortamında 25 °C sıcaklık ve karanlık koşullarda bitkicik oluşturmuşlardır. Araştırma sonucunda steril bitkilerin, F1 hibritin indirgenmemiş mikrospordan kaynaklanan polihaploidler ve fertil bitkilerin de indirgenmemiş mikrospor kromozomlarının kültürü sırasında kendiliğinden katlanması ile gelişen amfidiploidler olduğu saptanmıştır.

Siklamen kış mevsimi için, ticari olarak tohumla çoğaltılan önemli bir süs bitkisidir. Hibrit tohumla üretim pahalı ve kendine döllenme, kendileme depresyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle siklamen için kitle üretiminde doku kültürü tekniklerinden yararlanma oldukça önemlidir. *C. persicum*'un sahip olmadığı birçok özelliklere sahip olan yabancı siklamen türleri giderek daha fazla kullanılmaktadır. Siklamenlerin melezlenmesi ile daha çekici (göz alıcı), olumsuz çevre koşulları ve hastalıklara karşı daha dirençli olan yeni çeşitlerin elde edilmesine olanak sağlanmaktadır. Çok miktarda triterpen saponinlerini içeren siklamen yumruları geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca parfüm endüstrisinde (İran'da) değerlendirilen farnesol gibi sesquiterpen alkollerini de içermektedir. Doku kültürü, siklamene özgü sekonder metabolitlerin kitle üretimine imkan sağlamaktadır.

Siklamen, kesme çiçek, dış mekan bitkisi ve saksı bitkisi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle farklı iklim koşullarına uyabilen, görsel güzelliğe sahip, toprak koşullarına uygun ve vazo ömrü uzun yeni çeşitlerin geliştirilip üretilmesi ıslah programının amaçları arasındadır. Bu konudaki çalışmalar henüz istenilen seviyede değildir. Haploidizasyon, yeni siklamen hatlarının üretimini sağlayan etkili ve ıslah sürecini kısaltan bir yöntemdir (**Jalali ve ark. 2012**).

Cyclamen persicum Mill'de zigotik embriyo, ovaryum, anter, yaprak sapı ve çiçek sapı kullanılarak somatik embriyo elde edilmeye çalışılmıştır (**Kiviharju ve ark. 1992**). Çalışmada ortama eklenen 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyaceticacid) (1.0-1.5 mg/l) ve hindistan cevizi sütünün embriyogenesinin başlangıç aşamasında önemli olduğu saptanmıştır. Çalışılan eksplantlardan ovaryum ve anter kültürlerinde somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca karanlıkta yapılan kültürün aydınlıkta yapılan kültürden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bitkilerin küçük bir kısmı dışında ana bitki ile aynı fenotipik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Takamura ve ark. (2011), *C. persicum* Miller ile yapmış oldukları çalışmada farklı karbon kaynaklarının anter kültürü üzerine etkilerini

araştırmışlardır. F1 anterleri, sükroz, glukoz, maltoz ve fruktoz içeren MS besisi yerinde kültüre alınmışlardır. Diğer 5 doğal tür ve F1 çeşit de, sükroz ve maltoz içeren besisi yerlerinde kültüre alınmıştır. Sükroz ve diğer karbon kaynaklarında gelişim gözlenmezken, en fazla embriyo maltoz içeren besisi yerinde gözlenmiştir. En etkili maltoz konsantrasyonu 394.4 mM olarak belirlenmiştir. Androgenesis için en etkili karbon kaynağının maltoz olduğu saptanmıştır.

Prange ve ark. (2012), *C. persicum* ($2n = 2x = 48$) ve *C. coum* ($2n = 2x = 30$) protoplastlarında polietilen glikol yöntemi ile ilk somatik hibrit oluşumunu sağlamışlardır. Çift floresan boya ile birlikte fluorescein diacetate ve scopoletin, heterojen birleşmeyi ortaya çıkarmıştır. Sitometri analizleri ile varsayılan 6 somatik hibrit tanımlanmıştır.

Günümüzde 250'den fazla bitki türünde haploidizasyon çalışmaları yapıldığı bilinmekteyse de yayınlanan çalışmalar çok sınırlı kalmıştır (Maluszynski ve ark., 2003).

2.3. Süs Bitkilerinde Yapılmış Haploidizasyon Çalışmaları

2.3.1. Süs bitkilerinde Androgenesis Yöntemi Kullanılarak Yapılmış Haploidizasyon Çalışmaları

Guha ve Maheswari (1964) *Datura innoxia* türünün anterlerini kültüre almışlardır. Anterlerden embriyo benzeri yapılar meydana geldiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu buluşları ile anter kültüründe önemli bir yol açmışlardır.

Kuo-Chang (1982), *Lilium davidii* türünde geç tek çekirdekli evrede bulunan anterleri filamentleri ile birlikte 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l Kin veya 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA içeren MS besisi yerinde kültüre almıştır. Anterler 25-27°C'de 800-1200 lüks aydınlıkta kültüre alınmıştır. Anterlerden 30 gün sonunda kallus ve embriyolar elde edilmiştir. Embriyo ve kallus oluşturma frekansı %8.9 bulunmuş ve eksplantlar farklılaşma ortamına aktarıldıktan 70 gün sonra bitkiye dönmüşlerdir. Haploid, diploid ve aneuploid olacak şekilde farklı ploidi

seviyelerinde bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkilerin %86'sının haploid olduklarını belirtmiştir.

Arzate Fernandez ve ark. (1997), *Lilium longiflorum* türünde besi yeri, soğuk uygulaması, ışık ve santrifüj gibi farklı etmenlerin anter kültürü üzerine etkilerini incelemişlerdir. Anter kültürüne en iyi yanıt veren besi yerinin N6 olduğunu, kallus oluşumlarının aydınlık ortamda meydana geldiğini ve karanlıkta engellendiğini, belirtmişlerdir. Kültüre alınan anterlerin, 30 ile 46mm arasında tomurcuk boylarına sahip çiçek tomurcuklarından alındığını ve toplamda 132 adet bitki elde edildiğini belirtmişlerdir. Haploid ve diploid hücrelerin aynı kök uçlarında bulundukları ve bu türde kromozomların kendiliğinden katlandığını belirtmişlerdir.

Han ve ark. (1997) Asya hibrit lilyum çeşidi olan 'Connecticut King' çeşidinin anterlerinden haploid bitki elde etmek için sistem geliştirmişlerdir. Tek çekirdekli evre içeren miktospor hücrelerine sahip anterler, farklı büyüme düzenleyicilerini içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Üç veya dört vejetatif çekirdek benzeri yapıları bulunduran mikrosporlardan 2-3 hafta sonunda sarımsı nodüler kalluslar elde etmişlerdir. Nodüler kallus oluşturma açısından pikloramın, 2,4-D'den daha verimli olduğunu belirtmişlerdir. Serada kültür şartlarında yetiştirilen bitkilerinden alınan anterlerin arazide yetişen bitkilere göre daha fazla miktarda pikloram ve sitokinine ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir. En yüksek kallus oluşturma frekansının %17.6 ile 2 mg/l pikloram + 2 mg/l zeatin içeren MS besi yerinde meydana geldiğini yayınlamışlardır. Nodüler kallusların 0.1 mg/l pikloram+ 0.01 mg/l BA içeren MS ortamına aktarıldıklarında mikro yumrular oluşturdıklarını saptamışlardır. Mikro yumrular 0.1 mg/l MS besi yerinde kültüre alındıklarında bitkilere dönüşmüş elde edilen bitkilerin 5 tanesi haploid, iki tanesi diploid ve 4 adeti mixhaploid olarak belirlenmiştir.

Han ve Niimi (2004) *Lilium formosanum* bitkisinde yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında tek çekirdekli evredeki anter eksplantlarını pikloram ve zaeatin içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır. Anterleri picloram içeren MS

besi yerinde 2-3 ay gibi uzun süreli alt kültüre almışlar ve 5 adet haploid kallus hattı elde etmişlerdir. Elde ettikleri haploid bitkilerin zayıf ve üreme yeteneği olmayan polen ürettiklerini gözlemlemişlerdir. Kolhisin uygulamaları sonucunda elde ettikleri haploid bitkileri katlamışlar fakat polenlerin hala üreme yeteneğinde olmadığını belirtmişlerdir. Flow sitometri analizleri ile kallusların ploidi seviyeleri belirlenmiş kalluslar 4 yıl boyunca sürdürülmüş, 2 kallus hattının haploid, 2 kallus hattının diploid ve 1 kallus hattının ise mixhaploid olduğu belirlenmiştir.

Arı (2006) *Anemone coronaria* var. *coccinea* türünde yapmış olduğu anter kültürü denemeleri ile haploid bitki elde etmeye çalışmıştır. NN ve B5 besi yerlerinin aktif karbon, gümüş nitrat, L-glutamin kombinasyonlarını kullanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak IAA'nın tek başına 0, 0.1, 0.5, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonlarını ve bunun 0.1 mg/l BA ile kombinasyonlarını denemiştir. En yüksek embriyo oluşumunun %12.7 ile 1 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP içeren NN besi yerinde meydana geldiğini belirtmiştir. Gümüş nitrat denemelerinde en etkili embriyo oluşumlarının 5 mg/l gümüş nitrat + 0.5 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP içeren NN besi yerinde meydana geldiğini saptamıştır. Aktif karbon uygulamalarının ise androgenesis çalışmalarında olumsuz etkisi olduğunu belirtmiştir.

Winarto ve ark. (2010), Anthurium bitkisinde yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında rejenere olan bitkilerde morfolojik ve gelişim açısından farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Morfolojik olarak farklılık gösteren rejenere olan yapıların ploidi seviyelerinde de farklılıklar olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada anter kültürü sonucunda haploid, diploid, triploid olmak üzere farklı ploidi seviyeleri olduğunu gözlemlemişlerdir.

Winarto ve ark. (2011), Anthurium türünde yarım anter kullanılarak yapılan anter kültüründe önemli başarı elde etmişlerdir. Anter eksplantları 0.01 mg/l NAA + 0.5 mg/l TDZ + 1 mg/l BA veya 0.02 mg/l NAA + 1.5 mg/l TDZ + 0.75 mg/l BA içeren Winarto-Teixeria bazal besi yerinde kallus oluşumu için kültüre almışlardır. Kalluslardan sürgünler elde edildikten sonra aktif karbon içeren NWT 3 besi yerinde köklendirilmiş ve daha sonra seralara aktarılmıştır. Elde edilen

bitkilerin morfolojik ve sitolojik olarak çeşitlilik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bitkilerin %23 -29'u haploid, %5-10 aneuploid, %56-69 diploid, %3-4 oranında triploid olduğunu saptamışlardır.

2.3.2 Süs Bitkilerinde Gynogenesis Yöntemi Kullanılarak Yapılmış Olan Haploidizasyon Çalışmaları

Sitbon (1981) *Gerbera jamesonii* türünde döllenmemiş ovülleri *in vitro*'da kültüre almış ve kallusların ovüllerin içinde meydana geldiğini ve bu kalluslardan sürgünlerin farklılaştıklarını belirtmiştir. Farklı besi yerleri denemiş fakat en etkili sonuç veren besi yerinin BAP 2 mg/l, kin 2 mg/l and IAA 0,5 mg/l içeren MS besi yeri olduğunu saptamıştır. Sürgünleri elde ettikten sonra bitkileri çoğaltmış ve kök oluşumlarını klasik yöntemlerle gerçekleştirmiştir. Kapitulum başına 10 adet haploid bitki elde ettiğini belirtmiştir.

Kuo-Chang (1983) döllenmemiş lilyum ovaryumlarını, modifiye edilmiş MS ve N6 besi yerinde 25-27°C 800-1200 lüks aydınlık ortamda kültüre almıştır. Eksplantların 10 gün sonunda şiştiklerini ve 40 gün sonunda 6-12 mm çapa ulaştıklarını belirtmiştir. Ovaryumlar farklılaşma ortamına aktarıldıktan 50 gün sonra bitkileri oluşturmuşlardır. Bazı eksplantlarda embriyojenik yapılar doğrudan bitkileri oluşturmuş ve elde edilen bitkilerin %65.71'i haploid, %34.29'unun diploid olduğunu saptamışlardır. Ovaryum kültürü bulgularının haploid bitkilerin megaspor tetrat, diploid bitkilerin ise muhtemelen nüseller hücrelerden meydana geldiğini belirtmişlerdir.

De Verna ve Collins (1984) *Petunia axillaris* ve *Petunia pardii* türlerini *N. tabacum* ile melezlemişlerdir. Melezleme sonucu anne birey olarak kullanılan *P. axillaris* türünde düşüğe olsa haploid yapıda bitkiler meydana gelmiştir. Araştırmacılar farklı uygulamalar denemiş ve anthesis öncesi yapılan uygulamaların anthesis aşamasında yapılan uygulamalara oranla daha etkili olduğunu ve ovül kültüründe % 6.5'lik bir haploidizasyon frekansı oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Miyoshi ve Asakura (1996) *Gerbera jamesonii* türünde döllenmemiş ovülleri *in vitro* kültüre alarak gynogenic bitkiler elde etmişlerdir. Testlenen hatlardaki genotipik varyasyonlar kallus oluşumlarında kendini göstermiştir. Kültüre alınan 17 genotip arasında ovül kültürü ile kallus oluşturma frekansı %17.5 olan bir genotip bulduklarını belirtmişlerdir. Dört genotipte hiçbir gelişme gözlememişlerdir. Kalluslardan sürgün oluşum frekansları %0 -19.6 arasında olduğunu saptamışlardır. Flow sitometri analizleri sonucunda 37 adet haploid 7 adet diploid ve 2 adet mixhaploid bitki elde etmişlerdir. Haploid bitkilerin kromozomlarını katlamak için ise *in vitro*'da 2-6 dk. %0.05'lik kolhisin uygulamasının etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Tosca ve ark. (1999) *Gerbera jamesonii* türünde ovüllerin kültüre alınma dönemi, genotip ve bunların genotip ve kültüre alınma zamanının interaksiyonunu gynogenesis üzerine etkilerini incelemişlerdir. Nisan ayından Ocak ayına kadar topladıkları döllenmemiş ovülleri 0.88 μ M 6-benzyladenine (BA) ve 0.57 μ M indol-3-acetic acid (IBA) içeren MS besiyeri de kültür almışlardır. Dört genotip arasında baharda kültüre alınan iki genotipin daha fazla kallus meydana getirirse de, farkın fazla olmadığını belirtmişlerdir. Sürgün oluşumunda ise hem sezonun hem de genotipin etkisi olduğunu belirtmişler fakat bunların etkileşimlerinin önemli olmadığını ortaya koymuşlardır.

2.4. Diğer Bahçe Bitkilerinde Yapılmış Olan Haploidizasyon Çalışmaları

Zamir ve ark. (1980) erkek kısır mutant domatesleri ve onların izogenik verimli hatlarını *in vitro*'da kültüre almışlardır. Mutant bireylerin anterlerinin haploid veya daha yüksek ploidi seviyeleri içeren kallus hücreleri meydana getirdiğini belirtmişlerdir.

Karakullukçu (1991) patlıcanda anter kültürü yöntemi ile haploid bitkiler elde etmeyi amaçlamıştır. Anter eksplantlarına kültüre almadan önce soğuk ve kültür aşamalarının ilk evresinde sıcak uygulamaları yaptığını belirtmiştir. Anterlerde haploid bitki oluşumu için en uygun evrenin tomurcukların taç

yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme noktasında bulunduğu, anter renginin ise yeşilimsi sarı renkte olduğu evre olarak belirtmiştir. En etkili gelişimin Chambonnet (1985)'in geliştirdiği besi yerinde, %12 süktroz, 5mg/l Kinetin, 5mg/l 2,4-D içeren besi yerinde meydana geldiğini saptamıştır. Haploid bitkilerin ilkbahar veya yaz başlangıcında çiçeklenmenin ilk dönemlerinde alınan tomurcuklardan elde edildiğini belirtmiştir.

Sarı ve ark. (1992), üç farklı kavun çeşidinde (*C. melo* var. *inodorus*, *C. melo* var. *Reticulatus*, *C. melo* var. *cantalupensis*) yaptıkları ışınlanmış polen çalışmalarında, üç kavun çeşidi içinde 300 gray ile ışınlanmış polenlerin haploid embriyo uyartımında etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Sarı (1994) karpuzda (Crimson Sweet, Halep Karası, Sugar Baby ve Pannonia F1) ışınlanmış polen yöntemini kullanarak yapmış oldukları çalışmada, 200 ve 300 gray dozlarında Co⁶⁰ uygulamışlardır. Işınlanmış polenler ile yapılan tozlamalardan 4-5 hafta sonra elde ettikleri meyvelerin içerisinde meydana gelen globular ve kalp şeklindeki embriyoları, 0.1mg/l IAA içeren E20 A ortamında çimlendirmişler ve elde ettikleri bitkilerin flow sitometrik analizleri sonucunda haploid, diploid ve tetraploid bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri 17 adet haploid bitkiyi katlayarak dihaploid bitkiler elde etmişlerdir.

Zhang ve ark.(1994) *Asparagus officinalis* türünde haploid bitki elde etmek amacıyla mikrospor kültürü yapmışlardır. Tek çekirdekli evresi belirlenen mikrospor hücresi eksplantlarını, 1 mg/l 2,4-D +0.5 mg/l BA içeren MS besi yerinde kültüre almışlar ve kompakt ve gevşek olmak üzere iki farklı tipte kallus elde etmişlerdir. Bitkilerin organogenesis ile elde edildiğini belirten araştırmacılar kallusların 1 mg/l BA + 2 mg/l IBA içeren MS besi yerinde embriyo oluşturdıklarını belirtmişlerdir. Embriyoların sıvı ortamlarda kültüre alınan mikrosporlardan veya katı ortamdaki mikro kalluslardan meydana geldiğini belirtmişler. Organogenesis ve embriyogenesisen elde edilen haploid bitki üretim frekanslarını karşılaştırmışlardır. En etkili haploid bitki gelişiminin gözlemlendiği besi yerinin 1 mg/l BA + 2 mg/l IBA içeren MS besi yeri olduğunu saptamışlardır.

Alpsoy (1999) patlıcanda androgenesis ve haploid bitki elde edilmesi üzerine yaptığı araştırmada, 15 farklı genotip kullanmıştır. Farklı dönemlerde yapmış olduğu denemeler sonucunda en iyi haploid bitki elde ettiği ortamı 5mg/l 2,4-D + 5 mg/l Kin içeren C ortamı ile 4 mg/l NAA ve 1 mg/l Kin içeren MS besi yeri olarak belirlemiştir.

Achar (2002), lahanada yapmış oldukları çalışmada anter kültüründe eksplantlara farklı sıcaklık uygulamaları yapmışlardır. 24 saat boyunca 35 °C sıcak uygulaması yapılan eksplantların, 48 saatlik uygulamaya göre anter başına daha yüksek miktarda embriyo meydana getirdiğini saptamışlardır. Ancak yapılan tüm denemelerde, sıcak uygulamasının embriyo veriminin, soğuk uygulamasına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Öte yandan 6 gün boyunca uygulanan soğuk ve sıcak uygulamalarında her iki uygulamada da embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir. Tüm denemelerden elde edilen sonuçlara göre uygulamalara en çok cevap veren kültür F1 hibrit Hercules çeşidi olduğu bildirilmiştir. Diğer genotiplerde de anter kültürlerinin başarılı sonuçlar vermesine rağmen, 100 anter başına en yüksek embriyo verimi hibrit türden elde edilmiştir. Kültür öncesi yüksek sıcaklık uygulaması embriyo verimine olumlu yönde etki etmiştir. Anterlerin artan gümüş nitrat (AgNO_3 , etilen inhibitörü) konsantrasyonlarına cevap verme oranları, tüm genotiplerde aynı oranda artış göstermiştir. Embriyoların gümüş nitratin yokluğunda da oluşmasının muhtemel sebebi, daha yüksek seviyede genotip x ortam etkileşiminden kaynaklanmakta olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra gümüş nitratin lahanada anter kültürleri açısından hayati derecede önem arz etmediği yapılan diğer önceki çalışmalarda da bildirilmiştir. Bu çalışmada denenmiş olan uygulamaların yüksek miktarlarda üretim yapılacak çalışmalara daha uygun olabileceği bildirilmiştir.

Çetin (2002) asmada anter kültürü üzerine yapmış olduğu çalışmada Hafızali, Ata sarısı ve 99R çeşitlerinin anterlerini kullanmıştır. Kültüre alınan anterlerden kallus oluşumları gözlemlenmiş, fakat embriyojenik yapılar elde edilememiştir.

Kurtar ve ark. (2002), dört farklı sakız kabağı genotipinde ışınlanmış polen tekniğini kullanarak haploid bitki elde etmeye çalışmışlardır. Farklı dozda (25, 50, 75, 100, 200, 300 and 400 Gray) ışınlanmış polenler ile tozlanan bitkilerden 4-5 hafta sonunda meyveler hasat edilmiştir. Meyvelerden farklı aşamalardaki embriyolar elde edildiğini belirtmişlerdir. Partenogenetik uyartım için en etkili ışın dozunun 25 ile 50 Gray olduğunu saptamışlardır. Nokta, globular ve mızrak şeklinde elde edilen embriyolardan haploid bitkilerin geliştiğini saptamışlardır. Elde ettikleri haploid bitkilerin %53.8'i torpedo, %23.1'i globular aşamadaki embriyolardan meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Toplamda 93 adet haploid bitki elde etmişler ve ışınlanmış polene en yatkın çeşidin Eskenderany F1 olduğunu belirtmişlerdir.

Ergin Yılmaz (2005) yazlık kabakta ovaryum kültürü ile haploid bitkilerin elde edilmesi üzerine yapmış olduğu çalışmada, Sakız ve Zeybek çeşitlerinin döllenmemiş ovaryumlarını 4, 6, 8 parçaya ayırarak 0.01 mg/l TDZ, 0.1 mg/l TDZ ve 1 mg/l TDZ içeren embriyo teşvik ortamlarında karanlıkta kültüre almışlardır. Gelişme gözlenen eksplantlar, NAA ve BA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren rejenerasyon ortamlarına alınmıştır. Eksplantlarda kallus oluştuğu fakat bitkiye dönüşümün gerçekleşmediği belirtilmiştir.

Taşkın (2005) biberde anter kültürü üzerine yapmış olduğu tez çalışmasında üç defa kendilenmiş düşük sıcaklığa toleranslı A71, A296, A313 çeşitleri ile soğuğa orta toleranslı A109 ile duyarlı A74 genotiplerini kullanmıştır. En yüksek embriyo oluşturan genotipin A269 olduğu ve Nisan Mayıs aylarında alınan anterlerin en iyi sonucu verdiğini belirtmiştir. Embriyo uyartımı için ise en etkili besi yerinin 30 g/l süktroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BA içeren MS besi yeri olduğunu saptamıştır. Olgunlaşmamış embriyolara % 0.5'lik ABA uygulamasından ise bir sonuç alınamamıştır. Denemeler sonucunda bitkiye dönüşümün hormonsuz MS ortamında meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Koleva-Gudeva ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, androjenik bitkilerin frekansının bitki genotipine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Haploid dönüşümünün düşük oranda gerçekleşmesinden dolayı, anter kültür kullanımının biber ıslahı için verimli olmadığını belirtmişlerdir. Biber anter kültüründen somatik embriyo elde edilmesinde, özellikle oksin gibi büyüme düzenleyicilere, yeterli miktarda besi yerine ve inkübasyon uygulamasına duyulan ihtiyaç, bu çalışmada önemli birer faktör olarak bildirilmiştir. Biberlerin anter kültürlerindeki androjenik potensiyellerinin belirlenmesi için 3 farklı sıcaklık uygulaması yapılan anter eksplantları MS, N, LS ve CP ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu uygulamalardan ilkinde, soğuk şartlarda ve karanlıkta (7 °C’de) anterler inkübe edilip, eksplantların dört hafta boyunca aydınlık ortama alınması sonucunda, kallus oluşumu gözlenmiştir. İkinci uygulamada, anterler 25°C sıcaklıkta ve karanlıkta yedi gün boyunca bekletilmiş, daha sonra ışıklı ortamda dört hafta süre ile bekletilmiştir. Bu uygulama sonucunda ise MS ve N ortamlarında kallus üretimi gözlenmiştir. Çalışmada yapılan üçüncü uygulamada ise 35 °C sıcaklık altında 8 gün boyunca karanlıkta anterler bekletilmiş, daha sonra dört gün boyunca ışıklı ortama alınmış, ardından eksplantlar dört hafta boyunca R₁ ortamına alınmıştır. Bu uygulama sonucunda ise anterlerden embriyolar elde edilmiştir.

Kurtar ve Balkaya (2010) kışlık kabaklarda yapmış oldukları ışınlanmış polen ile haploid bitki elde etme çalışmalarında farklı günlerde (9,11,15,21,28 Temmuz) farklı dozlar (50, 100, 200 and 300 Gray) denemişlerdir. Haploid bitki oluşumlarının ışın dozundan, ışınlanma süresinden, embriyo aşamasından ve embriyo yapısından etkilendiğini belirtmişlerdir. Embriyoların yalnızca 50 ve 100 Gray gibi düşük dozlarda elde edildiğini ve erken ışınlamanın (9,11,15 Temmuz) olumlu sonuçlar verdiğini saptamışlardır. Embriyo kurtarma için en uygun zamanın 4. hafta olduğunu ve elde edilen amorf embriyo ve kotiledonların diploid, geç torpedo aşaması, mızrak şeklindeki ve pro kotiledon şeklindeki embriyoların ise haploid olduğunu belirtmişlerdir. Kışlık kabakta ışınlanmış polen çalışmalarında en etkili dozun 50 Gray olduğunu tespit etmişlerdir.

Ata (2011) biberde anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor kültüründe yaptığı çalışmada düşük ve yüksek sıcaklıklara tolerant ve duyarlı çeşitleri kullanmıştır. Anter alma dönemi olarak Nisan ve Ağustos aylarında alınan anterlerdeki gelişimlerin diğer dönemlere oranla daha olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Besi yeri olarak Kasım, Aralık, Ocak ve Nisan, Eylül aylarında kültüre alınan anterler için 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür+ 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BAP içeren MS besi yeri, Ekim, Mart, Mayıs, Temmuz ve Ağustos aylarında kültüre alınan anter eksplantları için ise 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür+ 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP içeren MS besi yeri olduğunu belirtmiştir. Bitkiye dönüşümün ise en iyi olduğu dönem Nisan ayı olarak saptanmıştır.

Berber ve Abak (2012) yapmış olduğu çalışmada *Cucurbita pepo* var. *styriaca* türünde ışınlanmış polen uyartımı ile haploid bitki elde etmeyi amaçlamıştır. On beş genotipin kullanıldığı çalışmada, 50, 100, 150 gray ışın dozları denenmiş toplamda 2073 embriyo elde edilmiş ve bunların 979 adedinin bitkiye döndüğü belirtilmiştir. Genotipler arasında fark olmadığı ve bütün genotiplerde haploid embriyoların elde edildiğini saptamışlardır. Işınlanmış polen yönteminde en fazla bitki elde edilen ışın dozu 150 olarak belirlenmiş ve aklimatizasyonu yapılan bitkilerin %46.2'sinin haploid olduğu ortaya konulmuştur.

Özdemir (2012), patlıcan çeşitlerinden Faselis F1, Amadeo F1 ve Aydın Siyahı çeşitlerinde mikrospor kültürü yönteminde ovaryum ko-kültür yönteminin haploid embriyo uyartımı üzerine etkilerini araştırmıştır. Uygun gelişme dönemi belirlenen mikrospora 35°C'de 8 gün boyunca 0.3 M mannitol solüsyonu içerisinde ön uygulama yapılmıştır. NLN ortamından izole edilen mikto sporlar 5 mg/l 2,4-D + 5 mg/l Kin ve 5 mg/l NAA+ 5 mg/l BAP içeren besi yerinde kültüre alınmıştır. Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik çekirdek bölünmeleri gözlemlenmiştir fakat hiçbir çeşitte embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir.

Al Remi (2013) biberde anter kültüründe genotip ve besi yerinin etkisi üzerine yapmış olduğu araştırmada 4 farklı genotip 16 farklı besi yerinde (8 adet

Dumas de Vault ve ark., 8 adet MS besisi yerinde (B1-B8)) kültüre alınmıştır. Alfajer ve B hattı biberlerde Kin ve 2,4-D içeren C ortamı, diğer genotiplerde ise NAA+BA içeren MS besisi yerinin etkili sonuç verdiği gözlenmiştir. %0.25 lik aktif karbonun genotipe bağlı olarak embriyo oluşumunu artırdığı belirtilmiştir. Embriyoya dönüşüm açısından en etkili besisi yeri ise gümüş nitrat içermeyen B5 besisi yeri olarak rapor edilmiştir. Embriyoların tamamının bitkiye döndüğü saptanmıştır. Elde edilen bitkilerin %94'ünün haploid olduğu belirlenmiştir.

Başay ve Ellialtıoğlu (2013), bazı patlıcan çeşitlerinde androgenesis üzerine yapmış oldukları çalışmada, anter rengi yeşilimsi sarı olan tomurcukları topladıktan sonra anterlere 8 gün boyunca 35°C'de sıcaklık uygulaması yapmışlardır. Daha sonra anter eksplantlarını dört gün boyunca 25°C'de 12 saat fotoperiyot gösteren kültür şartlarında C besisi yerinde kültüre almışlardır. Eksplantları daha sonra 30 g/l sükröz ve % 0.1 mg/l kinetin içeren R ortamına transfer etmişlerdir. Çalışmanın birinci aşamasında *Verticillium* toleranslı Topan, Halep karası, Teorem F1 ve iki farklı ıslah hattı (Vd-1 ve Vd-2) kullanılmıştır. Topan (%4.16) ve Halep karasında (%2.63) haploid embriyolar elde edilmiştir. Topan ve Halep karasında haploid embriyo oluşumları Vd-1, Vd-2 ve Teoreme göre daha üstün olduğunu saptamışlar. Halep karası ve Topan'ın anter kültüründe başarı elde edilmesinden dolayı donör bitki olarak kullanıp diğer çeşitler ile resiprokal olarak melezlenmişlerdir. Melezler arasında gametik embriyo oluşum yeteneği en yüksek olan genotip Topan F1x Teorem F1, Teorem F1xTopan F1 olarak belirtilmiştir. Bu teknik ile haploid embriyo oluşumu yönünden verimsiz olan çeşitler ile haploid embriyo uyartımına cevap veren çeşitlerin melezlenmesi sonrasında oluşan genotiplerin haploid embriyo oluşturma yeteneklerinin arttığını belirtmişlerdir.

Taşkın ve ark., (2013) iki farklı karpuz genotipinde (Üstün F1) 5 farklı Co⁶⁰ dozu kullanarak ışınlanmış polen yöntemi ile haploid bitkiler elde etmişlerdir. En etkili ışınlama dozu 275 gray olarak belirlenmiştir. Embriyo kurtarma yöntemini kullanarak embriyoları, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ agar, 0.08 mg L⁻¹ B12, and 0.02

mg L-1 IAA içeren CP besi yerinde kültüre almışlardır. Toplamda 43 karpuz bitkisinden 60 adet haploid embriyo elde etmişlerdir. En etkili haploid embriyo oluşumunun, 1. genotipte 275 gray ışın uygulanmış polenler ile tozlanan bitkilerden elde edildiğini belirtmişlerdir (6.25/100).

Baktemur ve ark., (2014), 14 farklı kabak genotipinde, 3 farklı gama dozunu kullanarak haploidizasyon protokolü geliştirmişlerdir. Anterlere 150, 200, 300 grey gama dozu uygulamışlar ve ışınlanmış polenleri tozlamada kullanmışlardır. İlk deneme yılında 219 meyveden 1858 embriyo elde etmişlerdir. Bu embriyolardan 1358 adetinin 150 gray ile ışınlanmış polenler ile tozlanan meyvelerden geldiğini saptamışlardır. İkinci dönemde ise 150, 200, 300 gray ile tozlanan polenlerle melezlenen bitkilerde sırasıyla 2010, 539, 76 adet haploid embriyo elde etmişlerdir. En iyi sonuç veren genotipin %13.35 embriyo oranı ile 6 numaralı genotip olduğunu belirtmişlerdir.

Tulukoglu (2014) karpuzda ovül ve anter kültüründe soğuk uygulamaları, TDZ ve 2,4-D'nin etkisini araştırmıştır. İki farklı deneme için çiçek tomurcuklarına 0, 4, 6, gün süre ile +4°C soğuk şoku uygulamaları yapılmıştır. Daha sonra anter ve ovüller 0, 1, 3 ve 5 mg/l 2,4-D ile 0, 0.01, 0.02 ve 0.04 mg/l TDZ içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. İkinci denemede ise 3 ve 5 mg/l 2,4-D sabit tutularak TDZ'nin 0, 0.01, 0.02 ve 0.04 mg/l konsantrasyonları denenmiştir. Anterlerde yalnızca kallus oluşumları gözlenirken, ovüllerde bitki benzeri yapılar elde edilmiştir. Hormonsuz MS ortamına transfer edilen bitki benzeri yapıların canlılığını yitirdiği belirtilmiştir.

Özsan (2014), farklı genetik ilerleme seviyesinde bitki kullanımının *Capsicum annum*'da anter ve mikrospor kültüründe haploid bitki elde edilmesi üzerine yaptığı çalışmada tek çekirdekli evre belirlendikten sonra anterleri 4 mg/l NAA + 1 mg/l BA içeren MS besi yerinde, mikrosporları ise 0.1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin içeren B5 besi yerinde kültüre almışlardır. Anterlere 8 gün süre ile 35°C sıcak uygulaması yapılmıştır. Mikrosporlar ise anterler kültüre alınmadan bir hafta önce 32°C'de ve 0.3M mannitol içeren ortamda kültüre alınmıştır. Anter

kültürü için aydınlık ortam, mikrospor kültürü için ise karanlık ortam kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ön uygulamaların etkisi olmadığı, anter kültüründe %15.07 oranında torpedo aşamasında embriyo, mikrospor kültüründe ise %13.09 oranında embriyo elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Doksöz (2015) patlıcanda stres, inkübasyon koşulları ve besi yerinin anter kültürü yöntemi ile haploid bitki uyartımına etkilerini incelemiştir. Çalışmada farklı patlıcan çeşitlerinin anterleri 0.01 mg/l Kin + 0.01 mg/l 2,4D + 0.03 mg/l Vitamin B12 içeren MS be DDVX besi yerinde kültüre alınmışlardır. Anterlerin alındığı tomurcuklara 24 saat süre ile +4°C soğuk uygulaması yapılmıştır. Anterlere besi yerinde karanlıkta düşük ve yüksek sıcaklık şokları uygulandıktan sonra rejenerasyon ortamlarına transfer edilmiştir. En yüksek haploid bitki oranları DDVX besi yerinde %0-92.30, MS besi yerinde ise %0-93.33 olarak tespit edilmiştir.

Keleş ve ark. (2015), bazı biber çeşitlerinde haploid bitki elde etmek amacıyla yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında, elde ettikleri bitkilerin çeşitlere ve genotiplere göre değişmekle birlikte farklı oranlarda spontan haploid bitkiler olduklarını belirtmişlerdir. Özellikle dolma biberlerden alınan anterlerden gelişen bitkilerin kromozomlarında %53.4 oranında spontan katlama olduğunu saptamışlardır. Ayrıca SSR marker yöntemi kullanarak elde edilen dihaploid bitkilerin spontan katlanma sonucu oluştuklarını kanıtlamışlardır.

Çelik (2016) üç burun meyve yapısı özelliğine sahip biberlerde farklı genotip, besi ortamı, stres ve inkübasyon şartlarının anter kültürü üzerine etkisini araştırmıştır. Dört farklı genotipten alınan örneklerle 24 saat süre ile +4°C soğuk uygulanmış ve eksplantlar 0.01 mg/l Kin+ 0.01 mg/l 2,4D + 0.03 mg/l Vitamin B12 içeren MS ve DDV besi yerinde kültüre alınmışlardır. Farklı sıcak ve soğuk şokları uygulanmış anterler dört gün sonra rejenerasyon ortamlarına alınmışlardır. En yüksek embriyo oluşumu Tokat yerli genotipinde % 25-31 oranında meydana gelmiştir. Soğuk uygulamasının embriyo uyartımına olumlu etki yaptığı belirtilmiştir.

Durna (2016) *Capsicum annum* türünde anter kültürü uygulamalarında genotip, ön uygulama, besi yeri ve inkübasyon koşullarının embriyo oluşumu , embriyolardan bitki gelişimi ve dihaploid bitki oluşumu üzerine araştırma gerçekleştirmiştir. Çalışmada 10 farklı genotip, +4°C soğuk uygulamaları için 3 farklı süre (0, 24, 48 saat), iki farklı besi yeri (DDV, Dolcet San Juan ve ark.1997) kullanılmıştır. Çalışmada toplamda 1109 embriyoid, 210 bitki ve 27 dihaploid bitki elde edilmiştir. Anter kültürüne en olumlu yanıtı veren çeşidi ise Belissa olduğu saptanmıştır. F1'lerden elde edilen başarı yüzdesinin F2' lere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması kapsamında bitkisel materyal olarak; Melody F1 ticari çeşidi ve ülkemizde doğal olarak yetişen *Cyclamen persicum* Mill., *Cyclamen coum* var. *coum*, *Cyclamen hederifolium* AITON ile endemik *Cyclamen pseudibericum*, *Cyclamen cilicium* BOISS. ET HELDR. türleri kullanılmıştır. Bu türlerden *Cyclamen hederifolium*, *Cyclamen cilicium* BOISS. ET HELDR türleri sonbaharda, *Cyclamen persicum* Mill., *Cyclamen coum* var. *coum*, *Cyclamen pseudibericum* türleri ve ticari Melody F1 çeşidi ise ilkbaharda çiçeklenmektedir.

Bu doğal türler, TÜBİTAK 110O102 no'lu proje kapsamında doğadan toplanarak kültüre alınmış olmasına rağmen, tez süresi içerisinde materyal sıkıntısı yaşanmaması amacıyla daha önce belirlenmiş lokasyonlardan tekrar toplanmıştır ve Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkileri serasında kültüre alınmıştır. Bu doğal türler; *C. persicum*- (Adana-Merkez, Ç.Ü. kampüsü, Sarıçam, Yüreğir, Yumurtalık), *C. coum* (Osmaniye-Ürün köyü, Çiftmazı köyü, Zorkun yaylası), *C. pseudibericum* (Adana-Aladağ ve Fekke), *C. hederifolium* (İzmir, Aydın, Çanakkale-Kaz Dağları) ve *C. cilicium* (Adana-Aladağ ve Pozantı)'dan her bir lokasyondan 50 adet olacak şekilde toplanmıştır.

Toplanan bitki materyalleri (yumrulu, yaprakları ve/veya çiçekleri üzerinde olan bitkiler) Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait seraya getirilerek, kök bölgeleri topraktan arındırılıp, kökler budanarak, 13 cm derinliği olan torf:perlit:kum karışımı (1:1:1) içeren 3 litrelik plastik saksılara dikilmiştir. Saksılar serada tezgahların üzerine yerleştirilerek, güneş ışığından zarar görmemeleri için bitkilere koyu yeşil netler ile gölgeleme yapılmıştır, musluk suyu ile haftada bir 300 ml/saksı olacak şekilde sulanmış ve iki ayda bir N: P: K (18-6-26) gübrelemesi % 0.2'lik solüsyonu hazırlanarak yapılmıştır.

3.1.1. *Cyclamen persicum* Mill.

Ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinin doğusunda yayılış gösteren bu tür, süs bitkileri sektöründe ticareti yapılan kültür formlarının ebeveyni olarak bilinmektedir. Bu türde, beyaz çiçekli taç yaprakların alt kısımları koyu kırmızı, mor, koyu pembe. Doğal yayılış gösteren yabani türlerdeki çiçeklerin beyaz veya açık pembe olacak şekilde iki renkli formu bulunmaktadır. Doğada yayılış gösteren bu türlerin çiçeklerinin merkezi genelde koyu pembe veya kırmızıdır. Yumruları basık küre şeklinde olan bu türün yumru çaplarının 15 cm'ye kadar ulaştığı belirlenmiştir. Ülkemizde doğal yayılış gösteren bu türün kromozom sayısı ve ploidi seviyesi $2n=2x=48$ olarak bilinmektedir. *C.persicum* türünde çiçeklenme Aralık ayında başlar ve Mayıs ayının başlarına kadar devam eder. Ülkemizde özellikle Çukurova bölgesinde ve Hatay'da yoğun olarak yayılış göstermekle birlikte dünya üzerinde ise Akdeniz havzasında yetişmektedir (Şekil 3.1) (Çürük 2013).



Şekil 3.1. Doğal yayılış alanında *C. persicum* türü

3.1.2. *Cyclamen coum* var. *coum*

Tez çalışmasında kullanılan bu tür, Kafkasya, Kırım ve Türkiye'deki Karadeniz'i çevreleyen dağlardan, Bulgaristan'da Tuna nehrinin güneyine ve Akdeniz'in kuzeydoğusundaki dağlardan, İsrail'e kadar uzanan iki temel yayılış alanına sahiptir (Anonymous 2017). Bu tür deniz seviyesinden 2100 m'ye varan yüksekliklerde, humusça zengin topraklarda, iğne yapraklı ağaçların bulunduğu ormanlıklarda, çalılık ya da bodur ağaçlarla kaplı nemli bölgelerde veya nemli kayalıklarda yayılış göstermektedir. Bu türün en önemli özelliği soğuğa dayanıklı olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı dış mekan süs bitkisi olarak süs bitkileri sektöründe kullanılmaya başlanmıştır. Kromozom sayısı $2n=30$ olarak bilinmektedir. Kasım ayının sonunda çiçekler görülmeye başlar ve çiçeklenme Nisan ayının ortalarına kadar devam eder. Yaprakları 2-8 cm uzunluğunda ve 2-3 cm çapında olan bu türün yumru çapları 5 cm kadar ulaşabilmektedir. Taç yaprakları, açık veya koyu kırmızı, pembedir. Bu türde beyaz çiçekler yok denecek kadar az görülmektedir (Çürük, 2013) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Doğal yayılış gösteren *C. coum* türü (Mendi ve Çürük 2016)

3.1.3. *Cyclamen pseudibericum* HILDEBRAND

Ülkemizde endemik olarak yayılış gösteren bu türün çiçekleri Mart ile Mayıs ayları arasında görülmektedir. Taç yaprakları pembemsi mor, koyu kırmızı, koyu pembe veya soluk pembe olup çok az sayıda da olsa beyaz formları mevcuttur. Bu türün önemli özelliklerinden bir tanesi de çiçeklerin kokulu olmasıdır. Bu türün korolla lobları 2-2.5 cm aralığında uçları sivri ve yaklaşık 90° yukarı aşağı eğilmiştir. Korollaların tabanında koyu pembe veya mora yakın (Magenta rengi) lekeler bulunmaktadır. Oval, geniş genellikle uçları taraklı yaprakları sonbaharın sonlarına doğru görülmeye başlar. *C. pseudibericum* türünde yaprakların üst kısımları koyu yeşil, gri yeşil veya gümüş desenlerle çevrili ve genelde yaprak boyutları 2-8 cm uzunluğunda, 2-9 cm genişliğindedir. Ülkemizde doğu Akdeniz bölgesinde özellikle Adana, Kahramanmaraş civarında ve Amanos dağlarında yayılış gösteren bu türün kromozom sayısı da $2n= 30$ olarak bilinmektedir. Bu tür 500- 1500 m arası rakımlarda, iğne yapraklı ağaçların bulunduğu ormanlık alanlarda, çalılıklarda, kayalıklarda, dökülen yaprakların oluşturduğu yaprak çürüklerinin bulunduğu yerlerde yetişmektedir. Yumru çapları 7 cm kadar ulaşan bu türde genç yumrular pürüzsüzken yaşlandıkça pürüzlü hale gelir (Çürük, 2013) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Doğal yayılış gösteren *C. pseudibericum* türü (Çürük ve Mendi 2016)

3.1.4. *Cyclamen hederifolium* AITON

Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bu tür, son zamanlarda bahçelerde kullanımının yaygınlaşması ile birlikte ticari anlamda oldukça değer kazanmıştır. Bu türde çiçekler güz yağmurlarının başlaması ile bağlantılı olarak Ağustos sonunda ortaya çıkar ve Ekimin ortalarına kadar çiçeklenme devam eder. Taç yapraklarının rengi genelde beyaz ve açık pembe olan bu türün bazı genotiplerinin az miktarda kokulu olduğu belirtilmiştir. Korolla lobları 1.5-2.5 cm uzunlukta, 0.7-1 cm genişlikte aşağı doğru eğilmiş, sivri veya yuvarlak uçlara sahiptir. Taç yaprakların taban kısımlarında küpe olarak adlandırılan yapılar mevcuttur ve taç yaprakların taban kısımları daha koyu kırmızımsı mordur. Bu türde yapraklar çiçeklenmeden sonra ortaya çıkmaktadır. Yapraklar kalp veya mızrak başı şeklinde bazen dişli olmakla birlikte, yaprakların üst kısımlarında koyu yeşil zemin üzerine soluk veya açık yeşil, gümüş veya gri renkte desenler bulunmaktadır. Yumruları ise üstten basık şekilde sıkıştırılmış bir küre şeklinde olgunlaşmış yumruların çapı 25 cm'ye kadar ulaşabilmektedir. Yumruların üzeri odunsu bir tabaka gibi pürüzlü veya pürüzsüz de olabilir. Kökler yanlardan dışa doğru uzanır ve genelde kökler ortalama 0.2 cm çapındadır. Bu takson dünya üzerinde en geniş yayılış alanına sahip siklamen türüdür. Fransa'nın güneyinden Balkan'ları da kapsayacak şekilde Türkiye'nin güney batısına kadar uzanan geniş bir dağılıma sahiptir. *C. hederifolium* türü 1300 m yükseklikte, gölgelik yerlerde yaprak döken ağaçların bulunduğu ormanlıklarda, çakıllı kayalar arasında varlığını sürdürebilir. Bu türün kromozom sayısı $2n=34$ olarak saptanmıştır (Şekil 3.4) (Çürük, 2013).



Şekil 3.4. Doğal yayılış gösteren *C. hederifolium* türü resim büyüklükleri aynı (Mendi ve Çürük, 2016)

3.1.5. *Cyclamen cilicium* BOISS. ET HELDR.

Türkiye'ye endemik olan bu tür Akdeniz bölgesinde Adana, Mersin, Antalya, Isparta, Karaman, Konya illerinde yayılış göstermektedir. Çiçeklenme, eylül ayında başlar enleme bağlı olarak kasım ayının sonuna kadar devam eder. Taç yaprakları beyaz ve açık pembe renkte bazılarının üzeri benekli ve hafif kokulu genotipleri bulunmaktadır. Taç yaprak halkaları aşağı doğru eğilmiştir ve 1.5-2 cm uzunluğunda, 0.4-0.6cm genişliğindedir. Yapraklar çiçeklerden sonra görünmeye başlarlar, oval ve kalp şeklinde olan yaprakların bazıları taraklı olabilmektedir. Yaprakların yüzeyleri koyu yeşil ve üzerlerinde açık yeşil veya gümüş renkte desenler bulundurmaktadır. Yaprakların alt kısımları koyu kırmızı veya mordur ve uzunluğu 1.5-6 cm, genişliği 1.5-5 cm'dir. Yetişkin yumrular 5 cm çapa erişebilmektedir. Yumuşak ince kadifemsi tüyleri olan yumrular küre şeklindedir. Kökler alttan dallanır ve 0.1 cm çapına ulaşabilirler. Bu tür, deniz seviyesinden 20-200 m yükseklikte kumlu, killi ve kireçli topraklarda yaşarlar ve iğne yapraklı

ağaçların bulunduğu ormanlık alanlarda, kayalar arasında veya çalılıklarda yayılış gösterirler. Kromozom sayıları $2n=30$ dur(Çürük, 2013) (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Doğal yayılış gösteren *C. cilicium* türü (Mendi ve Çürük 2016)

3.1.6. Ticari Melody F1 Çeşidi

Sadece dış mekan için geliştirilen türler ile melezleme sayesinde meydana gelen bu çeşit içerisinde yer alan bitkiler oldukça güçlü ve kalın çiçek saplarının yanında mermerimsi yaprak şekline sahiptirler. Bu serideki siklamenler soğuk hava şartlarına karşı oldukça toleranslıdır. Bu çeşitlerde tek çiçek rengi olmasının yanı sıra iki renkli çeşitlerde mevcuttur. Melody F1 çeşitleri kendine özgü biçimin yanı sıra zengin bir çiçeklenmeye sahiptir. Ayrıca farklı hava şartlarına dayanıklı olan bu tür kışın $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar dayanabilmektedir. Koyu yeşil yaprakların üzerinde gümüş renkli desenler mevcuttur ve kompakt bir büyüme gösterirler. Modern seralarda zaman kaybı olmaksızın kolayca yetiştirilebilirler (Şekil 3.6) (Anonymous 2018).



Şekil 3.6. Melody F1 ticari siklamen çeşidi (Anonymous, 2018)

3.2. Metot

Tez çalışmasında, *in vitro* denemelerinin tamamı, dış ortama aktarma çalışmaları ve bitkilerin kültürel bakım işlemleri, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında ve Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü süs bitkileri serasında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Anter Kültürü Denemeleri

3.2.1.1. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması ve Mikrospor Hücrelerinin Tek Çekirdekli Evrelerinin Belirlenmesi

Haploidizasyon çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktör, anterlerde bulunan mikrospor hücrelerinin geç tek çekirdekli evrede veya erken çift çekirdekli evrede bulunduğu dönemi saptamaktır. Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerini barındıran anterlerin kültüre alınması en önemli aşamalardan bir tanesidir.

In vitro anter kültürü denemelerinde, Melody F1 ticari çeşidi ile ilkbaharda (*C. coum*, *C. persicum* ve *C. pseudibericum*) ve sonbaharda (*C. hederefolium* ve *C. cilicium*) çiçeklenen doğal türlerden farklı büyüklüklerde ve farklı zamanlarda tomurcuklar alınmıştır. Laboratuvara getirilen çiçek tomurcuklarının, binoküler sterio (x5) mikroskop altında sırasıyla çanak yaprakları ve taç yaprakları çıkarılarak anterleri elde edilmiştir. Anterler tomurcuktan çıkarılarak lam üzerinde ezilmiş ve mikrosporların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Önceden hazırlanmış DAPI solüsyonu, eksplantlar üzerine damlatıldıktan sonra lam üzerinde ezilmiş ve ezilen anterlerin anter duvarları pens yardımı ile lam üzerinden uzaklaştırılmış ve daha sonra üzerine lamel kapatılmış preparatlar hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda UV (mavi filtre) filtre altında incelenmiş, mikrosporların tek çekirdekli olduğu evre belirlenmiştir (Şekil 3.7). Bu yöntem, ovül kültürü için de uygun tomurcuk boyutlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

DAPI boyasının hazırlanışı: 61.5 ml 0.1 M Sitrik asit ile 38.5 ml 0.2 M Disodium Hydrogen OrthoPhosphate (Na_2HPO_4) karıştırılarak hazırlanmıştır. Son olarak %1 oranında Triton 100, tampona ilave edilerek 1 ml'lik hacimler halinde +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.7. Anter kültürü denemeleri için tek çekirdekli evrenin belirlenmesi hazırlık aşamaları, A) Farklı boyutlardaki tomurcukları bulunduran bitki, B) Çiçek tomurcuklarının içerisinden çıkarılmış anter eksplantları, C) DAPI boyası ile boyanan anterlerden izole edilmiş tek çekirdekli mikrospor hücresi, D) Farklı boylardaki çiçek tomurcuklarının ölçülmesi

3.2.1.2. Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu

Çiçek tomurcukları, ilk olarak 30 dk. musluk suyu altında bekletilmiştir. Toprak artıkları ve toz benzeri yapılardan arındırılan tomurcuklar antibakteriyel sabun ile yıkanmıştır. Çeker ocak içerisine alınan tomurcuklar, %0.1'lik HgCl_2 solüsyonunda 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra 3-4 kere saf su ile durulanmıştır. Ağzı kapalı bir şekilde steril kabinlere alınan eksplantlar, %70'lik etil alkolde 1-2 dk. bekletilmiştir. Steril saf su ile bir kez durulanan çiçek tomurcuklarına %20'lik NaOCl (ticari domestos) solüsyonu uygulanmış ve daha sonra eksplantların üzerindeki köpük gidene kadar steril saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan çiçek tomurcuklarının anter ve ovül kısımları izole edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *Cyclamen* türlerinde uygulanan yüzey sterilizasyonu, A) Çeşme suyu altında bekletilen çiçek tomurcuğu eksplantları, B) Eksplantların %70'lik alkol ile muamele edilmesi, C) Eksplantların %20'lik NaOCl'de bekletilmesi

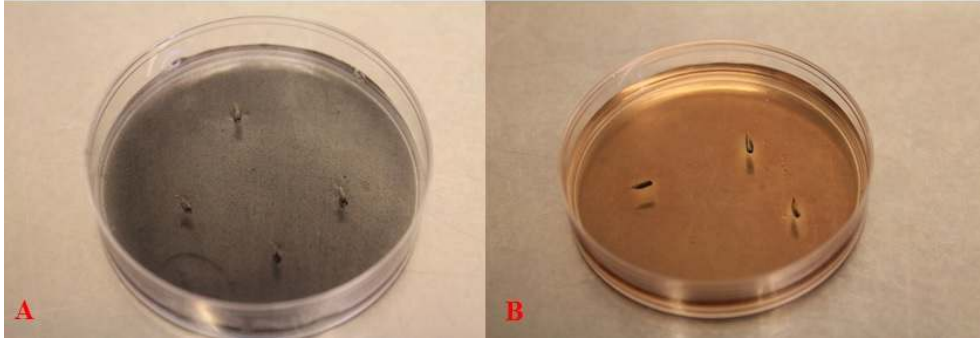
3.2.1.3. *In vitro* Anter Kültürü Üzerine Soğuk, Aktif Karbon, Gümüş Nitrat (AgNO_3) Uygulamaları

Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerini barındıran anterlere sahip tomurcukların boyları belirlenmiştir. Belirlenen boydaki tomurcuklardan alınan anter eksplantlarına iki farklı şekilde soğuk uygulaması yapılmıştır. İlk olarak tomurcuklar serada saksılarda kültüre alınmış bitkilerden toplandıktan sonra petri kapları içerisinde 2 gün boyunca $+4^\circ\text{C}$ buzdolabı içerisinde bekletilmişlerdir. Diğer uygulama ise yüzey sterilizasyonu yapılmış tomurcuk eksplantlarından kültüre alınan anterlerin besi yeri ile birlikte 2 gün boyunca $+4^\circ\text{C}$ buzdolabında bekletilmesi şeklinde uygulanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş olan tomurcuklar, steril kabin içerisinde mikroskop altında steril pens ve bistüri kullanılarak kültüre alınmıştır. Steril tomurcukların ilk olarak çanak ve taç yaprakları çıkarılarak anterlerine ulaşılmıştır. Anterler duvarlarına zarar verilmeden çiçek tablasından filamentleri ile birlikte ayrılmışlardır. Anterler besi yerine konulmadan filamentleri dikkatli bir şekilde anterlerden ayrılmıştır.

Tez çalışması kapsamında anter kültürü denemelerinde Takamura ve ark. (2011)'nin geliştirdiği B5 besin ortamı (Gamborg ve ark., 1968) modifiye edilerek

denemeler kurulmuştur (Çizelge 3.1). Takamura ve ark. (2011)'nin geliştirdiği B5 besin ortam içeriğinde en iyi karbon kaynağı (262.9 mM maltoz) ve NAA'nın farklı konsantrasyonları (0, 1.0, 3.0 ve 5.0 μ M) denenmiştir. Deneme kapsamında ticari çeşit ve doğal türlerde ilk defa aktif karbon ve gümüş nitratın etkisi de araştırılmıştır. Bu kapsamda kullanılan B5 ortamında aktif karbonun (0, 0.5, 1 g/L) ve gümüş nitratın (AgNO_3) (%0, 0.1 ve 0.3) farklı doz ve kombinasyonları uygulanmıştır (Çizelge 3.2). Anterler 8 hafta süresince karanlıkta 20 °C'de petrilerde kültüre alınmıştır. İlk alt kültür, anterlerden embriyolar çıktıktan sonra yapılmıştır. Sekiz hafta sonra anterler, NAA içermeyen B5 besin ortamında farklılaştırılmak üzere büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25 ± 1 °C'de) kültüre alınmıştır.



Şekil 3.9. Anter kültürü denemelerinde anterlerin kültüre alınması A) Aktif karbon uygulamaları B) Gümüş nitrat uygulamaları

Çizelge 3.1. Anter kültürü denemelerinde kullanılacak B5 besin ortamı ve içeriği

Makro elementler (B5 Ortamı)		(mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O		150
NaH ₂ PO ₄		130
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
MgSO ₄ .7H ₂ O		250
KNO ₃		2500
Mikro elementler (B5 Ortamı)		(mg/l)
CoCl ₂ .6H ₂ O		0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O		0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0.25
KI		0.75
ZnSO ₄ .7H ₂ O		2
H ₃ BO ₃		3
MnSO ₄ . H ₂ O		10
Diğer Bileşikler (B5 Ortamı)		(mg/l)
FeSO ₄ .7H ₂ O		27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O		37.3
myo-Inositol		100
Nikotinik asit		0.1
Thiamine HCl		0.5
Pyridoxine HCl		0.5
Karbohidratlar		(mM)
Maltoz		262.9
		(g/l)
Gelrite		2
NAA		0, 1, 3 ve 5 µM

Anter kültürü çalışmaları için uygulanan deneme planı Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. Deneme kapsamında anterlerin en iyi gelişme gösterdiği besi yeri belirlenmiş, bir sonraki yılın denemelerinde etkili olan besi yeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Anter kültürü denemeleri kapsamında kullanılacak türler ve deneme planı

Aktif Karbon ve Gümüş Nitrat (AK+AgNO ₃) (g/L+%) NAA Kons. (µM)		Siklamen Ticari Çeşit ve Doğal Türler					
		<i>9246-Red</i> (Ticari Çeşit)	<i>C. persicum</i>	<i>C. pseudibericum</i>	<i>C. hederefolium</i>	<i>C. coum</i>	<i>C. cilicium</i>
1	Kontrol (0+0) NAA yok	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
2	(0+0) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
3	(0+0.1) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
4	(0+0.3) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
5	(0.5+0) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
6	(0.5+0.1) (0, 1, 0.3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
7	(0.5+0.3) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
8	(1+0) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
9	(1+0.1) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
10	(1+0.3) (0, 1, 3 ve 5 µM NAA)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)	12 petri (Her petride 3 anter eksplanti)
Toplam		360 petri	360 petri	360 petri	360 petri	360 petri	360 petri
		2160 petri (6480 anter eksplanti)					

3.2.2. Ovül Kültürü Denemeleri

Ovül kültürü denemelerinde, ticari çeşit (9244) ve doğal türlerin (*C. coum*, *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. hederefolium* ve *C. cilicium*) uygun tomurcuk boyları belirlenmiştir. Uygun tomurcuk boyları anterlerin tek çekirdekli evrede olduğu aşamadır ve uygun tomurcuk boyları anter kültürü denemelerinde belirtilmiş olan DAPI boyama metodu ile belirlenmiştir. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen çiçeklerin sırasıyla çanak yaprakları, taç yaprakları ve erkek organların bulunduğu yapıları, steril bistüri yardımı ile çıkarıldıktan sonra ovaryuma ulaşılmıştır. Ovaryum zarı çıkarıldıktan sonra ovüllere ulaşılmıştır. Ovüller, sterio binoküler ışık mikroskobu altında steril şırınga ucu ile çıkarılmıştır.

Ovüller mikroskop altında çıkarıldıktan sonra modifiye edilmiş ½MS (Mursahige ve Skoog, 1962; Winkelmann, 2010) besi yerinde kültüre alınmıştır. Tez çalışması kapsamında 2,4-D (0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/l) ve 2iP (0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg/l)'nin farklı konsantrasyonları denenerek en iyi embriyojenik kallus geliştirme protokolü geliştirilmiştir. Besin ortamı içeriği ve deneme planı Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. Eksplantlar, bu aşamada tamamen karanlık ortamda ve 25±1°C'de kültüre alınmış ve her 4 haftada bir alt kültürleri yapılmıştır. Embriyolar meydana geldikten sonra (8.hafta) eksplantlar farklılaşma besi yerine aktarılmışlardır(Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Ovül Kültürü Denemeleri, A) Ovaryum zarları çıkarılmış ovül eksplantları, B) Steril şırınga ile ovüllerin çıkarılması, C) Ovüllerin besi yerinde kültüre alınması, D) Ovüllerden embriyoların oluşması E) Embriyoların bitkiye dönüşümü, F) Bitkiciklerin elde edilmesi

3.2.2.1. Ovül Kültüründe Farklılaşma ve Embriyojenik Kallusların Çimlenmesi

Embriyo ve embriyo benzeri yapıların oluşturulması için kullanılan besi yerinde yaklaşık 8 haftalık kültür sonrasında oluşan kalluslar, hormon içermeyen ½ MS besi yerine aktarılmıştır. Aktarılma esnasında eksplantlar, besi yeri farkından dolayı eski besi yerlerinden arındırılmak amacı ile steril kurutma kağıtlarında kurutularak yeni besi yerlerine alınmıştır. Bu besiyerinde 8 haftalık kültürün ardından aynı içeriğe sahip besi yerlerine alt kültür işlemi yapılmış ve alt kültür işlemi her 4 haftada bir tekrar edilmiştir. Eksplantlar, bu aşamada da tamamen aydınlık ortamda ve $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Gözlemler sonrası kalluslardan oluşan embriyojenik kalluslar da, her 4 haftada bir hormon içermeyen besi yerlerinde alt kültüre alınmıştır. Embriyojenik kalluslar olgunlaşıp ilk kotiledonlar görülene kadar petrilerde inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra ise magentalara aktarılmıştır. Embriyojenik kalluslar gelişmeye başladığında kültür ortamları, büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$) kültüre alınarak gelişimleri gözlenmiştir. Tez çalışması kapsamında, *in vitro*'da elde edilen aday haploid bitkiciklerin aklimatizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Ovül kültürü denemelerinde kullanılacak MS besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları

Makro elementler (MS)		(mg/l)
NH ₄ NO ₃		825
KNO ₃		950
CaCl ₂ x 2H ₂ O		220
MgSO ₄ x 7H ₂ O		185
KH ₂ PO ₄		85
Mikro elementler (MS)		(mg/l)
H ₃ BO ₃		3.1
MnSO ₄ x 1H ₂ O		8.45
ZnSO ₄ x 7H ₂ O		5.3
KI		0.415
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		0.125
CuSO ₄ x 5H ₂ O		0.0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O		0.0125
Diğer Bileşikler		(mg/l)
Fe EDTA		34.51
Peptone		250
myo-Inositol		100
Glisin		2
Nikotinik asit		0.1
Thiamine HCl		0.5
Pyridoxine HCl		0.5
Karbohidratlar		(g/l)
Sakkaroz		30
D(+)-glucose monohydrate		2
		(g/l)
Gelrite		3.7
2,4-D		(0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/l)
2İP		(0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg/l)

Çizelge 3.4. Ovül kültürü denemeleri kapsamında kullanılan türler ve deneme planı

Bitki Büyüme Düzenleyicile ri (2,4-D+2iP) (mg/l)	Siklamen Ticari Çeşit ve Doğal Türler					
	<u>9246-Red</u> (Ticari Çeşit)	<u>C.</u> <u>persicum</u>	<u>C.</u> <u>pseudibericum</u>	<u>C.</u> <u>hederefolium</u>	<u>C.</u> <u>coum</u>	<u>C.</u> <u>cilicium</u>
Kontrol (0+0)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
1 (0.5+0.1)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
2 (0.5+0.3)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
3 (0.5+0.5)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
4 (0.5+0.8)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
5 (1+0.1)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
6 (1+0.3)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
7 (1+0.5)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)
8 (1+0.8)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplantı)

Çizelge 3.4. Devamı

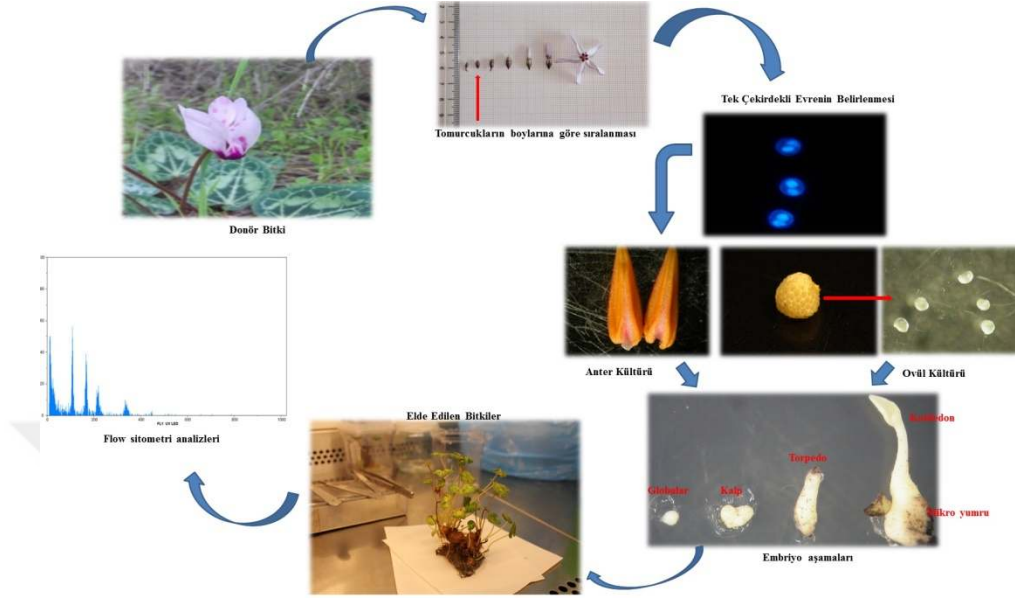
9 (1.5+0.1)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
10 (1.5+0.3)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
11 (1.5+0.5)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
12 (1.5+0.8)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
13 (2+0.1)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
14 (2+0.3)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
15 (2+0.5)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
16 (2+0.8)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)	4 petri (Her petride 10 ovül eksplanti)
Toplam	680 petri	680 petri	680 petri	680 petri	680 petri	680 petri
4080 petri (40800 ovül eksplanti)						

3.2.3. Aday Haploid Bitkiciklerin Aklimatizasyonu

Ovül ve anterden elde edilen embriyolar olgunlaşarak küçük bir yumru, kök ve ilk gerçek yapraklarını oluşturduktan sonra, dış ortama alıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yeterli miktarda olgunluğa erişen aday haploid bitkicikler, ilk olarak filtreli büyütme kaplarına aktarılmışlardır. Bu süre sonunda hava filtreli kapaklar tamamen açılarak direk dış ortama aktarma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3. 11). Bitkicikler yetiştirme ortamlarından çıkarılarak kök ve yumru kısımları musluk suyu ile yıkanmış ve besiyerinden tamamen arındırılmıştır. Kök ve yumruları %0.2'lik sıvı fungusit (Captan) içerisine daldırılmıştır. Bitkicikler, otoklavda steril edilmiş perlit-torf (1:1) karışımı içeren viollere dikilerek kültürel bakım işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. Aday haploid bitkilerin aklimatizasyon aşamaları, A) Besi yerinden çıkarılmış bitkilerin çeşme suyu altında yıkanması, B) Bitkilerin %0.2'lik fungusite daldırılma aşaması, C) Bitkilerin saksılara alıştırmadan önceki köklü yapısı, D) Bitkilerin torf ve perlit içeren saksılarda kültüre alınması



Şekil 3. 12. Haploidizasyon aşamaları

3.2.4. Flow Sitometri Analizleri

Elde edilen aday haploid bitkilerden *in vitro* aşamada alınan yaprak örnekleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında hazırlanıp soğuk zincir ile 12 saat içerisinde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Sitoloji laboratuvarına getirilmiştir ve flow sitometri analizleri burada gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Yaprak Örneklerinin Hazırlanışı

In vitro şartlarda kültüre alınmış olan magenta kapları içerisindeki bitkiciklerden örnek alma işlemi steril kabinler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kapakları, steril kabin içerisinde açılan magenta kaplarındaki bitkilerden steril pens ve bistüri yardımı ile kesilen yaprak örnekleri, nemli filtre kağıtları arasında petri kaplarına konulmuş ve fazla suyu alınan petri kaplarının ağızları sıkıca streç ile

sarılmıştır. Petri kapları buz kalıpları içeren straforların içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 3.13).

3.2.4.2. Solüsyonların Hazırlanması

Yaprak eksplantlarından DNA izolasyonu için Arumuganathan ve Earle'nin 1991 yılında geliştirmiş oldukları yöntem kullanılmıştır. Buffer olarak $MgSO_4$ 'ın kullanıldığı çözeltiler şu şekilde hazırlanmıştır:

$MgSO_4$ buffer' ının Hazırlanması: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.246g) KCl (0.37 g) ve hepes (0.12 g) iki kere distile edilmiş su içerisinde çözüldükten sonra pH: 8.0'e ayarlanmış ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde iki kere distile edilmiş su ile tamamlanmıştır.

Triton X-100 (%10 w/v) Hazırlanması: 1 g triton x-100, 10 ml ddH₂O içerisinde çözülmüş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Propidium iodide: 5 mg propidium iodide, 1 ml iki kere saflaştırılmış su içerisinde çözülmüş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

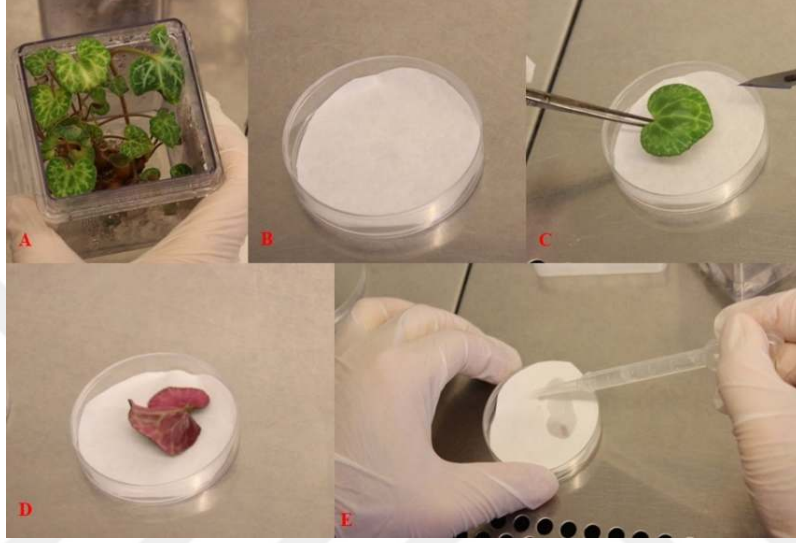
Solüsyonun Hazırlanışı

Solüsyon A: 75 ml Solüsyon A hazırlamak için 72 ml $MgSO_4$ buffer, 75mg Dithiothreitol, 1500 µl PI (stok) ve 1875 µl Triton X-100 (stok) karıştırılmış, solüsyon A günlük olarak (her bir örnek için 1.5ml) hazırlanmış ve buz içerisinde muhafaza edilmiştir.

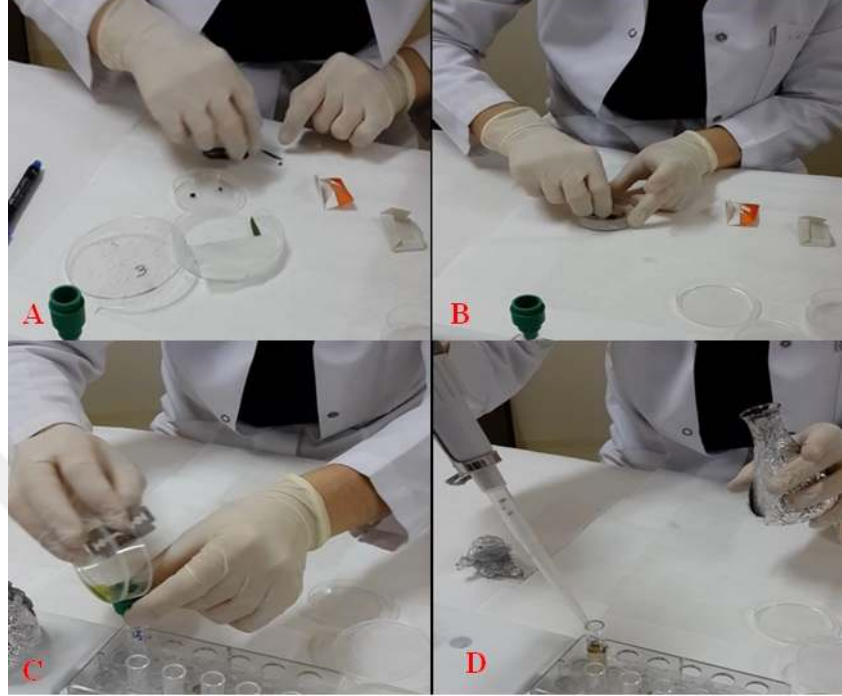
Solüsyon B: 22.5 ml A solüsyonuna, 52.5 µl RNAase, DNase free eklenerek hazırlanmıştır. Solüsyon B'den her örnek için 0.5 ml hazırlanmıştır.

40 g ağırlığındaki sağlıklı (genç ve taze) yaprak örnekleri ile 20 g standart olarak kullanılan bitki dokusu petri kabına konulduktan sonra 1ml A solüsyonu eklenmiştir. Petri kabındaki bitki dokuları, keskin bir jilet yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır. Elde edilen solüsyon 30-33 µM porlara sahip olan filtrelerden geçirilerek mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüplere alınan solüsyon 14.000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildikten sonra üst kısımda kalan sıvı alındıktan sonra

çöken kısım 400 μ M B solüsyonu içerisinde çözünmüştür. Örnekler 20 dakika 37 °C’de bekletilip, daha sonra cihazda okutulmuştur. Elde edilen pikler ve grafikler değerlendirilmiştir (Tuna, 2016) (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Flow sitometri analizleri için örneklerin hazırlanışı, A) Doku kültüründe bulnana bitkilerden yaprak örneklerinin alınması, B) Filtre kağıtlarının petrilere konulması, C-D) Yaprakların ıslatılmış filtre kağıtlarının üzerine konulması, E) Yaprakların üzerine kapatılan filtre kağıtlarının ıslatılması



Şekil 3.14. Flow sitometri analizleri ve eksplantların hazırlanışı, A) Yaprak örneklerinin ve standartların 1:1 oranında petrilere konulması, B) Solüsyonların yaprak ve standart üzerine eklenerek jilet yardımı ile küçük parçalara ayrılması, C) Eksplantların filtrelerden geçirilerek büyük parçalardan ayrılması, D) DAPI boyasının eksplantları barındıran tüplere eklenmesi

3.2.5. Histolojik Analiz

Ovül ve anter eksplantlarından elde edilen embriyojenik yapılar histolojik analizler ile incelenmiştir. Gelişim gösteren anter ve ovül eksplantlarındaki farklı aşamalardaki embriyojenik yapılar tespit edilmiştir.

3.2.5.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması

Ovül ve anter eksplantlarında 4, 8, 12. haftalarda gelişen örnekler, histolojik gelişimlerinin incelenmesi amacıyla fiksasyon (FPA:formaldehit: propiyonik asit: alkol) (900 ml %70'lik alkol + 50 ml propiyonik asit +50 ml formaldehit) solüsyonu içerisine alınmıştır.

3.2.5.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması

Örnekler parafin bloklar içerisine yerleştirilmeden önce sırasıyla %70, %85, %95, %100'lük Johansen çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. *In vitro*'dan alınarak FPA solüsyonu içerisinde bekletilen örnekler her bir alkol serisinde yaklaşık 2 saat bekletilmiş ve vakum altında 30-35 dakika süreyle havaları alınmıştır. Daha sonra Tersiyer butil alkol (TBA-1) sıvısı içerisinde 1 gece, TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde 3'er saat bekletilmiştir. Daha sonra petri kapları içerisinde 60-65 °C'de eritilen sıvı parafin içerisine konulmuştur. Etüvde 60-65 °C'de 2-3 gün bekletildikten sonra etüv dışına alınmıştır ve buz üzerinde hızla soğumaya bırakılarak sertleşmesi sağlanmıştır.

3.2.5.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması

Örneklerin üzerindeki fazla parafin kesilip ayrıldıktan sonra tahta bloklar üzerine yine parafin yardımı ile yapıştırılmıştır. Tahta bloklar üzerine alınan örneklerden rotasyon mikrotom kullanılarak 8 µm kalınlığında kesit alınmıştır. Kesitlerin etiketleme işlemi lamaların kenarlarına yapılmıştır. Kesitlerin lamaların üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla daha önceden hazırlanan 1:1 oranındaki yumurta akı: gliserin karışımından oluşan sıvı, lamaların üzerine sürülmüştür. Örneklerden alınan kesitler lamlara yerleştirildikten sonra 35-40 °C sıcaklığındaki sıcak yüzey (hot plate) üzerine konulmuştur. Sıcak yüzey üzerindeki her bir lama bir damlalık yardımıyla saf su ilave edilmiştir. Bu yolla kesitlerin su yüzeyinde yüzmesi ve sıcaklığın yardımıyla suyun parafini gergin duruma getirmesi ve suyun buharlaşmasıyla birlikte kesitlerin lam üzerine gergin bir vaziyette yapışması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra lam üzerindeki kesitler bir gece boyunca 30-35 °C'deki etüv içerisinde bekletilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Histolojik analizlerin farklı aşamaları, A) Mikrotomda kesit alınan parafin içerisinde bloklanmış örnekler, B) Kesit alınan örneklerin lam üzerine konulması, C) Lam üzerine yerleştirilmiş ve kesit alınmış örneklerin ısıtıcı üzerinde bekletilme aşaması

3.2.5.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması

Lamlar, lam taşıyıcıları üzerine yerleştirilen ve 10'ar dk. ksilol-1, ksilol-2' de bekletilen, parafinin erimesi ve örneklerden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamada örnekler ilk olarak izopropil alkol-1 ve izopropil alkol-2'de 5'er dk., daha sonra % 96'dan başlayarak sırasıyla % 70, % 40 ve % 20 olacak şekilde dereceleri azalan alkol küvetlerinde ve son olarak ta saf su içerisinde 3'er dk. bekletilmiştir. Bu işlemlerin sonunda örneklerin boyanması işlemine geçilmiştir. Boyama işlemi için hematoksin boy çözeltisi kullanılmıştır. Hematoksin boy çözeltisini hazırlamak için; 1 g hematoksin, 6 ml etil alkol içerisinde eritilmiştir. Ayrıca, 12.5 g KAl_3SO_4 (potasyum alüminyum sülfat) 100 ml suda eritilmiş ve bu suya 0.18 g $KMnO_4$, 25 ml gliserin ve 25 ml metanol eklenen ve bundan sonra önceden eritilen hematoksin ile karıştırılarak stok çözeltisi hazırlanmıştır. Boyama işlemi için 1 birim stok çözelti, 10 birim saf suyla seyreltilerek kullanılmıştır. Örnekler boyama sıvısı içerisinde 30 dk., daha sonra su dolu bir kap içerisinde hafif akan çeşme suyu altında 15 dk. bekletilmiştir. Daha sonra boyanan örnekler başlangıçta izlenerek alkol serilerinden ters yönde yeniden geçirilmiştir. Bu amaçla boyanan

örnekler % 20, % 40, % 70, % 96'lık alkolde yine 3'er dk. bekletilerek ve izopropil alkolde 5'er dk. bekletilerek ayrı bir ksilol kabı içerisine alınmıştır. Ksilol kabı içerisinden alınan lamaların üzerindeki ksilol iyice süzölmüştür ve üzerlerine entellan yapıştırıcı damlatılarak birer lamel ile kapatılmıştır. Bu şekilde devamlı preperat haline getirilmiş olan örneklerin 30°C'deki etüvde bekletilerek incelemeye hazır hale getirilmiştir (Eti ve Stosser, 1987) (Şekil 3.16).

İncelenmeye hazır olan preparatlar, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sitoloji laboratuvarında mikroskop altında incelenmiş ve görüntüler alınmıştır. Elde edilen görüntülerde eksplantlar üzerindeki büyüme noktaları, vakuol büyüklükleri, kallus dokuları arasındaki farklılıklar ve epidermis dokuları ve farklı embriyo aşamaları tespit edilmiştir.



Şekil 3.16. Histolojik analizlerin aşamaları: A) Mikrotom yardımı ile kesit alınması işlemi, B) 1:1 Oranında yumurta akı ve glisin karışımının lam üzerine sürülmesi, C) Çeker ocak içerisinde boyama aşamaları

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

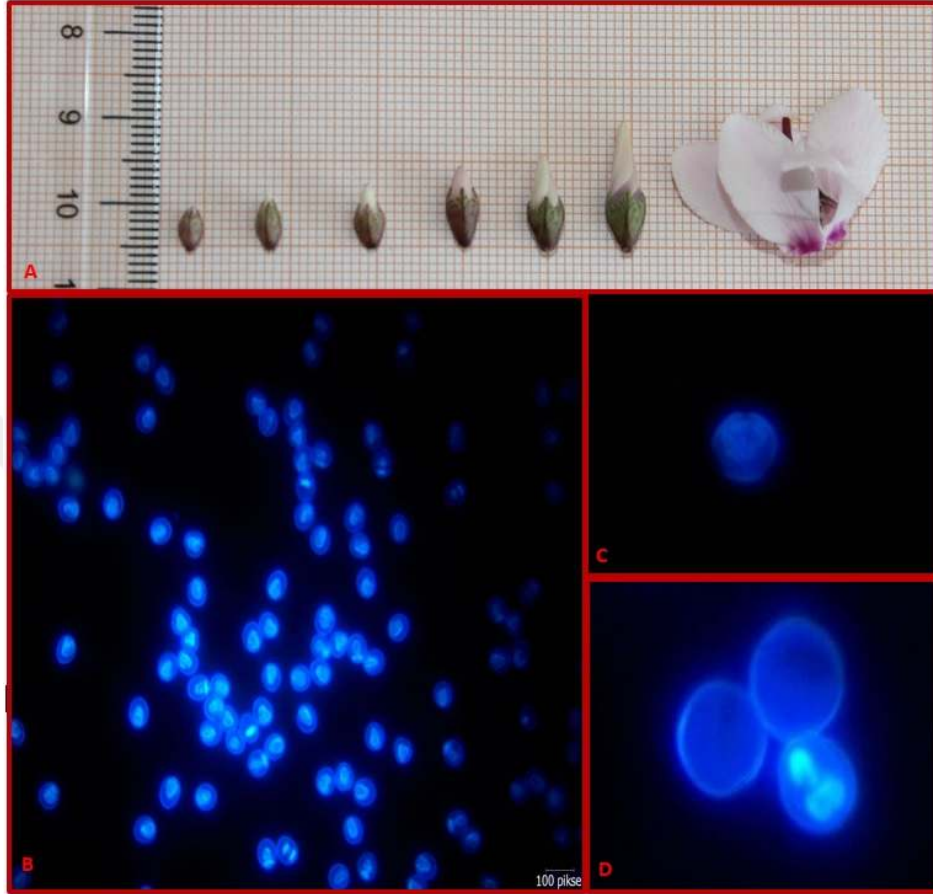
4.1. Anter Kültürü Bulguları

4.1.1. Çiçek Tomurcuklarında Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi

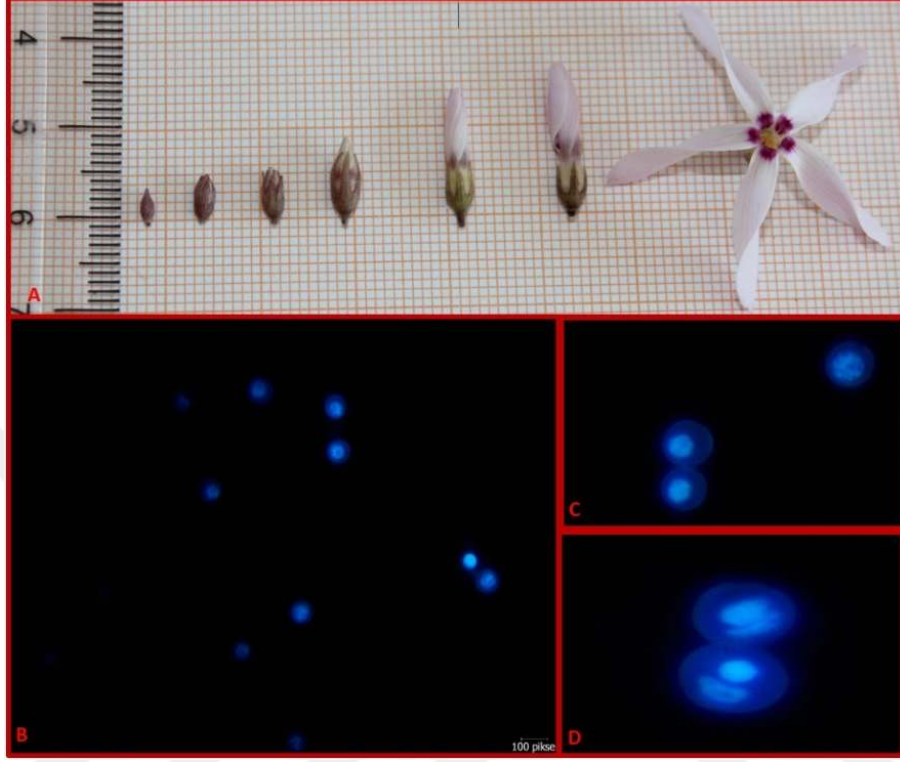
4.1.1.1. Sonbaharda Çiçeklenen Türlerde Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi

Haploidizasyon çalışmalarındaki en önemli aşamalardan biri anterlerdeki mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli evrelerinin belirlenmesidir. Tez çalışması kapsamında, tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerini içeren anterlerin bulunduğu tomurcukların morfolojik yapısı incelenmiştir. Bu evrenin belirlenmesi için farklı boylardaki tomurcuklar alınmış ve uzunluklarına göre sıralanmıştır. Farklı boydaki tomurcuklardan alınan anterlerden hazırlanan preperatlar, mikroskop altında incelenmiştir. Sonbaharda çiçek açan *C. hederifolium* türünde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) ile boyanan mikrospor hücre preperatları, florasan mikroskopta mavi renkli filtre altında incelenmiştir. 8.05-9.05 mm boya sahip olan tomurcuklardan alınan anterlerin mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir. Haploidizasyon çalışmalarında kullanılacak olan anter eksplantlarının mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli evrede olması ve çekirdeklerinin hücrenin kutuplarına doğru çekilmiş olması gerekmektedir (Geç tek çekirdekli evre). Yine anter kültürü için kullanılabilecek tomurcuklardaki mikrospor hücrelerinin erken çift çekirdekli evreye sahip olması da haploidizasyon çalışmaları için uygun evredir. *C. hederifolium* türünde çiçek tomurcuk boyu 8.05 mm'den az olan tomurcuklardan alınmış anterlerdeki mikrospor hücrelerinin erken tek çekirdekli evrede olduğu gözlenmiştir. Erken tek çekirdekli evrede mikrospor hücrelerinin çekirdekleri hücre merkezinde yer almaktadır. 9.05 mm'nin üzerindeki tomurcuklarda ise geç çift çekirdekli evreler gözlenmiştir (Şekil 4.1). Sonbaharda çiçek açan *C. cilicium* türünde ise, *C. hederifolium* türüne göre daha küçük boyuttaki tomurcuklardan alınan anterlerin ezilmesi ile elde edilmiş mikrospor preperatlarında tek çekirdekli

evre saptanmıştır. *C. cilicium* türünde haploidizasyon çalışmaları için uygun olan geç tek çekirdekli evrenin 4.74 mm ve 5.93 mm boyundaki tomurcuklarda bulunan anterlerden hazırlanan mikrospor preperatlarında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). *C. cilicium* türünde farklı boylardaki tomurcuklardan alınan örnekler incelendiğinde, 4.74 mm uzunluğundan az olan tomurcuklarda erken tek çekirdekli evre (hücre çekirdeğinin tam ortada olmasından dolayı haploidizasyon çalışmalarına uygun değil) görülmüştür. Preperatların mikroskop altında incelenmesi sonucunda, *C. cilicium* türünden elde edilen görüntülerde tomurcuk boyu 5.93 mm ve üzerinde olan tomurcuklarda geç çift çekirdekli evre saptanmıştır. Geç çift çekirdekli evrede bulunan mikrospor hücreleri haploidizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere uygun bulunmamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. *Cyclamen hederifolium* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Farklı tomurcuk boyları, 2. ve 3. tomurcuk boylarında tek çekirdekli evre (8.05 mm), B) Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin genel görünümü C) Kutuplara çekilmiş uygun geç tek çekirdekli, D) Çift çekirdekli evre



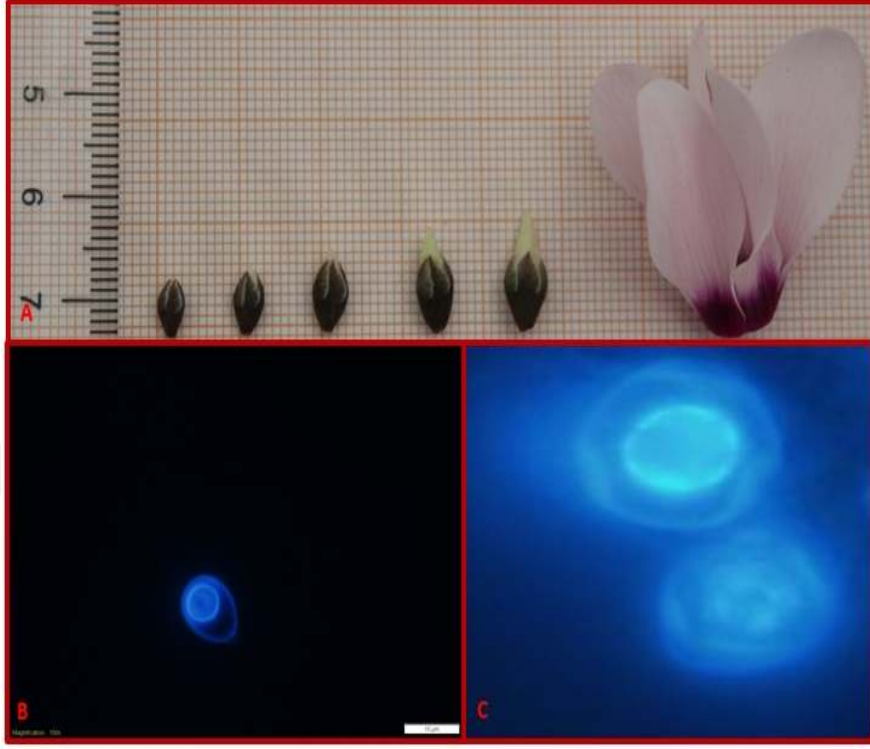
Şekil 4.2. *Cyclamen cilicium* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Farklı tomurcuk boyları, ikinci sıradaki tomurcukta tek çekirdekli evrenin gözlenmesi (4.74 mm), B) Tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin genel görünümü, C) Tek çekirdekli evrede hücre çekirdeğinin kutuplara çekilmesi, D) Çift çekirdekli evre

Tez çalışmasına benzer olarak, Prem ve ark. (2005) mikrospor kültürü için alınan farklı boylardaki tomurcuklarda tek çekirdekli evreyi yakalamak için DAPI boyama yöntemini kullanmışlardır. Prem ve ark. (2005)'nın yapmış olduğu çalışma sonucunda tomurcuk boyları ile mikrosporların gelişim evresi arasında korelasyonun olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada böyle bir korelasyon gözlenmemiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, Doi ve ark. (2010) *Gentiana* sp. anter kültürü çalışmalarında, tek çekirdekli evreyi tespit etmek için 7-15 mm uzunluğundaki tomurcuklardan alınan mikrospor hücrelerinde, DAPI boyama yöntemini kullanmışlardır.

Anter kültürü yöntemi ile haploid bitkilerin elde edilmesi için uygun tek çekirdekli evrenin 9-12 mm boyundaki tomurcuklardan alınan anter eksplantlarında bulunduğunu belirtmişlerdir.

4.1.1.2. İlkbaharda Çiçeklenen Türlerde Tek Çekirdekli Evrenin Belirlenmesi

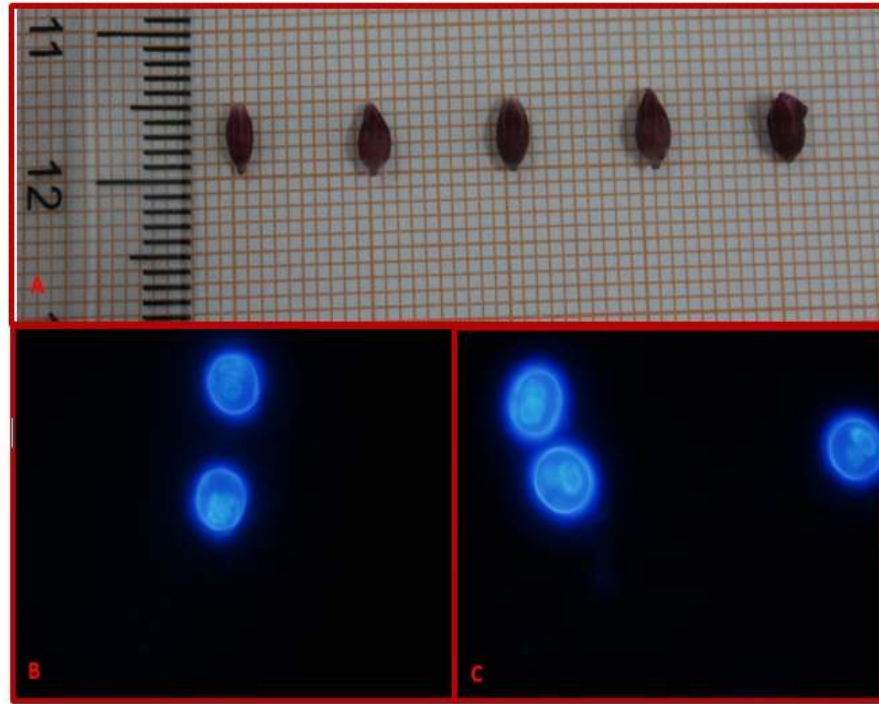
İlkbaharda çiçeklenen türlerde de DAPI ile boyama yapılmış *C. persicum* türünün tomurcuklarına florasan mikroskopta mavi renkli filtre altında bakıldığında, 6.98-7.66 mm boya sahip olan tomurcuklardan alınan anterlerin mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir. *C. persicum* türünde 6.98 mm'nin altındaki çiçek tomurcuklarından alınan örneklerde mikrospor hücrelerinin erken tek çekirdekli evrede olduğu ve çekirdeğin merkezde bulunduğu gözlenmiştir. Haploidizasyon çalışmaları için uygun olmayan geç çift çekirdekli evre ise tomurcuk boyu 7.66 mm'den uzun olan çiçek tomurcuklarında gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *C. persicum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Tek çekirdekli evrenin, üçüncü sıradaki tomurcuk boyunda gözlenmesi, B) Tek çekirdekli evrenin 6.98 mm boyundaki tomurcuklarda gözlenmesi, C) Birinci sıradaki tomurcuktan alınmış anterlerden elde edilen mikrosporda erken tek çekirdekli evrenin görüntüsü

C. coum türünde anterlerin ezilmesi ile hazırlanan mikrospor preparatlarına florasan mikroskopta mavi renkli filtre altında bakıldığında, 5.0-5.42 mm boya sahip olan tomurcuklardan alınan anterlerin mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir. *C. coum* türünde 4.90 mm'nin altındaki çiçek tomurcuklarından alınan örneklerde mikrospor hücrelerinin erken tek çekirdekli evrede olduğu ve çekirdeğin merkezde bulunduğu mikroskopik incelemelerle gözlenmiştir. Geç çift çekirdekli evre olarak bilinen ve haploidizasyon çalışmalarında kullanılması uygun olmayan tomurcuk boyları ise 6.42 mm boyutundan uzun olan tomurcuklardan hazırlanan anter preparatlarında

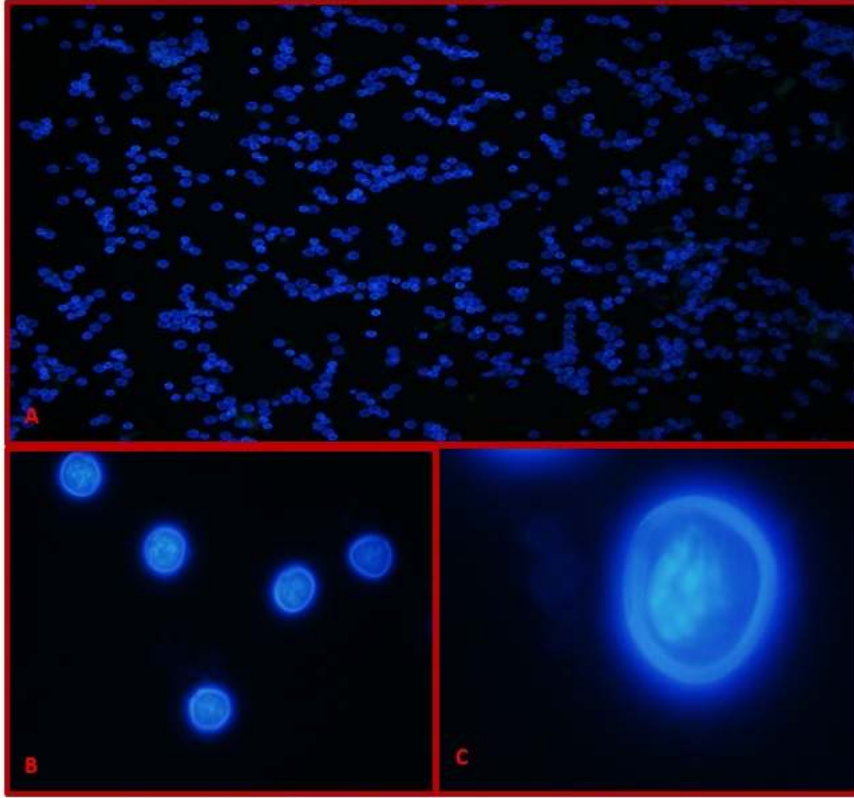
gözlenmiştir (Şekil 4.4). Ishizaka ve Uematsu, (1993) yapmış oldukları çalışmada, bu çalışmaya benzer olarak *C. persicum* türünün ticari çeşitlerinde küçük çiçekli çeşitlerde tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin 4-6 mm boyundaki tomurcuklarda, büyük çiçekli çeşitlerde ise tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerinin 5-7 mm boyundaki tomurcuklarda bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca tez çalışmasındaki bulgulara paralel olarak, *C. persicum* türünde tek çekirdekli evredeki mikrosporları bulunduran anterlerin açık sarı ve beyaza yakın renkte olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.4. *C. coum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A)Anter kültürü için belirlenen 5-5.42 mm boyundaki tomurcuklar, B) Haploidzasyon için uygun olan tek çekirdekli evre, C) Geç çift çekirdekli evre

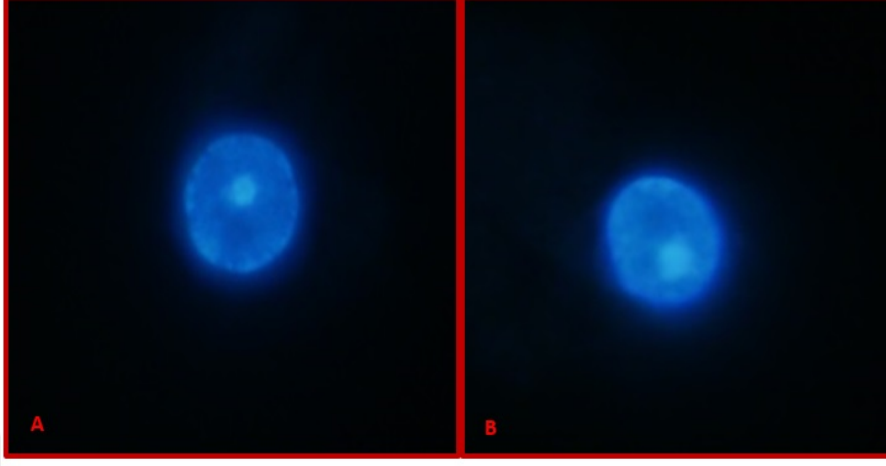
C. pseudibericum türünde anterlerin ezilmesi ile hazırlanan mikrospor preperatları, florasen mikroskopta mavi renkli filtre altında incelenmiştir. Tek

çekirdekli evrenin 7.55-9.06 mm boya sahip olan tomurcuklarından alınan anterlerin mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir. *C. pseudibericum* türünde 7.55 mm'nin altındaki çiçek tomurcuklarından alınan örneklerde mikrospor hücrelerinin erken tek çekirdekli evrede olduğu ve çekirdeğin merkezde bulunduğu mikroskopik incelemelerle gözlenmiştir. Geç çift çekirdekli evre olarak bilinen ve haploidizasyon çalışmalarında kullanılması uygun olmayan tomurcuk boyları ise 9.06 mm boyundan uzun olan tomurcuklar olarak saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *C. pseudibericum* türünde tek çekirdekli evrenin belirlenmesi, A) Mikrospor hücrelerinin mikroskop altında görünümü (10x), B) Erken tek çekirdekli evre, C) Haploidizasyon için uygun olan tek çekirdekli evre

Melody F1 ticari çeşidinde ise androgenesis çalışmaları için uygun olan tomurcuk boyunun 7.05-7.68 mm arasında olduğu mikroskopik çalışmalar sonucunda saptanmıştır. 7.05 mm'nin altındaki çiçek tomurcuğu boyunda erken tek çekirdekli evre gözlenmiştir. 7.68 mm'nin üzerinde tomurcuk boyuna sahip olan örneklerde ise mikrospor hücrelerinin geç çift çekirdekli evrede olduğu ve haploid bitki elde etmek için kullanıma uygun olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Arı (2006), *Anemone coronaria*'da yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında mikrosporların tek çekirdekli evrelerini gözlemlemek için lakto propionik orsein, hematoksilin, etidium bromid, feulgen boyaları gibi farklı boyama teknikleri uygulamıştır. Tek çekirdekli evreyi bütün tekniklerde gözlemlemiş olsa da, bazı boyama tiplerinde görüntü almak için preperatın ısıtılması, damlatılan boya içerisine metal daldırılması gibi ek uygulamalar yapmıştır. DAPI ile yapılan boyama tekniğinde bu işlemlere ihtiyaç duyulmadan kolay bir şekilde tek çekirdekli aşamalar saptanmıştır. Arı (2006)'nın yaptığı boyama yöntemine benzer olarak, Amini (2014), *Cyclamen* türlerinde tek çekirdekli evreyi saptamak için asetokarmin ile boyama yöntemini kullanmış fakat tek çekirdekli evreyi belirlemede zorluk çekmişlerdir. Tez çalışmasında kullanılan Melody F1 ticari çeşitleri büyük çiçekli genotiplerdir. Tek çekirdekli evreye sahip mikrosporları, koyu sarı renkte olan anter eksplantlarında bulunmaktadır. Ishizaka ve Uematsu (1993) tez çalışmasındaki bulgulardan farklı olarak kullandıkları ticari çeşitlerde tek çekirdekli evredeki mikrosporların beyaz ve açık sarı renkteki anterlerde bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca ticari çeşitlerde tek çekirdekli evredeki mikrosporların, bu çalışmadaki tomurcuk boylarına benzer olarak 5-7 mm'deki tomurcuklardan elde edildiğini belirtmişlerdir.

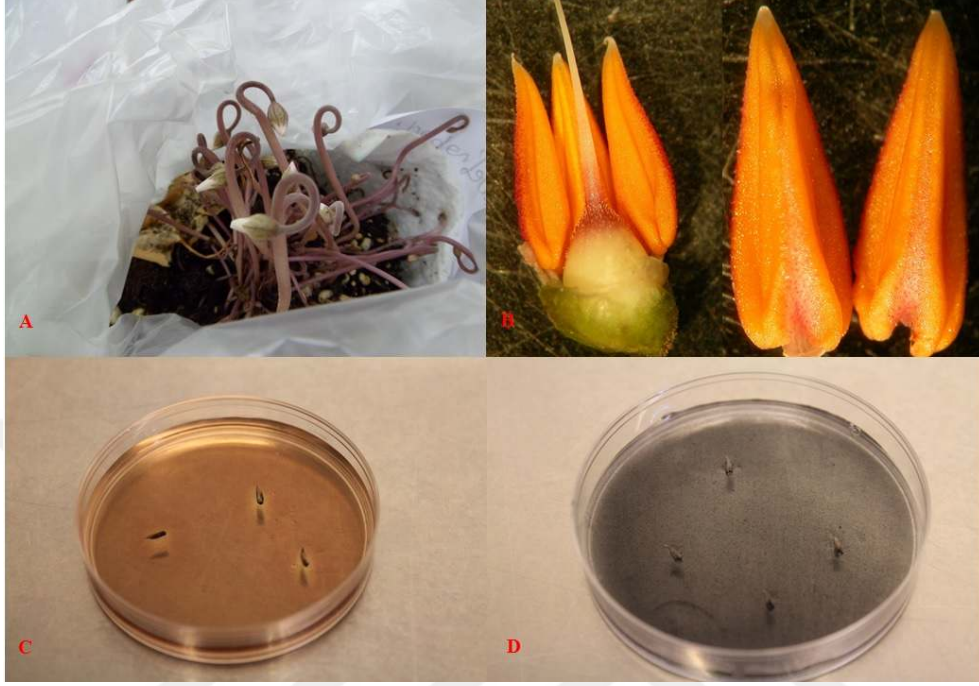


Şekil 4.6. Melody F1 ticari çeşidinde tek çekirdekli evre, A) Erken tek çekirdekli evre, B) 7.05 mm boyundaki tomurcuklardan alınmış anterlerin mikrospor hücrelerinde tek çekirdekli evre

Haploidizasyon protokolleri geliştirilmiş patlıcan, biber, kavun gibi türlerde tomurcuk boyunun belirlenmesinde morfolojik kriterlerden yararlanılmaktadır. Başay ve Ellialtıoğlu (2013), patlıcanda yapmış oldukları anter kültürü çalışmasında tek çekirdekli evredeki mikrosporları bulunduran tomurcukların anterlerinin yeşilimsi sarı renkte ve tomurcuklarda petallerin oluşmamış olduğunu belirtmişlerdir. *Cyclamen* türlerinde ise bu yönde bir bulguya rastlanmamıştır. Haploidizasyon çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktör tek çekirdekli evrenin doğru belirlenmesidir. Ayrıca anterlerin içerisindeki tek çekirdekli evrede bulunan mikrospor hücrelerinin sayısının haploidizasyonda başarıyı arttırdığı bilinmektedir. Supena ve ark. (2006), anter kültüründe başarı oranının yüksek olmasında anterlerin %50 oranında geç tek çekirdekli evrede bulunan mikrosporları içermesi gerektiğini belirtmiştir.

4.1.2. İlkbaharda Çiçeklenen *Cyclamen* Türlerinde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

Kültürel bakım işlemleri yapılan türlerde meydana gelen çiçek tomurcukları toplanmıştır. İlkbaharda çiçek açan *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum* türlerinde ve Melody F1 ticari çeşidinde tek çekirdekli evredeki tomurcuklar belirlendikten sonra tomurcuklara 2 gün boyunca +4°C’de soğuk uygulaması yapılmıştır. Anter kültüründe başarıyı artıran en önemli etkenlerden bir tanesi de ön uygulamalardır. Soğuk uygulaması anter kültürü ile haploid bitki elde etme açısından en etkili yöntem olarak bilinmektedir. Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklara yüzey sterilizasyonu uygulanmış ve steril kabin içerisinde tomurcukların çanak yaprakları ve taç yaprakları çıkarıldıktan sonra anterlere ulaştırılmıştır. Anter eksplantları, materyal metotta belirtilen deneme desenine göre Gambourg B5 besi yerinde, 25°C’de karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Anter kültüründe eksplantlar üzerinde gelişim gözlenmeden alt kültür işlemleri gerçekleştirilmemiştir. Androgenesis çalışmalarında başarıyı etkileyen diğer faktörler ise besi yerinin bileşimi ve yapısıdır. Anter kültüründe uygulanan AgNO₃ ve aktif karbon uygulamalarının türlere göre değişmekle birlikte, haploid bitki elde etme üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. *Cyclamen* türlerinde anter kültürü denemelerinde soğuk uygulaması, aktif karbon ve AgNO₃ uygulamaları denenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Anter kültürü denemeleri A) Çiçek tomurcuklarının meydana gelmesi ve farklı boylardaki çiçek tomurcukları, B) Tek çekirdekli evresi belirlenmiş olan mikrospor hücrelerini bulunduran ve başlangıç materyali olarak kullanılan anter eksplantları, C) Anter kültüründe gümüş nitrat (AgNO_3), D) Anter kültüründe aktif karbon uygulamaları

4.1.2.1. İlkbaharda Çiçeklenen *C. persicum* Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

Çukurova Üniversitesi kampüs alanından toplanarak, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümü süs bitkileri serasında 1:1 oranında torf: perlit karışımı içeren seralarda kültüre alınan *C. persicum* bitkilerinde kültürel bakım işlemleri uygulandıktan sonra farklı boylardaki tomurcuklar alınmıştır. Tek çekirdekli mikrospor hücreleri 6.98 mm uzunluğundaki tomurcuklardan alınan anter eksplantlarında gözlenmiştir. Farklı saksılarda bulunan *C. persicum* türlerinde, belirlenen boydaki tomurcuklar alınmıştır. Her saksı farklı numaralandırılmış ve her bitkiden toplanan tomurcuklar saksı numaralarına göre gruplandırılmıştır. Tomurcuklara buzdolabında 2 gün süre ile $+4^\circ\text{C}$ soğuk

uygulaması yapılmıştır. Anterlerin dorsal kısmı besi yerine temas ettirilerek deneme deseninde belirtilen şekilde NAA, aktif karbon ve gümüş nitrat içeren B5 besi yerinde kültüre alınmışlardır (Şekil 4.8). *C. persicum*'un birinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda eksplantlarda bir gelişme gözlenmemiştir. Aktif karbon ve gümüş nitrat içeren B5 besi yerinde eksplantların karardıkları görülmüştür. Kararan anter eksplantları, 24 hafta boyunca kültür ortamında tutulmuş ve gelişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.8. *C. persicum* türünde birinci dönem anter kültürü, A) Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış çiçek tomurcuğu, B) AgNO_3 içeren besi yerinde kültüre alınan anter eksplantları, C) Birinci alt kültür sonrası anterlerin görüntüsü

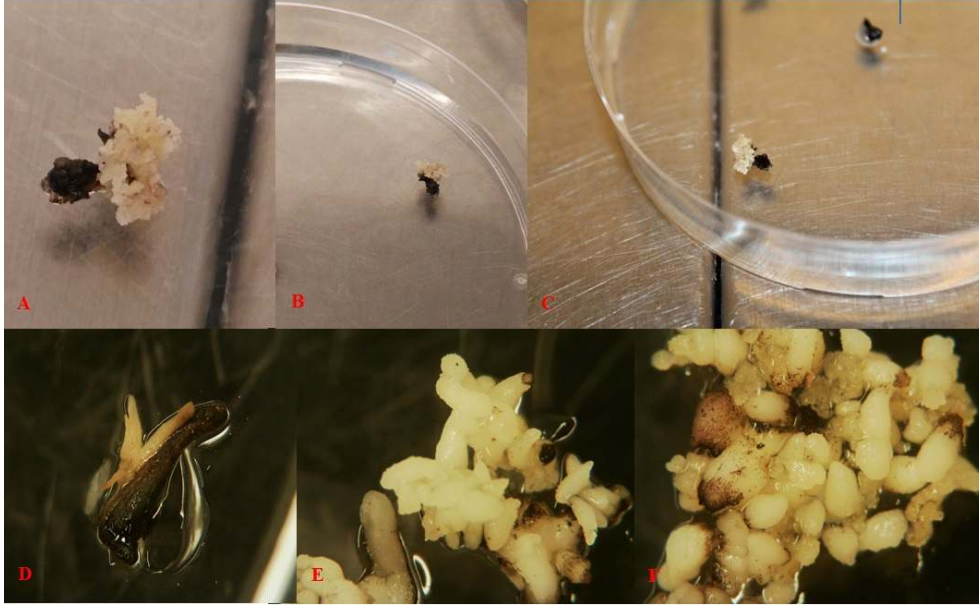
Cyclamen persicum türünde ilk dönem sonunda kültüre alınan eksplantlarda farklı uygulamalar yapılsa da, gelişme gözlenmemesinin nedeninin donör bitkilerin kültürel şartları ve genotip etkisi olduğu düşünülmektedir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli etmenlerden birisi de eksplantların alındığı donör bitkilerdir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001). Koçak ve ark. (2014)'nın *C. persicum*

genotiplerinde yapmış oldukları somatik embriyogenesis araştırmasında, farklı genotiplerin aynı besi yerinde ve aynı inkübasyon şartlarında farklı rejenerasyon yeteneği gösterdiği belirtilmiştir. Kallus ve embriyo oluşumlarının genotiplere ve eksplant tiplerine göre farklılık gösterdikleri saptanmıştır. Bu çalışmada da anterlerin alındığı bitkilerin genotipik özelliklerinden dolayı başarı sağlanamadığı düşünülmektedir.

4.1.2.2. *C. persicum* türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Deneme Bulguları

C. persicum türünde ikinci dönem anter kültürü denemelerinin kurulmasında, birinci dönem anter kültürü için belirlenen tomurcuk boyları ile aynı boydaki çiçek tomurcukları kullanılmıştır. *C. persicum* türünde birinci dönem anter kültürü bulgularından farklı olarak, ikinci dönem anter kültürü denemelerinde anterlerde ilk 4 haftalık kültür süresinde şişme gözlenmiştir. Anterlerin 6. haftada uçlarından ve ortalarından anter duvarının yarıldığı ve mikrospor hücrelerinden direkt embriyojenik yapıların meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.9). Embriyojenik yapıların en iyi 5 µM NAA içeren B5 besi yerinde (%100) geliştiği saptanmıştır. Bu besi yerini 3 µM NAA (%48) ve 1 µM NAA (%38) içeren B5 besi yerlerinin takip ettiği gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Aktif karbon ve AgNO₃ içeren besi yerlerinde gelişme gözlenmemiştir. Aktif karbon, NAA ve gümüş nitrat kombinasyonlarını içeren B5 besi yerinde kültüre alınan anterler kararmış ve canlılıklarını kaybetmişlerdir. Deneme deseninde belirtilen 36 farklı besi yeri kombinasyonlarının yalnızca 3 tanesinde gelişim gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Kültüre alınan embriyolarda en fazla bitkiye dönüşüm, 5 µM NAA içeren B5 besi yerinde kültüre alınan anter eksplantlarından elde edilen embriyolarda meydana gelmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan çalışmaya benzer olarak, Ishizaka ve Uematsu (1993) *C. persicum* türünde anter kültürü denemeleri sonucu embriyo gelişiminin en etkili olduğu besi yerinin %9 ile B5 ve N6 besi yerlerinde olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, *C. persicum* türünde 2 gün süre ile +5 °C soğuk uygulamasının embriyo uyartımına olumlu etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Tez

çalışmasında, *C. persicum* türünde anter kültürü denemeleri için tomurcuklara her iki dönemde de +4 °C soğuk uygulaması yapılmıştır. Birinci dönemde hiçbir gelişme gözlenmemişken, ikinci dönem embriyo oluşumlarının meydana geldiği gözlenmiştir. Anter kültürü denemelerinde etilen sentezini engelleyici olarak %0.1 ve %0.3'lük AgNO_3 kullanılmıştır. Siklamen türlerinin anter kültürü denemelerinde, gümüş nitratin etkisinin olmadığı istatistiksel analizler sonucu belirlenmiştir. Farklı türlerde gümüş nitratin anter kültüründe etilen sentezini engelleyerek anterlerden haploid embriyo oluşumu üzerine önemli etkileri olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmasından farklı olarak Tiainen (1991) *Solanum tuberosum* L. türünde %0.015 mM ve %0.059 mM AgNO_3 kullanımının anterlerde embriyo gelişimini olumlu etkilediğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.9. *C. persicum* türünde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen yapılar, A) 5µM NAA içeren B5 besi yerinde anter duvarını yırtan embriyoların çıkışı, B-C) 5µM NAA içeren B5 besi yerinde meydana gelen embriyolar, D) Anter duvarının kenarından çıkan torpedo şeklinde embriyo, E) Farklı aşamalarındaki haploid embriyolar F) Torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyolar

Meydana gelen embriyolar, olgunlaşmaları ve çimlenmeleri için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besi yerinde, aydınlık ortamda büyütme odasında kültüre alınmıştır. Embriyolar hormonsuz B5 ortamında kültüre alınırken, anter duvarları ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Mikroskop altında yapılan incelemeler sonucunda, anterlerden elde edilen embriyoların somatik embriyolara göre morfolojik olarak farklı oldukları saptanmıştır. Anterlerden elde edilen haploid embriyoların gelişim evrelerinin somatik embriyolara göre morfolojik olarak farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.9). Embriyolar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besi yerinde olgunlaşmamıştır. Globular ve torpedo evresinde tutuklu kalan embriyolara olgunlaşması ve çimlenmesi için farklı uygulamalar yapılmıştır (Şekil 4.9).

Embriyoların olgunlaştırılması için farklı denemeler kurulmuştur. Birinci denemede, embriyolar, 1 mg/l ABA içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Embriyolar, 4 hafta sonra da alt kültüre alınmışlardır, fakat 8 haftalık kültür sonucunda gelişme gözlenmemiştir. ABA'nın embriyogenesis çalışmalarında embriyoların olgunlaşması için kullanıldığı bilinmektedir. Tez çalışmasında ise ABA'nın embriyoların olgunlaşması için olumlu etki yapmadığı gözlenmiştir. Daha sonra embriyoların çimlendirilmesi için GA₃, BA, prolin ve spermin içeren MS besi yerinde diğer denemeler kurulmuştur. Çimlendirme denemeleri, Çizelge 4.2'de belirtilmiştir. Kurulan çimlendirme denemeleri sonucunda, embriyolar yalnızca 0.2 mg/l GA₃ +0.1 mg/l BA+1 g/l prolin + 0.05 mg/l içeren MS besi yerinde çimlenme ve gelişme göstermiştir. Winkelmann ve ark. (2015) *C. persicum* türünde yapmış oldukları çalışmada somatik ve zigotik embriyolarda gelişimi etkileyen metabolitlerin oranlarını ortaya çıkarmışlardır. Normal gelişim gösteren zigotik embriyolardaki prolin miktarının, torpedo aşamasındaki somatik embriyolardaki prolin miktarından 80 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Winkelman ve ark. (2015) torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyoların prolin, GABA gibi kimyasalların etkisi ile normal gelişimlerine devam edebileceklerini belirtmişlerdir. Tez çalışmasında da benzer olarak, prolin

uygulaması ile embriyoların çimlendiği ve tutuklu kalan embriyoların bitkiye dönüştüğü gözlenmiştir. Embriyolar, 4 haftada bir olacak şekilde alt kültüre alınmıştır. Embriyoların bu besi yerinde kültüre alındıktan 10 hafta sonra, bitkilerin oluştuğu gözlenmiştir. Embriyolardan elde edilen bitkilerin cılız ve kök oluşumlarının tüy şeklinde veya kök oluşumunun meydana gelmediği saptanmıştır (Şekil 4.10). Bitkilerin yapraklarında morfolojik olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Bazı embriyoların bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile kallusa dönüştüğü saptanmıştır. Kallusların da sonraki alt kültürlerde bitkiye dönüştüğü gözlenmiştir. Bitkiler daha sonra içerisinde 50 ml çimlendirme ortamı bulunduran magenta kaplarına aktarılmışlardır. Elde edilen bitkilere flow sitometri analizleri yapılarak ploidi seviyeleri belirlenmiştir. *C. persicum* türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda, 70 adet aday di-haploid bitki elde edilmiştir. Bitkilerin zayıf olması ve sağlıklı kök yapılarının meydana gelmemesinden dolayı elde edilen bitkiler dış ortama aktarılamamıştır. *C. persicum* türünde elde edilen bütün embriyolar ve bu embriyolardan meydana gelen bitkilerin, PMK5 kodlu saksıda kültüre alınan *C. persicum* genotipinden meydana geldiği gözlenmiştir. *Cyclamen* türlerinde yapılan çalışmalara benzer olarak bu tez çalışmasında da genotip etkisinin anter kültüründe de önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Takamura ve ark. (2011) 5 farklı *Cyclamen persicum* genotipinde anter kültüründe en iyi sonuç veren karbon kaynağını belirlemek için yapmış oldukları çalışmada, sükroz, maltoz, früktoz ve glukozu karbon kaynağı olarak kullanmışlar ve en etkili karbon kaynağını 394.4 mM maltoz olarak belirlemişlerdir. Bu çalışma kapsamında anter kültürü denemelerinde benzer olarak maltozun, *Cyclamen persicum* türünde karbon kaynağı olarak başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Ishizaka ve Umatsu (1993) ise *Cyclamen persicum* türünde anter kültürü yönteminde en olumlu sonuç veren karbon kaynağını, 90 g/l sükroz olarak belirtmişlerdir. Farklı türlerde yapılan çalışmalara bakıldığında karbon kaynağı ve miktarları büyük farklılıklar göstermektedir. Anter kültürü çalışmalarında besi yerine ilave edilen yüksek oranda karbon kaynağının, diploid yapıların gelişmesini

engellediği ve haploid yapıların gelişmesini teşvik ettiği belirtilmiştir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001). Yapılan çalışmalarda kullanılan yüksek karbon kaynağının aksine, Arı (2006) *A. coronaria* bitkisinde anter kültürü denemelerinde karbon kaynağı olarak 20 g/l sükroz kullanmış ve haploid bitki elde edememiştir.

Çizelge 4.1. *C. persicum* ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen embriyo ve bitki gelişim oranları

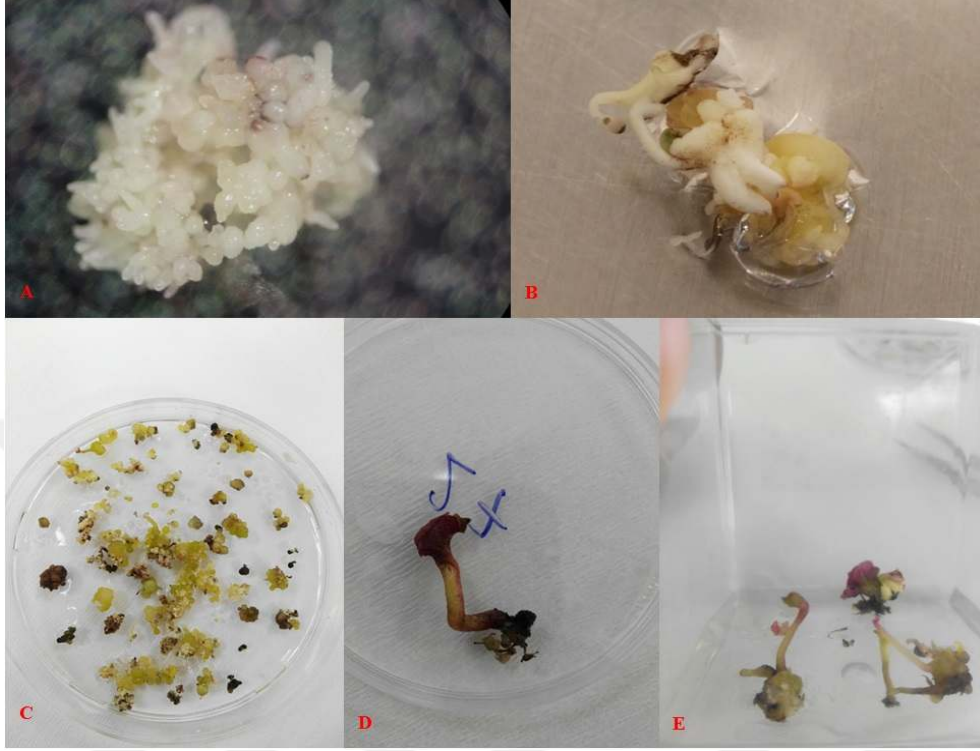
Uygulama	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)
5 µM NAA	100a (90.00)	58.33a (50.01)
3 µM NAA	44b (38.89)	20.83b (23.44)
1 µM NAA	38.58b (35.68)	5.83c (7.07)

LSD_{embriyo} = 16.05 LSD_{Bitki} = 12.39 (p < 0.01)

Parantez içerisinde belirtilen değerler yüzde değerlerin açılı transformasyonu uygulanmış halidir. Tablodaki farklı harfler farklı değerleri göstermektedir.

Çizelge 4.2. *C. persicum* türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda elde edilen embriyoların çimlendirme denemeleri

GA (mg/l)	BA (mg/l)	Prolin (g/l)	Spermin (mg/l)	MS (g/l)	Sükroz (g/l)	Gelrite (g/l)
0.1	-	-	-	4.4	30	3.5
0.1	0.1	-	-	4.4	30	3.5
0.1	0.2	-	-	4.4	30	3.5
0.2	-	-	-	4.4	30	3.5
0.2	0.1	1	0.05	4.4	30	3.5



Şekil 4.10. *C. persicum* türünde anter kültürü sonucu elde edilen yapılar, A) Anterlerin duvarlarını yırtarak çıkan haploid embriyolar, B) Torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyoların kotiledon oluşturmaya başlaması, C) Çimlendirme ortamında embriyoların yeşil renk alması ve bazı embriyoların kallusa dönüşümü, D-E) Haploid embriyolardan elde edilen bitkiler

4.1.2.3. *C. persicum* Türünde Anter Kültürü Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitkilerin Flow Sitometri Bulguları

C. persicum türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucu elde edilen embriyolar ve bu embriyolardan gelişen bitkiler seçilmiş, bir magenta içerisinde numaralandırılarak doku kültüründe kültüre alındıkları besi yerlerinden çıkarılmadan Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü sitogenetik laboratuvarına götürülmüştür. Embriyolar, embriyolardan meydana gelmiş kalluslar ve aynı embriyolardan meydana gelmiş olan bitkilerden alınan

örneklerin flow sitometri ile ploidi seviyelerine bakılmıştır. Kontrol bitkisi olarak da anterlerin alındığı PMK-5 kodlu saksıda yetiştirilen ve *C. persicum* türünden alınan yaprak örneği kullanılmıştır (Şekil 4.11). Standart olarak genom ağırlığı 10.65 olan arpa bitkisi kullanılmıştır. Yapılan flow sitometri analizlerinden sonra *C. persicum* türünde anter kültürü denemeleri sonucunda elde edilen embriyoların ve bu embriyoların bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi ile oluşturduğu kallus benzeri yapıların haploid yapıda olduğu saptanmıştır. Bu embriyo ve kallus yapılarından elde edilen bitkilerin ise flow sitometri analizleri sonucunda diploid olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12).

Yapılan analizler sonucunda elde edilen embriyoların ve bitkilerin flow sitometri analizleri değerlendirildiğinde, embriyoların haploid, bu embriyolardan elde edilen bitkilerin diploid olması *Cyclamen persicum* türünde spontan di-haploid oluşumunun olabileceğini göstermektedir. *C. persicum* türünde ovül ve anter kültürü denemeleri aynı zamanda başlamıştır. Ovül kültüründe elde edilen bitkiler sağlıklı yapıda olup seralara aktarılmıştır. Anter kültüründen elde edilen bitkiler ise zayıf ve kök yapıları sağlıklı gelişme göstermediği için *in vitro* şartlarda magentaların içerisinde kültüre alınmaktadır. Bu durum *C. persicum* türünde elde edilen bitkilerde spontan katlama olabileceği önemli bir bulgudur. Tez çalışmasındaki bulgulara benzer olarak, Ishizaka (1998) yapmış olduğu çalışmada *C. persicum* ve *C. purpurascens* melezlerinden elde ettiği F1'lerin mikrosporlarından bitki elde etmek için tek çekirdekli aşamadaki mikrosporları B5 besi yerinde kültüre almışlardır. Kültüre alınan embriyolarda spontan katlama meydana geldiğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.11. Flow sitometri analizleri için örneklerin hazırlanması A) Standart bitki (Arpa) ile *C. persicum* yaprak örnekleri 1'e 2 oranında alınması B) Ekstrakte edilmiş ve DAPI solüsyonu ilave edilmiş örnekler

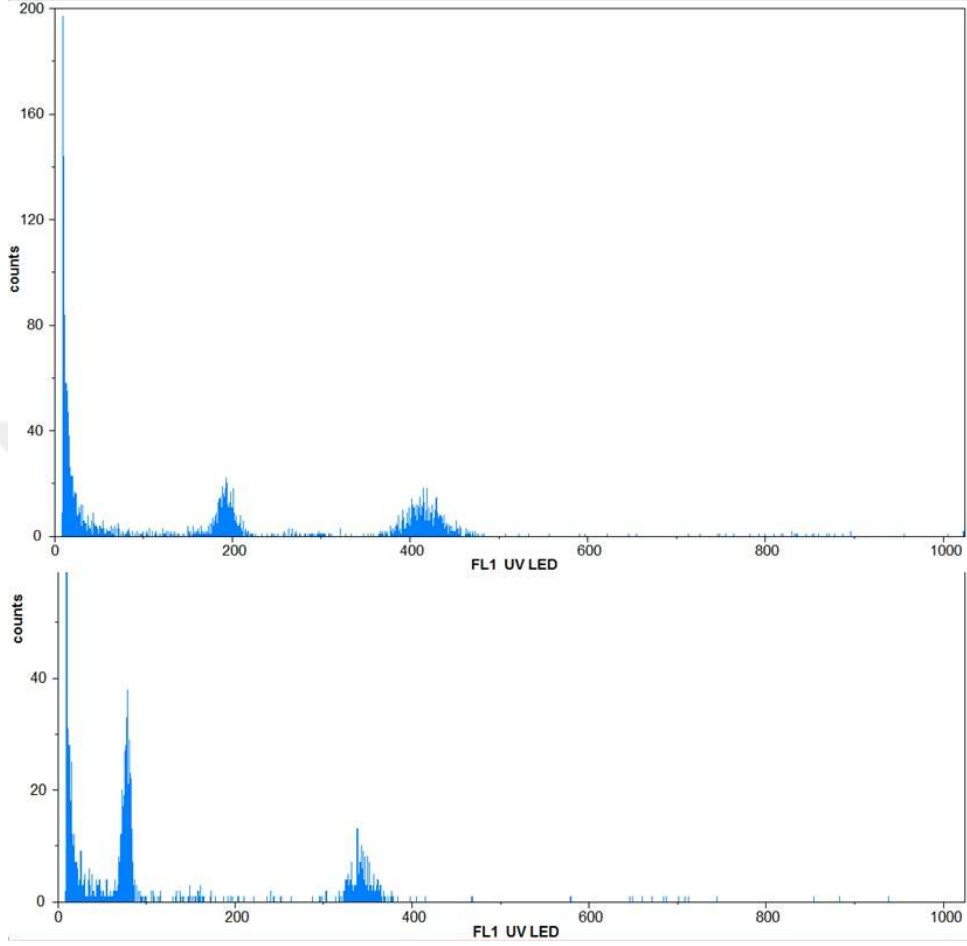
Sebzelerde yapılmış olan diğer çalışmalara bakıldığında, anter kültürü tekniği ile haploid bitki elde etmeye yönelik yapılan çalışmalar patlıcan, biber, lahana ve kabakgiller üzerinde yoğunlaşmaktadır. Keleş ve ark. (2015), bazı biber çeşitlerinde haploid bitki elde etmek amacıyla yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında, elde ettikleri bitkilerin çeşitlere ve genotiplere göre değişmekle birlikte farklı oranlarda spontan haploid bitkiler olduklarını belirtmişlerdir. Özellikle dolma biberlerden alınan anterlerden gelişen bitkilerin kromozomlarında %53.4 oranında spontan katlama olduğunu saptamışlardır. Ayrıca SSR marker yöntemi kullanarak elde edilen dihaploid bitkilerin spontan katlanma sonucu oluştuklarını kanıtlamışlardır. Tez çalışması kapsamında flow sitometri analizleri sonucu haploid olduğu belirlenen embriyolardan elde edilen bitkilerin dihaploid olduğu belirlenmiştir, fakat bu bulgunun uygun moleküler marker yöntemleri ile doğrulanması gerekmektedir. *Cyclamen* türlerinde kodominant marker sistemlerinin geliştirilememiş olması elde edilen dihaploid olduğu flow sitometri analizleri sonucu ortaya konulmuş olan bitkilerin doğrulanmasını zorlaştırmaktadır. Biber çeşitlerinde kromozomların spontan katlanması ile ilgili birçok yayın

bulunmaktadır. Biber çeşitlerinde yapılan çalışmalarda; Gemesne Juhasz ve ark. (2003) %29.8 oranında, Gu ve ark. (1983), Niklas Nowak (2012) %46, Al Remi (2013) %6, Olszewska ve ark. (2014) genotiplere göre değişmekle birlikte kromozomların spontan olarak katlandığını saptamışlardır. *Cyclamen* türlerinde ise çalışmalar yalnızca *C. persicum* türünün ticari çeşitleri ile sınırlı kalmıştır. Tez çalışması kapsamında ise *Cyclamen* türlerinde yapılan çalışmalardan farklı olarak doğal olarak yetişen ve şu anda süs bitkisi sektöründe kullanılan ticari çeşitlerin atası olarak bilinen *C. persicum* türünde elde edilen embriyoların, spontan katlanma sonucu dihaploid bitkiler oluşturduğu gözlenmiştir. Fakat yapılan bu çalışmada elde edilen bitkilerin dihaploid olduğunun moleküler çalışmalar ile de doğrulanması gerekmektedir. Keleş ve ark. (2016) ıspanakta haploid bitkiler elde etmek için yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında sonuç elde edememişlerdir. Fakat ıspanakta ışınlanmış polen tekniği ile spontan dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri bitkilerin SSR markır yöntemi ile doğrulamasını yapmışlardır. Ispanak türünde ışınlanmış polen tekniği kullanılarak yaptıkları çalışmada, elde ettikleri bitkilerde kromozomların spontan olarak katlandıklarını belirtmişlerdir. Biberde anter kültürü üzerine yapılan çalışmalarda mevsim etkisinin, mikrospor ve anter kültürüne etkileri araştırılmıştır (Ata, 2011). Bu tez çalışmasında doğal *Cyclamen* türleri ile çalışıldığından dolayı bitkiler ya ilkbahar ya da sonbaharda olacak şekilde çiçek açma dönemlerine göre alınmıştır. Fakat kültür bitkisi olan ticari F1 Melody çeşitlerinde çiçeklenme dönemi uzun sürmektedir. Dolayısıyla Melody F1 ticari çeşidinde farklı dönemlerde alınan anterlerde mevsim etkisinin incelenmesi, anter kültürü denemeleri için önemli sonuçlar ortaya çıkartabilir.

Anter kültürü, haploidizasyon çalışmalarında kullanılan önemli bir tekniktir. Özellikle tek yıllık bahçe bitkilerinin ıslahında saf hatların elde edilmesi ve ıslah süresinin kısaltılmasında büyük avanyajlar sağlamaktadır.

Haploidizasyon yönteminin en çok kullanıldığı familyaların başında Cucurbitacea familyası gelmektedir. Cucurbitaceae familyasında anter kültürü, hıyar, kabak ve karpuz türlerinde denenmiş fakat etkili bir sonuç alınamamıştır. Kabakgiller familyasında yapılan anter kültüründe, türlere göre değişmekle birlikte 2-4 gün süre ile uygulanan +4°C soğuk uygulamaları ve 22-32°C sıcak şoklarının etkili olduğu belirtilmiştir. Hıyar’da yapılan çalışmalarda, bitki büyüme düzenleyicileri olarak 2,4-D, BAP ve Kinetin kullanılmıştır (Kumar ve ark., 2003, 2004; Kumar ve Murthy, 2004; Song ve ark., 2007; Xie ve ark., 2005, Suprunova ve Shymkova, 2008; Zhan ve ark., 2009; Hamidvand, 2013). Hıyar’da anter kültüründe B5 besi yeri (Kumar ve ark., 2003, 2004; Xie ve ark., 2005), MS besi yeri (Hamidvand, 2013; Suprunova ve Shymkova, 2008), NLN besi yeri (Zhan ve ark., 2009; Suprunova ve Shymkova, 2008) kullanmışlardır. Kabakta yapılan anter kültürü çalışmalarında ise +4 °C soğuk uygulamaları ve 32-35 °C sıcak şokları uygulanarak anterler kültüre alınmıştır. Shalaby (2006) 5 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde kültüre aldıkları anterlerden meydana gelen embriyolardan haploid bitkiler elde etmişlerdir. Metwally ve ark. (1998) benzer olarak 5 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde haploid bitkileri elde etmişlerdir. Muhammed ve Rafei (2004) 5 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde kabaklarda haploid bitkiler elde etmişlerdir. Karpuzda ise Xue ve ark. (1983, 1988) yapmış oldukları çalışma ile haploid bitkilerin, BA+K₂ ppm içeren MS besi yerinde meydana geldiklerini belirlemişlerdir. Abdullahi ve ark. (2015) karpuzda haploid bitki oluşumunda etkili besi yerinin, 3 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besi yeri olduğunu saptamışlardır. Tulukoğlu (2014) ise karpuzda anter kültüründe 2,4-D içeren MS besi yerinde farklı TDZ uygulamalarının anter kültürüne etkilerini incelemiş, fakat yalnızca kallus oluşumlarının meydana geldiğini saptamıştır. Kabakgillerde yapılan anter kültürü çalışmalarında karbon kaynağı olarak düşük oranda süktroz kullanılmıştır. Bu çalışmada ise karbon kaynağı olarak yüksek oranda maltozun anter kültüründe iyi sonuç verdiği saptanmıştır.

Bu çalışmada yapılan flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen embriyoların haploid, bitkilerin diploid olması spontan katlanma olduğunun bir göstergesi olsa da, siklamen türlerinde spontan katlanma mekanizması halen netliğe kavuşmamıştır(Şekil 4.12). Haploid bitkilerin katlanmasında ve yeniden verimli (fertil) hale geçmesinde hücre içerisindeki mikrotübülajların rol aldığı bilinmektedir. Spontan katlanmanın meydana gelmesinde rol oynayan olaylar endomitoz, endoreduplikasyon, C-mitoz ve nükleer füzyon olarak belirtilmiştir. Haploidizasyonda spontan katlanma olayında en önemli etken nükleer füzyon olayıdır. Nükleer füzyon olayının haploid hücrelerin hücre duvarlarının meydana gelmesi aşamasında, hücre duvarlarının oluşumundaki gecikmeden kaynaklanan hücre çekirdeklerinin birleşmesi sonucunda meydana geldiği belirtilmiştir. (Badu ve ark., 2017). Siklamen türlerinde ise spontan katlanma olayının nedeninin araştırılması ve net bir bilgiye ulaşılması, yapılacak olan ıslah çalışmalarında önemli yol gösterici olacaktır.



Şekil 4.12. Flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen grafikler, birinci grafik diploid kontrol grubu olarak kullanılan *C. persicum* türünden elde edilen grafik, altta belirtilen haploid embriyolardan elde edilmiş grafik

4.1.2.4. İlkbaharda Çiçeklenen *C. pseudibericum* Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. pseudibericum türünde bitkilere kültürel bakım işlemleri uygulandıktan sonra farklı boylardaki tomurcuklar alınmıştır. Tomurcuklarda tek çekirdekli mikrosporlara sahip olan anterlerin 7.55 mm uzunluğundaki tomurcuklarda olduğu saptanmıştır. *C. pseudibericum* türünde birinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda, hiçbir eksplantta gelişme gözlemlenmemiştir. Bu türde de anter

eksplantları kararmış ve canlılıklarını yitirmişlerdir. *C. pseudibericum* türü endemik tür olup, doku kültürü çalışmaları kapsamında rejenerasyon yetenekleri oldukça düşüktür. İzgü ve ark. (2016), *C. pseudibericum* türünde yapmış oldukları çalışmada farklı eksplant tiplerini, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve 2iP içeren MS besi yerinde kültüre almışlar ve en etkili eksplant kaynağı ile bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunu belirlemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada en etkili eksplant tipinin petiol, en etkili besi yerinin ise 2.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l 2iP olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu türde besi yeri ve eksplant interaksyonunun oldukça önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu tez çalışmasında ise *C. pseudibericum* türünde hiçbir gelişme gözlenmemiştir.

4.1.2.5. İlkbaharda Çiçeklenen *C. pseudibericum* Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. pseudibericum türünde birinci dönem anter kültürü sonrası vejetasyon dönemi sona eren bitkiler gelecek vejetasyon dönemine kadar saklandıktan sonra ikinci dönem anter kültürü denemeleri için saksılara alınmıştır. Tomurcukların oluşmaya başlaması ile bir önceki dönemde tek çekirdekli evresi belirlenen tomurcuklar toplanmıştır. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen anterler belirtilen deneme desenine göre B5 besi yerinde kültüre alınmıştır. İkinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda birinci dönemdeki gibi anter eksplantlarında gelişme gözlemlenmemiştir. Anterler 8 hafta sonra alt kültüre alınmışlardır. Yapılan gözlemlerde anterlerin karardığı ve canlılığını yitirdiği gözlenmiştir. *C. pseudibericum* türünde anter kültürü denemelerinde kallus, embriyo ve bitkiye dönüşüm saptanmamıştır.

4.1.2.6. İlkbaharda Çiçeklenen *C. coum* Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

Tomurcuklarda tek çekirdekli mikrosporlara sahip olan anterlerin 5-5.42 mm uzunluğundaki tomurcuklarda olduğu saptanmıştır. *C. coum* türünde diğer

türlerden farklı olarak anter eksplantlarından bir tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.13). Kallus oluşumu yalnızca 0.5 g/l aktif karbon içeren B5 besi yerinde meydana gelmiştir. Anter eksplantlarının 1. alt kültürü 8 hafta sonra gerçekleştirilmiştir. *C. coum* türünden elde edilen kallus yapıları, birinci alt kültür sonucunda kararmış ve embriyoya dönüşüm sağlanmamıştır. Elde edilen kallusların anter duvarında oluşan yara dokusundaki diploid yapılardan meydana geldiği düşünülmektedir. *C. coum* türünde kallus oluşumu gözlenmeyen eksplantlar da, 32 hafta boyunca B5 besi yerinde kültüre alınmış olsa da embriyo gelişimi ve bitkiye dönüşüm gözlemlenmemiştir.



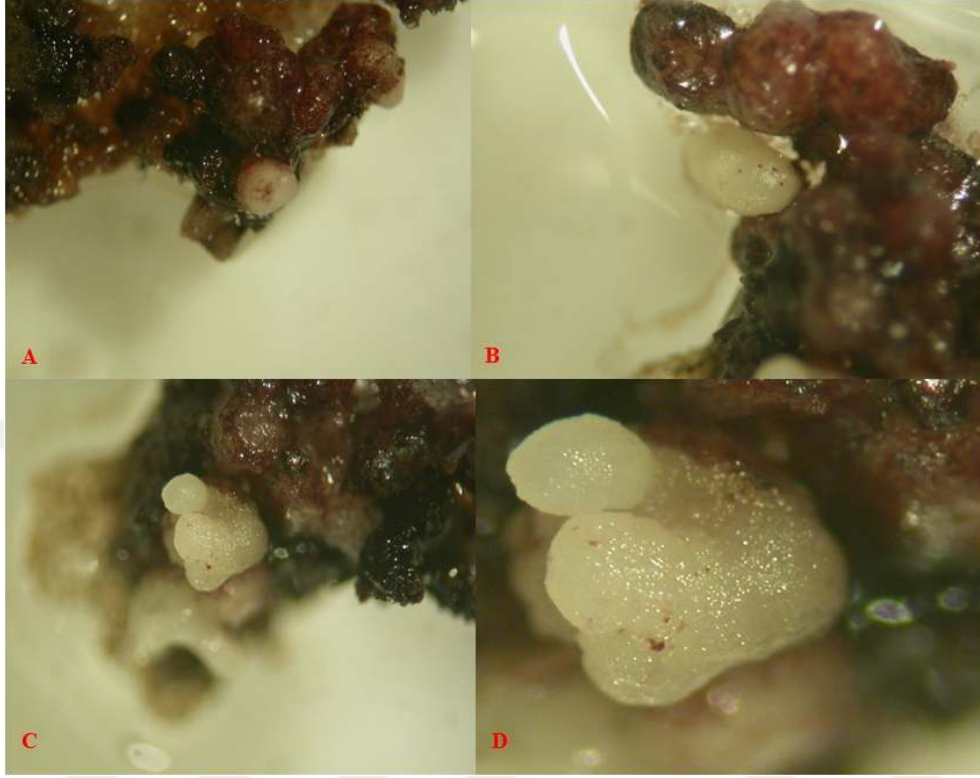
Şekil 4.13. *C. coum* türünde birinci dönem anter kültürü denemelerinde anter eksplantından meydana gelen kallus yapısı

4.1.2.7. İlkbaharda Çiçeklenen *C. coum* Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. coum türünde birinci dönem anter bulgularından farklı olarak ikinci dönem anter kültürü denemelerinde eksplantların hiçbirinde kallus oluşumu, embriyo gelişimi ve bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. Anterler 24 haftalık kültür süresi sonundan siyahlaşarak canlılıklarını yitirmişlerdir. *C. coum* türünde iki kültür döneminde meydana gelen bu farklılıkların diğer siklamen türlerinde olduğu gibi genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.2.8. İlkbaharda Çiçeklenen Melody F1 Ticari Çeşidinde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

Melody F1 ticari çeşidinde tek çekirdekli evre 7.05 boyundaki tomurcuklarda gözlenmiştir. Anter eksplantlarında ilk alt kültür, 8 hafta sonra yapılmıştır. İlk alt kültürde bazı anter eksplantlarında şişmeler gözlenmiştir. Şişme gözlenen anter eksplantlarının hepsinde gelişim gözlenmese de; NAA ve gümüş nitrat içermeyen, yalnızca 1 g/l aktif karbon içeren B5 besi yerinde kallus gelişimi ve daha sonra embriyo oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen embriyolar ve kalluslar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besi yerine aktarılmıştır. Ayrıca 0 µM NAA, 0.5 g/l aktif karbon ve %0.1 AgNO₃, 1 µM NAA, 0.5 g/l aktif karbon; %0.1 AgNO₃, 0.3 µM NAA ve 0.5 g/l aktif karbon ve %0.1 AgNO₃, 5 µM NAA içeren B5 besi yerlerinde kallus oluşumları gözlenmiştir. Bu besi yerlerinde gelişme göstermeyen kallus yapıları, 8 hafta sonrasında alt kültüre alındıktan sonra kararmıştır. Kararan kallus yapıları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besin ortamında kültüre alınmış, fakat hiçbir gelişme gözlenmemiştir. Deneme deseninde belirtilen diğer konsantrasyonlarda ise anterler siyahlaşmış ve aynı şekilde hiçbir gelişim saptanmamıştır.

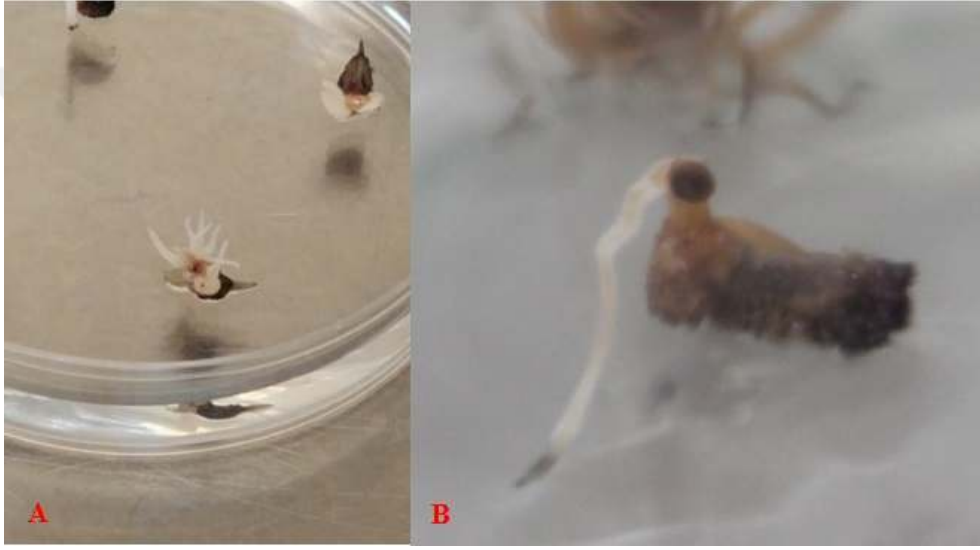


Şekil 4.14. Melody F1 ticari çeşidinde birinci dönem anter kültürü sonrası meydana gelen yapılar, A-B) Anter duvarlarında meydana gelen kalluslardan oluşmaya başlayan globular embriyolar, C-D) Globular embriyoların olgunlaşmaya başlaması ve meydana gelen kalp şeklinde embriyolar

4.1.2.9. İlkbaharda Çiçeklenen Melody F1 Ticari Çeşidinde Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

İkinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda Melody F1 ticari çeşidinde, 1, 3, 5 μM NAA içeren B5 besi yerinde kallus oluşumları gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Ayrıca %0.1 AgNO_3 + 1 μM içeren B5 besi yerinde de, kallus ve sürgün veya kök benzeri yapılar gözlenmiştir (Şekil 4.15). Kallusların, filamentlerin anterlerden ayrıldığı noktalardan meydana geldiği belirlenmiştir. Oluşan kallus ve embriyo benzeri yapıların, filamentler ayrılırken anter duvarının zarar görmesi ile oluşan diploid dokulardan meydana geldiği düşünülmektedir. Melody F1 ticari çeşidinde anter kültürü denemeleri sonucunda elde edilen yapılar

daha sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslardan sürgün benzeri yapılar elde edilmesine rağmen, bu yapılar alt kültür sonucunda canlılığını yitirerek kararmıştır. Melody F1 ticari çeşidinde meydana gelen kallus yapıları istatistiksel açıdan önem seviyesine göre farklılıklar gösterebilir sürgün benzeri yapıların gelişimleri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.15. Melody F1 ticari çeşidinde ikinci dönem anter kültürü sonucu meydana gelen yapılar, A-B) Anter duvarlarının zarar görmesi sonucunda filamentlerin anter duvarlarına bağlandığı yerde meydana gelen sürgün benzeri yapılar

Çizelge 4.3. Melody F1 ticari çeşidinde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde elde edilen kallus yapılarının gelişim oranları

Bitki büyüme düzenleyicileri	Kallus oluşum %
5 μ M NAA	100a (90)
1 μ M NAA	63.58b (58.19)
3 μ M NAA	58.00b (53.61)
1 μ M NAA+AgNO ₃	38.50c (38.27)

LSD_{kallus}=14.37(p<0.01)

Parantez içerisinde belirtilen değerler yüzde değerlerin açılı transformasyonu uygulanmış halidir. Tablodaki farklı harfler farklı değerleri göstermektedir.

Melody F1 ticari çeşidinde her iki dönemde kurulan anter kültürü denemelerinden haploid bitkiler elde edilememiştir.

4.1.3. Sonbaharda Çiçeklenen *Cyclamen* Türlerinde Anter Kültürü Bulguları

4.1.3.1. *C. hederifolium* Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. hederifolium türünde birinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda eksplantlarda gelişme gözlemlenmemiştir. Anterler 8 hafta sonra alt kültüre alınmışlardır. Bu türde anterlerde kararma gözlenmemiş, fakat 32 hafta kültürde kalan anter eksplantlarında kallus, embriyo ve bitkiye dönüşümün olmadığı tespit edilmiştir.

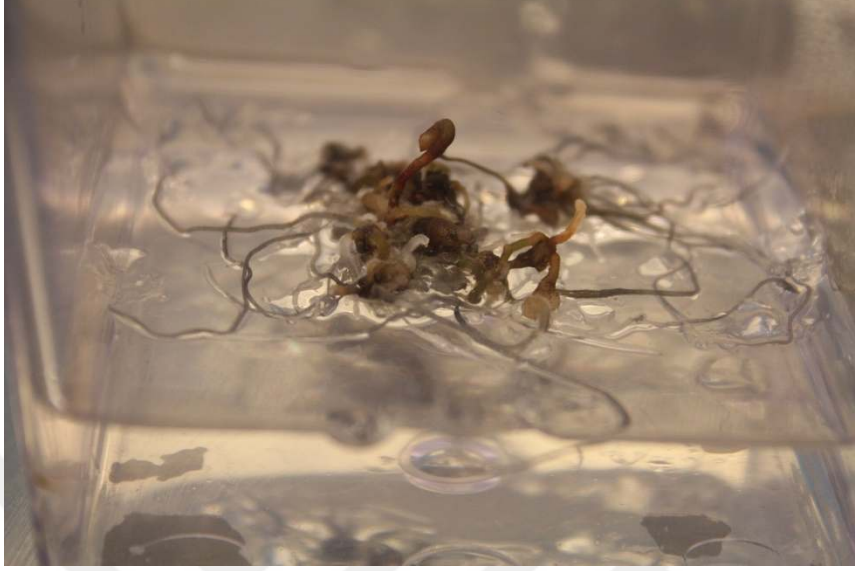
4.1.3.2. *C. hederifolium* Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. hederifolium türünde birinci dönem anter kültürü denemelerinden farklı olarak bu dönemde yalnızca 5 μ M NAA içeren B5 besi yerinde kültüre alınan anterde, embriyo ve sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen

embriyolar anterden ayrılarak, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besi yerinde kültüre alınmıştır. Embriyolar bitkiye dönüşmeye başlamış gibi görünse de yaprak oluşumu gözlenmemiştir. Yaprak gelişimi gözlenmeyen sadece sürgün benzeri yapı gözlenen eksplantta, çok fazla kök oluşumu elde edilmiştir (Şekil 4.17). Elde edilen bitki benzeri yapı, hormonsuz B5 besi yerine alındıktan 4 hafta sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerine aktarılmıştır. MS besi yerine alınan sürgün benzeri yapıda, kök miktarı aşırı oranda artış göstermiş, ancak kotiledon veya yaprak oluşmamıştır. Alt kültürler sonucunda kökler canlı kalsa da üst kısım kararıp kurumuştur. *C. hederifolium* türünde yalnızca bir eksplantta gelişim saptanmış, fakat diğer eksplantlar birinci dönemdeki bulgulardan farklı olarak kararmış ve kallus, embriyo ve bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir.



Şekil 4.16. *C. hederifloium* türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucu 0,1 μ M NAA içeren B5 besi yerinde elde edilen yapılar A) Kültüre alınan anter eksplantı B-C) Anter eksplantında meydana gelen kök ve sürgün benzeri yapılar



Şekil 4.17. *C. hederifloium* türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucu 0,1 μ M NAA içeren B5 besi yerinde elde edilen yapıların sürgün ve kök benzeri yapıların çoğalması

4.1.3.3. *C. cilicium* Türünde Birinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. cilicium türünde birinci dönem anter kültürü sonucunda hiçbir gelişme gözlenmemiştir. Anterler 8 hafta sonra ilk kez alt kültüre alınmıştır. Alt kültürden sonra siyahlaşan anterler, 28 hafta boyunca kültüre alınmaya devam edilmiş; fakat kallus, embriyojenik yapılar ve bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir.

4.1.3.4. *C. cilicium* Türünde İkinci Dönem Anter Kültürü Bulguları

C. cilicium türünde ikinci dönem anter kültürü denemeleri sonucunda da birinci döneme benzer olarak hiçbir gelişme saptanmamıştır (Şekil 4.18).



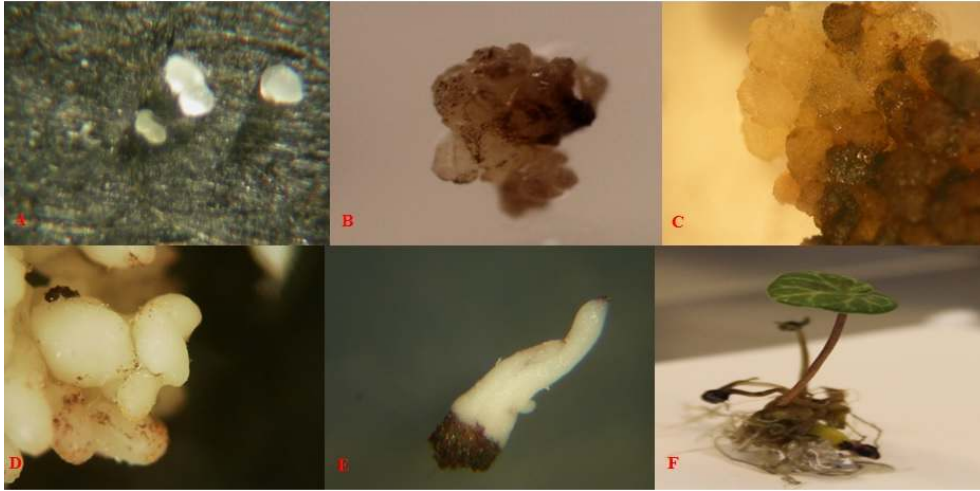
Şekil 4.18. *C. cilicium* türünde ikinci dönem anter kültürü denemelerinde kültüre alınan anter eksplantları, A) Anter eksplantlarının kültüre alındıktan bir hafta sonraki görüntüsü, B) Kültüre alınan anterlerde 8 hafta sonra meydana gelen kararma

4.2. Ovül Kültürü Bulguları

4.2.1. İlkbaharda Çiçeklenen *Cyclamen* Türlerinde Ovül Kültürü Bulguları

İlkbaharda çiçek açan türlerde ovül kültürü denemelerinde, anter kültürü denemeleri için belirlenen tek çekirdekli evredeki tomurcuk boylarından yaklaşık $\pm 1\text{mm}$ daha uzun ve anthesis aşamasına gelmemiş tomurcuklar kullanılmıştır. Tomurcuklara 2 gün boyunca $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ soğuk uygulaması yapılmıştır. Ovül eksplantları, materyal metod kısmında belirtilen MS besi yerinde 25°C 'de karanlıkta kültüre alınmıştır. Eksplantlar, her 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Deneme boyunca kallus yapıları ve embriyo oluşumu gözlenen eksplantların, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 16/8 saat fotoperiyot gösteren büyütme odalarında gelişimleri gözlenmiştir. (Şekil 4.19). *Cyclamen* türlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda farklı eksplant tipleri kullanılmıştır. Kullanılan eksplant tipleri arasında somatik embriyogenesis çalışmasında en etkili sonucu veren eksplant tipinin ovül eksplantı olduğunu belirtilmiş olsalar da elde edilen bitkilerin diploid yapıda olduklarını belirtmişlerdir (Winkelman, 2010). Tez kapsamında haploid bitki elde etmek için kullanılan ovül eksplantlarında gelişim

oranları anterlere göre daha yüksek olsa da elde edilen yapıların diploid olduğu saptanmıştır. *C. persicum*, *C. cilicium* ve Melody F1 ticari çeşidinden elde edilen embriyojenik yapıların diploid yapıda oldukları belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen bu bulgular, Winkelman (2010)'nın bulguları ile örtüşmektedir.



Şekil 4.19. *Cyclamen* türlerinde ovül kültürü aşamaları, A) Ovaryumdan çıkarılmış ovül eksplantları, B) Ovül eksplantlarından kallus oluşum başlangıcı, C) Embriyojenik kalluslardan embriyo benzeri yapıların oluşması, D) Farklı embriyo aşamaları, E) Torpedo aşamasındaki embriyolar, F) Embriyolardan elde edilen bitkiler

4.2.1.1. *Cyclamen persicum* L. Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. persicum türünde ovül kültürü denemeleri sonucunda kontrol grubunda hiçbir gelişme gözlemlenmemiştir. *C. persicum* türünde karanlıkta dört haftalık kültür sonucunda ovül eksplantlarında deneme deseninde belirtilen bütün konsantrasyonlarda kallus gelişimi gözlenmiştir. En etkili kallus oluşumu, 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%62) ve 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%62) hormon konsantrasyonlarını içeren MS besi yerlerinde meydana gelmiştir. Kallus oluşumu için bu besi yerini sırasıyla, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%42) ve 1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%42) bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besi yeri takip

etmiştir (Çizelge 4.4). Elde edilen kallusların koyu sarı, kahverengi, yumuşak ve kırılğan yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. Kalluslar başlangıç aşamasında açık sarı ve sert bir yapı gösterirken, embriyoların oluşmaya başladığı evrede kallusların koyu kahverengi olduğu saptanmıştır.

C. persicum türünde elde edilen kalluslarda 6. hafta (İlk alt kültürden iki hafta sonra) sonunda embriyojenik yapıların oluşmaya başladığı saptanmıştır. Embriyo gelişiminin en fazla olduğu besi yeri 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%92) içeren MS besi yeri olarak saptanmıştır. Kallusların embriyoya dönüşümü açısından bu besi yerini, 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%74) içeren MS besi yeri takip etmiştir (Çizelge 4.4). Embriyo oluşumu gözlenen eksplantlar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında aydınlık ortamda 16/8 saat fotoperiyot gösteren büyütme odalarında 25 °C’de kültüre alınmıştır. Meydana gelen embriyojenik yapılar üzerinde globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamaları gözlenmiştir. Torpedo aşamasından 2 hafta sonra kotiledonlar ve mikro yumru oluşumları eş zamanlı olarak gerçekleşmiştir. Mikro yumruların oluşmasından 2 hafta sonra kök oluşumları meydana gelmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *C. persicum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar, A) Ovül eksplantlarından 4. hafta sonunda embriyogenik kallusların meydana gelmesi, B) Kalluslardan elde edilen globular ve torpedo aşamasındaki embriyolar, C) Kalluslardan sürgün benzeri yapıların oluşması, D) Torpedo aşamasındaki embriyolar E) Hormonsuz MS besi yerinde embriyoların çimlenmesi, F) Çimlenen embriyolardan sürgün ve kök benzeri yapıların meydana gelmesi

C. persicum türünde köklerin hormonsuz MS besi yeri içerisinde kendiliğinden oluştuğu gözlenmiştir. Bir hafta sonra kotiledon, kök ve mikro yumru içeren bitkicikler, 50 ml hormonsuz MS içeren magenta kaplarına aktarılmıştır. Bitkiye dönüşümün en fazla olduğu eksplantların %62'lik oran ile 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kültüre alınan embriyolardan meydana geldiği saptanmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.21). Yumrular gelişip kökler uzamaya başladıktan sonra bitkicikler, aklimatizasyon aşamasında başarıyı arttırmak için tasarlanmış olan ve gaz alışverişine yardımcı olan filtreli kaplarda 0.5 g/l aktif karbon içeren 100 ml hormonsuz MS besi yerinde kültüre alınmışlardır.



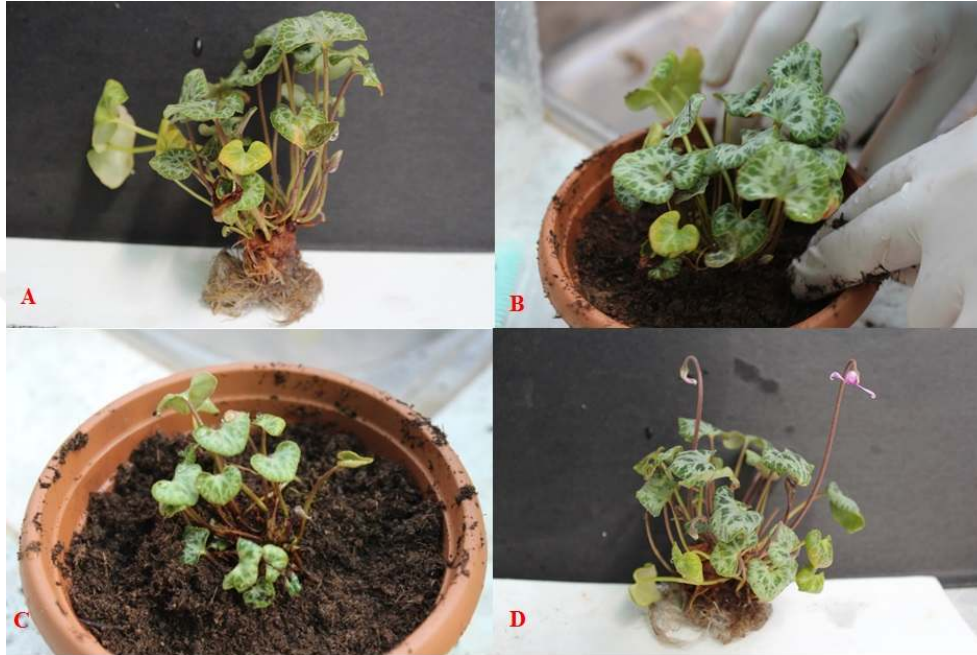
Şekil 4.21. *C. persicum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen bitkiler, A) Ovül eksplantlarından meydana gelen bitkilerin magenta kaplarında meydana getirdiği yumru ve bitkiler, B) Bitkilerin ayrılmış hali ve kök yapıları

Bu kaplarda hızlı ve sağlıklı gelişim gösteren, bitkiler dış ortama aktarılmıştır. Dış ortama aktarıldıktan 1 ay sonra aktarılan bitkilerin yaşama oranları belirlenmiştir. Yaşama oranları, bir konsantrasyonda dışarı aktarılan bitkilerden 1 ay sonunda canlı kalan bitkilerin, aynı konsantrasyonda dışarı aktarılan toplam bitkilere oranının yüzde değeri olarak belirlenmiştir. Bu türde birinci dönem ovül kültürü sonucunda toplamda 130 adet bitki dışarı aktarılmıştır. Aklimatizasyondan sonra en yüksek yaşama oranı, 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besiyeri yeriinde kültüre alınan ovül eksplantlarında oluşan kallus ve embriyolardan elde edilen bitkilerde gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Elde edilen bitkiler, 18 °C sıcaklık ve 2-11 MJ m⁻² gün⁻¹ ışık miktarına sahip seralarda 1:1 oranında torf perlit karışımı içeren saksılarda kültüre alınmıştır (Şekil 4.22). Aklimatizasyonu gerçekleştirilen bitkilere kültürel bakım işlemleri uygulanmıştır. Ayrıca gübre uygulamaları sonucunda yumruların çapları gözle görülür şekilde artmıştır. Uygulama sonrasında yumruların tabanlarından çıkan kök miktarlarında artış gözlenmiştir. Bitkiler dış ortama aktarıldıktan 3 ay sonra sıcaklığı 25°C olan

seraya aktarılmıştır. Bitkiler 25°C sıcaklıktaki seraya aktarıldıktan 4 ay sonra çiçek tomurcuklarının oluştuğu gözlemlenmiş, fakat oluşan çiçek tomurcuklarının saplarının kuruyarak döküldüğü görülmüştür. Koçak ve ark. (2014), *Cyclamen persicum* türünde yapmış oldukları çalışmada, farklı *C. persicum* genotiplerinden aldıkları ovül, bölünmüş ovaryum, yaprak ve yaprak saplarını, 2 mg/l 2,4-D+ 0.8 mg/l 2iP içeren yarım MS besisi yerinde kültüre almışlar ve somatik embriyo oluşturma kapasitelerini incelemişlerdir. Ovül eksplantlarının kallus ve embriyo oluşum yüzdeleri sırasıyla %26.6, %2.83 olarak hesaplamışlardır. Bu tez kapsamında, *C. persicum* türünde kallus oluşumları, bütün eksplantlarda gözlenmiş ve aynı besisi yerinde %62 başarı oranı saptanmıştır. Ayrıca, Koçak ve ark. (2014)'nın yapmış olduğu çalışmada belirtilen embriyo oluşum oranı tez çalışması kapsamında elde edilen embriyo oluşum oranına göre oldukça düşüktür. Bu farklılığın en önemli sebebinin genotip etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *in vitro* kültür öncesi bitkilere uygulanan kültürel bakım işlemlerinin de *in vitro* rejenerasyonda önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Furukawa ve ark. (2002) *C. persicum* türünde tohumlardan elde ettikleri bitkiciklerin yaprak ve yaprak saplarını kullanarak somatik embriyogenesis çalışmaları yapmışlardır. Meydana gelen kallusların kompakt ve bu tez çalışmasındaki kallus yapılarına benzer olarak sarı renkte olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, tez çalışmasına benzer olarak kallusları embriyo oluşturmak için hormonsuz besisi yerinde kültüre almışlardır. Furukawa ve ark. (2002) *C. persicum* türünde yaprak sapında modifiye edilmiş MS besisi yerinde %68 ve yapraklarda ise modifiye edilmiş MS besisi yerinde %20 oranında kallus oluşumu saptamışlardır. Tez çalışması kapsamında ovül eksplantlarından elde edilen kallusların oranlarının petiol ve yaprak eksplantlarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tez çalışması kapsamında somatik embriyoların oluşum yüzdeleri, Furukawa ve ark. (2002)'na göre oldukça yüksektir.

Araştırmacılar petiollerde somatik embriyo oluşumunu %12, yapraklarda ise %35 olarak rapor etmişlerdir. Ovül eksplantlarının özellikle somatik

embriyogenesis çalışmalarında oldukça önemli bir eksplant kaynağı olduğu, bu bulgularla da desteklenmektedir.



Şekil 4.22. *C. persicum* türünde aklimatizasyon aşamaları A) Bitkilerin hormonsuz MS besiyeri yerinden çıkarılması, B) Bitkilerin köklerindeki agar artıklarını ayıkladıktan sonra saksılara alınması, C) Bitkilere can suyu verildikten sonraki durumu, D) Bitkilerin çiçek tomurcukları oluşması

Çizelge 4.4. *C. persicum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve aklimatizasyon sonrası bitkilerin yaşam oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%) Y.B/A.B.
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	14 cd (14.48)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 (0.5+0.3)	24bcd (20.35)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3 (0.5+0.5)	26bcd (24.64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4 (0.5+0.8)	42ab (40.75)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5 (1+0.1)	8d (7.84)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6 (1+0.3)	22bcd (21.69)	38 (37.15)	6cd (14.02)	0 (0)
7 (1+0.5)	12cd (12.68)	4e (7.37)	4d (8.85)	0/5 (0)
8 (1+0.8)	10d (11.53)	2e (3.68)	4d (8.85)	0/2 (0)
9 (1.5+0.1)	24bcd (22.84)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10 (1.5+0.3)	14bcd (19.33)	24cd (28.63)	12cd (19.48)	¼ (%25)
11 (1.5+0.5)	42abc (37.64)	34c (35.44)	6cd (11.06)	2/4 (%50)
12 (1.5+0.8)	12bcd (15.94)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
13 (2+0.1)	12bcd (15.64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
14 (2+0.3)	10d (11.95)	22d (24.22)	18bc (22.16)	2/7 (%28)
15 (2+0.5)	62a (52.42)	92a (75.48)	62a (52.20)	72/72 (%100)
16 (2+0.8)	62a (55.33)	74b (59.53)	30b (33.08)	22/36 (%61)

LSD_{Kallus}=25.56 LSD_{Embriyo}=9.68 LSD_{Bitki}=11.04 (p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklı değerleri ifade etmektedir.

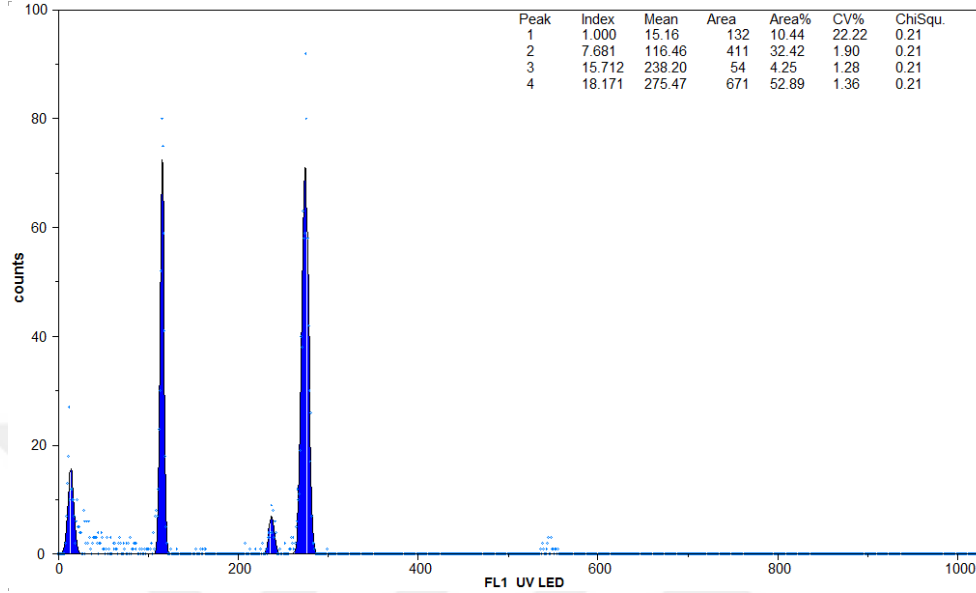
4.2.1.2 *C. persicum* Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitkilerin Flow Sitometri Analizleri

C. persicum türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen bitkilerin kültürel bakım işlemleri yapılmış, yapraklar belirli sayıya ulaştıktan (en az 3 yaprak bulunduracak şekilde) sonra ploidi analizlerini gerçekleştirmek için örnekler alınmıştır. Ploidi analizleri için alınan yaprak örneklerinin her birinin ağırlığı ortalama 20-30 gr olacak şekilde ayarlanmıştır. Saksıda kültüre alınmış olan bitkilerden alınan sağlıklı ve genç yapraklar, içerisinde ıslak filtre kağıdı bulunan petri kaplarına konulmuş ve buz aküleri bulunduran içerisi soğuk köpük kaplarda taşınarak Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri sitogenetik laboratuvarına getirilmiştir. Taşıma sırasında yapraklarda soğuktan zarar görme veya donma olayı saptanmamış ve yaprakların analiz öncesi canlılığını yitirmediği tespit edilmiştir. Ploidi seviyelerinin belirlenmesi için standart olarak genom ağırlığı 10.65 olan arpa bitkisi kullanılmıştır. Ploidi analizleri için 15 adet bitki seçilmiştir. Flow sitometri analizleri sonucunda kontrol olarak, ovül eksplantlarının alındığı materyal olan ana bireyin yaprakları kullanılmıştır. Kontrol bitkisinden alınan ovül eksplantlarından elde edilen bitkilerin diploid olduğu saptanmıştır (Şekil 4.23). Flow sitometri analizleri sonucunda örneklerin genom ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen diploid bitkilerin genom ağırlıkları 4.42 ile 5.33 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.5). Flow sitometri analizleri sonucunda ovül kültüründen elde edilen bitkilerin genom ağırlıkları Çizelge 4.5’de belirtilmiştir. Winkelmann ve ark. (1998) ticari *C. persicum* genotipinde ovül eksplantlarının 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS besiyeri de kültüre alınması ile meydana gelen kalluslarda ploidi seviyelerini incelemişler ve flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen grafiklerde farklılık gözlememişlerdir. Kallusların da DNA içeriklerinin aynı olduklarını belirlemişlerdir. Benzer olarak, bu tez çalışmasında ovül eksplantlarından elde edilen bitkilerin genom ağırlıkları önemli olmayan

değişiklikler gözlemlense de bu farklılıkların genotipik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.5. *C. persicum* türünde ovül kültüründen elde edilen bitkilerin flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen genom ağırlıkları

Siklamen	Örnek Pik	Standart Pik	Standart	DNA	Siklamen
STANDART(D)	114,78	258,77	10,65	4,72	114,78
1-DOĞAL	122,59	272,7	10,65	4,79	122,59
B1	120,45	266,95	10,65	4,81	120,45
B2	116,2	263,17	10,65	4,70	116,2
B3	116,11	268,45	10,65	4,61	116,11
B 4	116,46	275,47	10,65	4,50	116,46
B 5	114,43	256,64	10,65	4,75	114,43
B 6	118,59	273,01	10,65	4,63	118,59
B 7	118,19	271,17	10,65	4,64	118,19
B 8	112,24	270,25	10,65	4,42	112,24
B 9	117,62	267,02	10,65	4,69	117,62
B 10	126,62	281,7	10,65	4,79	126,62
B 11	120,19	267,38	10,65	4,79	120,19
B 12	121,55	281,77	10,65	4,59	121,55
B 13	118,09	253,65	10,65	4,96	118,09
B 14	121,44	265,76	10,65	4,87	121,44



Şekil 4.23. *C. persicum* türünde ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen diploid bitkilerden alınan örneklerin flow sitometri analizleri sonucu meydana getirdiği grafik

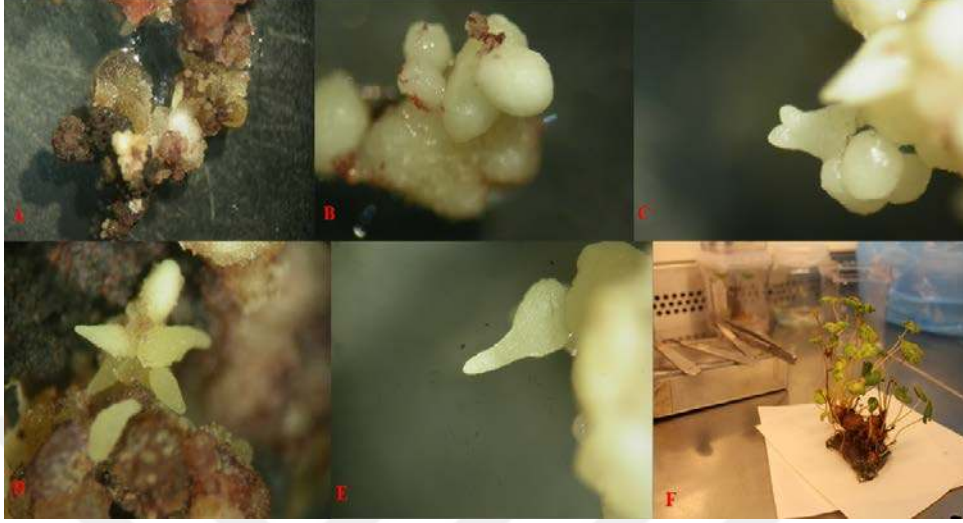
4.2.1.3. *Cyclamen persicum* L. Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. persicum türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinde eksplantlar kültüre alındıktan 4 hafta sonra kontrol grubu hariç bütün konsantrasyonlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallusların, koyu sarı, kahverengi, kırılğan ve sert yapıda oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.24) (Çizelge 4.6). *C. persicum* türünde kallus oluşumları birinci dönem ovül kültüründe elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. İkinci dönem ovül kültürü denemelerinde etkili kallus oluşumu, 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%100) ve 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%93) büyüme düzenleyicilerini içeren MS besiyerinden elde edilmiştir. Kalluslar, 4 hafta sonunda alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınan kalluslarda 6. hafta sonunda embriyo oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.24).

Embriyoların oluşmaya başlaması ile eksplantlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerine aktarılmışlardır. Hormon içermeyen MS besiyerine alınan embriyolar, 16/8 saat fotoperiyod gösteren büyütme odalarında

aydınlık ortamda (F36W/54-765 daylight 2350Lm, Philips Lighting Holding B.V.) olgunlaşmıştır. Embriyolarda globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamaları eksplantlar üzerinde saptanmıştır. En etkili embriyo oluşumu, 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%98) içeren MS besi yerinde oluşan kalluslardan elde edilmiştir. Embriyoların en iyi gelişim gösterdiği diğer besi yeri ise 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%78) içeren MS besi yeri olarak saptanmıştır. Kiviharju ve ark. (1992) *C. persicum* türünde anter, ovül ve zigotik embriyo gibi farklı eksplant tiplerinin somatik embriyogenesis üzerine etkilerini incelemiştir. Bütün eksplantlarda kallusların yavaş büyüdüğünü ve tez çalışmasındaki bulgulara paralel olarak kallusların kahverengi ve açık sarı olduğunu belirtmiştir. Somatik embriyoların oluşumunda en etkili besi yerinin, 1 mg/l veya 1.5 mg/l 2,4-D + %10 hindistan cevizi sütü içeren MS besi yeri olduğunu belirlemişlerdir. En fazla somatik embriyo oluşumunun ise sırasıyla ovül, anter ve zigotik embriyoda meydana geldiğini belirtmişlerdir. Tez çalışması kapsamında ovül kültüründe meydana gelen embriyo gelişimlerinin anter kültüründe elde edilen embriyolara oranla çok daha fazla olduğu istatistiksel analizler sonucu ortaya konulmuştur. Meydana gelen farkın, anter ve ovül eksplantlarından elde edilen embriyolardaki ploidi seviyelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ovül kültüründen elde edilen torpedo aşamasındaki embriyoların bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde iki haftalık kültür aşamasından sonra kotiledon ve bununla eş zamanlı olarak mikro yumru oluşturmaya başladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.24). Mikro yumru oluşumundan 1 hafta sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde köklerinin oluştuğu görülmüştür. Seyring ve ark. (2009) *C. persicum*, *C. cilicium*, *C. africanum* türlerinden elde ettikleri bitkileri köklendirmek amacıyla, 2 mg/l NAA içeren N69 besi yeri kullanmışlardır. *C. persicum* türünde belirtilen besi yerinde %83 oranında kök oluşumu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca hormonsuz besi yerinde kültüre alınan bitkilerin tamamında köklenme meydana geldiğini saptamışlardır.

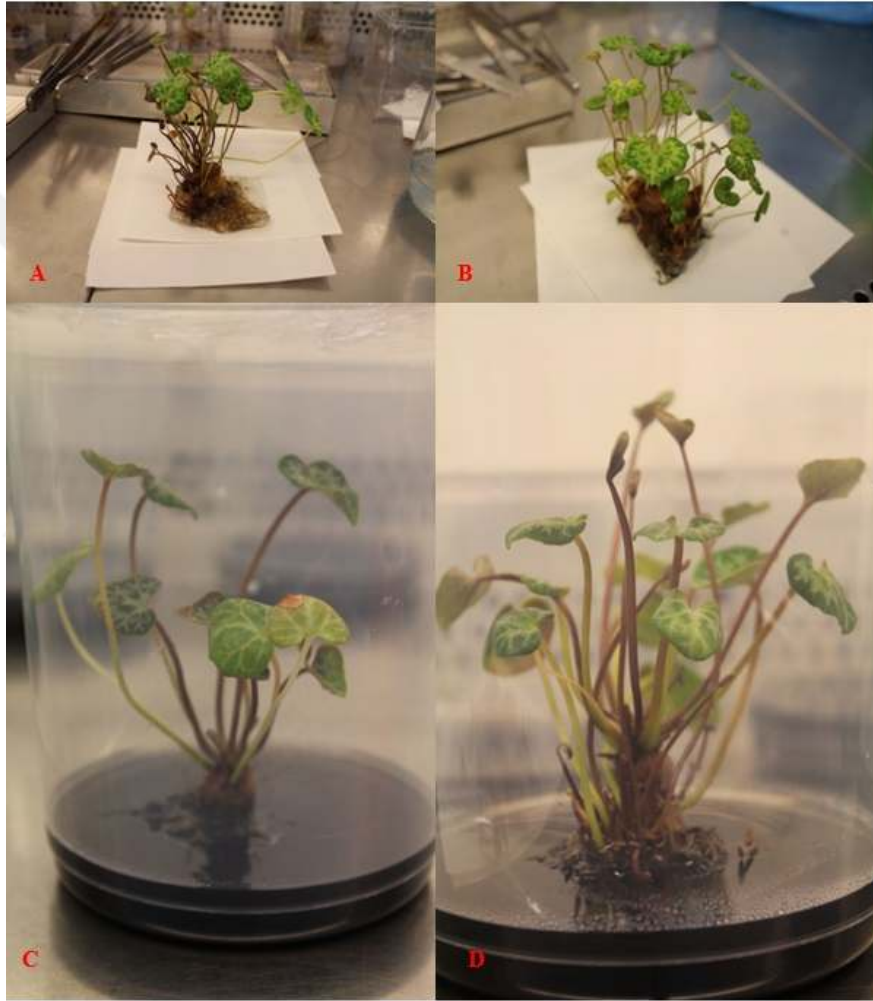
Tez çalışması kapsamında, *C. persicum* ve Melody F1 türlerinden elde edilen bitkilerin hormonsuz MS besisi yerinde kültüre alınması ile bütün bitkilerde kök oluşumunun meydana geldiği saptanmıştır. Tez çalışmasında ovül eksplantlarından elde edilen bitkilerin köklenme bulguları, Seyring ve ark. (2009) ile uyumluluk göstermektedir. Embriyogenesis çalışmalarında embriyoların çimlendirilmesi ve bitkiye dönüşümünde besisi yerinde bulunan sentetik oksin miktarlarının azaltılması veya hormonsuz besisi yeri kullanılması embriyoların çimlenmesini kolaylaştırmaktadır. (von Arnold ve ark., 2002). Kotiledon ve kök oluşumu gözlenen bitkicikler, 50 ml hormonsuz MS besisi yeri bulunduran magenta kaplarına aktarılmıştır. Embriyolardan bitkiye dönüşüm, ovül eksplantlarının 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besisi yerinde kültüre alınması ile oluşan kalluslardan elde edilen embriyolarda meydana gelmiştir (%84) (Çizelge 4.6). Bitkiye dönüşümün etkili olduğu diğer besisi yeri ise 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS besisi olarak belirlenmiştir (%66). Bitkiler geliştikten sonra, 0.5 g/l aktif karbon içeren hormonsuz MS besisi yerinde kültüre alınmışlardır (Şekil 4.25). *C. persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucunda, 142 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.26). Aklimatizasyon sonrası en fazla yaşama oranının, 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS ortamında kültüre alınan ovüllerden elde edilen bitkilerde olduğu saptanmıştır (%100). Yaşama oranı, aklimatizasyondan 1 ay sonra canlı kalan bitki sayısının dış ortama aktarılan toplam bitki sayısına oranının yüzde değeri olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.24. *C. persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar, A) Embriyojenik kallusların 4. haftada meydana gelmesi B) Embriyojenik kalluslardan 8. hafta sonunda embriyojenik yapıların meydana gelmesi, C) Kalp aşamasındaki embriyolar, D-E) Torpedo aşamasındaki embriyoların çimlenmeye başlaması, F) Ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen bitkiler

Birinci gelişme dönemindeki kültürel bakım işlemleri, ikinci dönemde elde edilen ve seraya aktarılan bitkilere de aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen bitkiler 18°C sıcaklık ve 2-11 MJ m⁻² gün⁻¹ ışık miktarına sahip seralarda 1:1 oranında torf perlit karışımı içeren saksılarda kültüre alınmıştır. Seraların üzeri gölgeleme amacı ile ışık geçirgenliği %50 olan koyu yeşil net ile örtülmüştür. Aklimatizasyonu gerçekleştirilen bitkilere kültürel bakım işlemleri uygulanmıştır. Dış ortama aktarılan bitkiler ilk bir hafta boyunca günde üç kez olacak şekilde 100 ml su ile sulanmıştır. Sulama spray yardımı ile sisleme şeklinde yapılmıştır. Bir hafta sonunda sulama sıklığı 3 günde bir olacak şekilde azaltılmış ve sulama suyu saksının tabanından tavalara dökülerek gerçekleştirilmiştir. Birinci ay sonunda canlılığını koruyan bitkilere vejetatif gelişimi arttırmak için, 20:20:20 (N:P:K) gübresi kullanılmıştır. Gübre uygulaması sonucunda yaprak boyları uzamış, yaprak ayaları genişlemiş, daha sağlıklı yaprak görünümüne sahip bitkiler elde edilmiştir.

Ayrıca gübre uygulamaları sonucunda yumruların çapları gözle görülür şekilde artmıştır. Uygulama sonrasında yumruların tabanlarından çıkan kök miktarlarında artış gözlenmiştir. Bitkiler dış ortama aktarıldıktan 3 ay sonra sıcaklığı 25 °C olan seraya aktarılmıştır.



Şekil 4.25. *C. persicum* türünde elde edilen bitkiler, A-B) Hormonsuz MS besi yerinde kültüre alınan embriyolardan elde edilen sağlıklı kök ve yumruları oluşmuş bitkiler, C-D) Akklimatizasyon öncesi aktif karbon içeren MS besi yeri bulunduran filtreli kaplarda kültüre alınan bitkiler

Dış ortama aktarılan bitkilerin 4 ay sonra çiçeklendiği gözlenmiştir. Çiçeklerin morfolojik görünüşleri başlangıç materyalinin alındığı birey ile aynı özellikleri göstermektedir.



Şekil 4.26. *C. persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü sonucunda elde edilen bitkicikler, A) Bitkilerin toprağa aktarılmadan önceki durumu, B) Bitkilerin aklimatizasyon işleminden sonra saksıdaki durumu

Çizelge 4.6. *C.persicum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%) Y.B/A.B.
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	2g (3.68)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 (0.5+0.3)	25cdef (29.91)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3 (0.5+0.5)	16efg (20.53)	10ef (16.37)	10f (14.31)	0 (0)
4 (0.5+0.8)	36bcde (36.00)	6fg (9.00)	4f (7.37)	0 (0)
5 (1+0.1)	45bcd (41.89)	22cde (27.17)	36cde (36.64)	0 (0)
6 (1+0.3)	32cdef (30.68)	18de (22.16)	22e (27.60)	0 (0)
7 (1+0.5)	26def (27.30)	4fg (7.37)	10f (14.31)	0 (0)
8 (1+0.8)	30def (29.31)	14ef (16.97)	36cde (36.64)	½ (%50)
9 (1.5+0.1)	28def (25.84)	2g (3.68)	2f (3.68)	0 (0)
10 (1.5+0.3)	10fg (14.31)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
11 (1.5+0.5)	14fg (17.27)	2g (3.68)	4f (5.31)	½ (%50)
12 (1.5+0.8)	44bcd (41.48)	32cd (33.69)	48bcd (43.62)	2/7 (%28.57)
13 (2+0.1)	54bc (47.30)	38c (37.15)	56bc (48.51)	4/10 (%40)
14 (2+0.3)	58b (49.89)	38c (37.97)	34de (34.84)	14/22 (14.63)
15 (2+0.5)	93a (78.07)	98a (86.31)	84a (69.47)	56/56 (%100)
16 (2+0.8)	100a (90.00)	78b (62.40)	66b (54.55)	38/43 (%88.37)

LSD_{Kallus}=17.69 LSD_{Embriyo}=13.09 LSD_{Bitki}=12.91(p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.1.4. *C. persicum* Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Sonucu Elde Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

C. persicum türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen bitkilerin kültürel bakım işlemleri yapılmasının ardından yapraklar belirli sayıya ulaştıktan (en az 3 yaprak bulunduracak şekilde) sonra ploidi analizlerini gerçekleştirmek için örnekler alınmıştır. Ploidi analizleri için alınan yaprak örneklerinin birinci dönemde alınan örneklere benzer şekilde her birinin ağırlığı ortalama 12-34 gr olduğu yapılan tartımlarla belirlenmiştir. Bu türde ikinci dönem ovül kültürü sonucu elde edilen bitkiler, birinci dönemdeki bulgularla benzer şekilde olup, elde edilen bitkiler diploid yapıdadır. *C. persicum* türünde ovül eksplantlarının kültüre alınması ile meydana gelen kallusların, ovüllerin dış yüzeyindeki diploid dokulu zardan meydana geldiği düşünülmektedir.

C. persicum türünde ovül kültüründe her iki dönem boyunca toplamda 272 adet bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerden rastgele seçilen örneklerle yapılan flow sitometri analizlerinde bitkilerin diploid olduğu ve *C. persicum* türünde ovül kültürü çalışmalarının haploid bitki elde etmede uygun bir yöntem olmadığı tespit edilmiştir.

4.2.1.5. *Cyclamen coum* var. *coum* Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

İlkbaharda çiçek açan *C. coum* türünde ovül kültürü denemeleri için anter kültürü denemeleri için belirlenen boydaki tomurcuklar kullanılmıştır. Ovül eksplantları deneme deseninde belirtildiği şekilde 2,4-D ve 2iP içeren MS besi yerinde karanlık ortamda ve 25 °C sıcaklıkta büyütme odasında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan ovül eksplantlarında ilk 4 hafta içerisinde şişme gözlenirse de, *C. coum* türünde yalnızca 1.5 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kültüre alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.7). Elde edilen kalluslar alt kültüre alındıktan sonra kararıp kuruyarak siyahlaşmıştır.

Kalluslar ilk dört haftalık süre boyunca açık kahverengi ve yumuşak yapıdayken, alt kültür sonrası daha kompakt ve siyah bir hal almışlardır. *C. coum* türünde embriyojenik yapılar ve bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. Seyring ve ark. (2009) aralarında *C. coum* türünün de bulunduğu *Cyclamen* türlerinde *in vitro* çoğaltım üzerine araştırma yapmışlardır. *C. coum* türlerinde kullandıkları ovaryum eksplantlarından %30 oranında somatik embriyo oluşumu gözlemişlerdir. Tez çalışmasına benzer olarak araştırmacılar, büyüme düzenleyiciler olarak 2,4-D ve 2iP kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında, *C. coum* türünde 1.5 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l 2iP içeren besi yerinde yalnızca kallus oluşumu gözlenmiştir. Seyring ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları çalışmada ise 2 mg/l 2,4-D +0.8 mg/l 2iP kullanarak ovül eksplantlarında %30 oranında somatik embriyo benzeri yapılar elde etmişlerdir. Ayrıca araştırmacıların *C.coum* türünde yapmış olduğu çalışmada, ovaryum, yaprak, yaprak sapı ve çiçek saplarında, 2,4-D ve 2iP içeren besi yerinde bütün eksplantlarda somatik embriyo oluşumu meydana gelirken, IBA ve BA içeren MS besi yerinde hiçbir eksplantta gelişim gözlenmemiştir.

Çizelge 4.7. *C. coum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0 (0)	-	-	-
1 (0.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	0 (0)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	0 (0)	-	-	-
5 (1+0.1)	0 (0)	-	-	-
6 (1+0.3)	0 (0)	-	-	-
7 (1+0.5)	0 (0)	-	-	-
8 (1+0.8)	0 (0)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	6a (11.06)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	0 (0)	-	-	-
13 (2+0.1)	0 (0)	-	-	-
14 (2+0.3)	0 (0)	-	-	-
15 (2+0.5)	0 (0)	-	-	-
16 (2+0.8)	0 (0)	-	-	-

LSD_{Kallus}=3.16 (p<0.001)

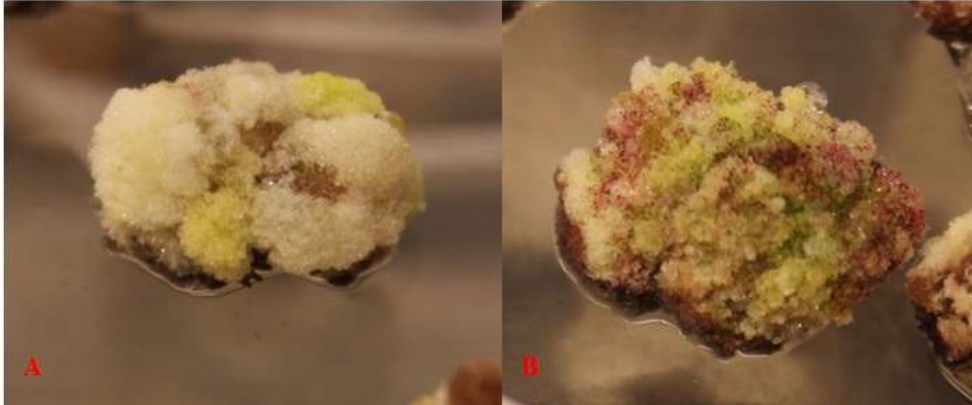
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açığı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.1.6. *Cyclamen coum* var. *coum* Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

Tomurcuklara birinci dönem denemelerinde olduğu gibi 2 gün boyunca +4 °C soğuk uygulaması yapılmıştır. Ovüller steril şırınga ucu ile mikroskop altında teker teker çıkarıldıktan sonra, 2,4-D, 2iP bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarını bulunduran MS besisi yerinde kültüre alınmıştır. *C. coum* türünde birinci dönem ovül kültürü bulgularından farklı olarak ikinci dönem bulgularında kallus oluşumunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *C. coum* türünde etkili kallus oluşumu 1.5 mg/l 2,4-D +0.3 mg/l 2iP (%36) içeren MS besisi yerinde gözlenmiştir. Bu besiyeri %26'lık kallus oluşumu ile 1.5 mg/l 2,4-D +0.5 mg/l 2iP içeren MS besiyeri izlemektedir (Çizelge 4.8). Kallus oluşumu başlangıcı, ovül eksplantlarının karanlık ortamda kültüre alınmasından 4 hafta sonra meydana gelmiştir. *C. coum* türünde birinci dönem ovül kültüründeki bulgulara benzer olarak ikinci dönem ovül kültüründe elde edilen kalluslarda da embriyoya dönüşüm gerçekleşmemiştir. Elde edilen kalluslarda kök benzeri yapılar oluşsa da bitkiciğe dönüşüm gözlenmemiştir. Kallusların beyaz, açık sarı parlak ve kompakt yapıda oldukları saptanmıştır. Alt kültüre alınan kallusların yeşil renk aldığı fakat daha sonra koyu kahverengi ve siyaha dönüştüğü gözlenmiştir. Siyah ve kahverengiye dönen kallusların yapısal olarak yumuşak ve kompakt oldukları belirlenmiştir. Prange ve ark. (2010) *C. coum* türünde sıvı ve katı kültür kullanarak farklı büyüme düzenleyicilerinin yaprak eksplantlarında meydana gelen embriyo oluşumlarını incelemişlerdir. Embriyojenik yapılardan protoplastları elde etmişler ve elde ettikleri protoplastlarda flow sitometri analizleri gerçekleştirmişlerdir. Flow sitometri analizleri sonucunda protoplastlardan elde ettikleri bitkilerin bazılarının tetraploid olduklarını belirtmişlerdir. Prange ve ark. (2010) yapmış olduğu çalışma kapsamında en etkili büyüme düzenleyicilerinin 0.8 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışması kapsamında, *C. coum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinde etkili kallus oluşumu, 1.5mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besisi yerinde meydana gelmiştir. Araştırmacıların sonuçlarından farklı

olarak tez çalışması kapsamında 2 kat daha yüksek oranda oksin içeren besi yerinde gelişimin gözlenmesi dikkat çekmektedir.

Furukawa ve ark. (2002) *C. coum* türünde *in vitro*'da çimlendirdikleri tohumlardan elde ettikleri bitkiciklerin yaprak ve yaprak saplarından somatik embriyo çalışmaları yapmışlardır. Yaprak saplarında modifiye edilmiş MS besi yerinde %84 oranında kallus oluşumu elde etmişlerdir. Yapraklarda ise %12 oranında kallus oluşumu meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca yaprak ve yaprak sapından elde edilen kalluslarda somatik embriyoların meydana gelmediğini belirtmişlerdir. Tez çalışması kapsamında *C. coum* türünde bu çalışmaya benzer olarak kallus oluşumu meydana gelmiş, fakat embriyo oluşumları gözlenmemiştir. Furukawa ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları çalışma ile kıyaslanacak olursa tez çalışmasında kullanılan ovül eksplantlarının yaprak sapı eksplantlarına oranla daha düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.27. *C.coum* türünde ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen kallus yapıları, A) Ovül eksplantlarında 8 hafta sonunda elde edilen kallus yapıları, B) Kallusların yeşil renk alması

Çizelge 4.8. *C. coum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

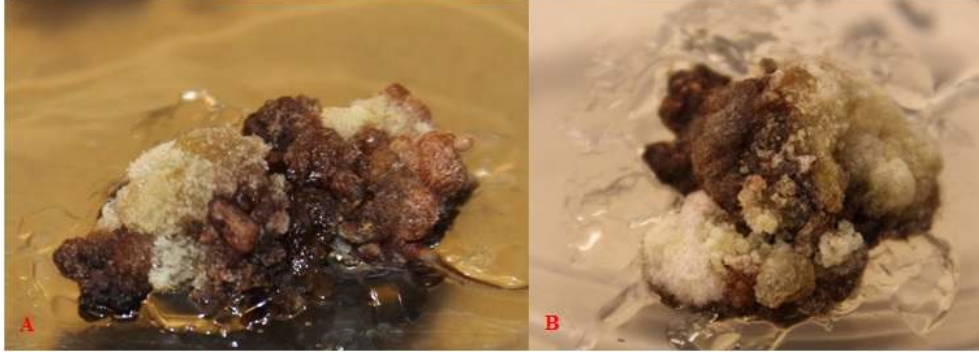
Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D mg/l+2iP mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0 (0)	-	-	-
1 (0.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	0 (0)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	0 (0)	-	-	-
5 (1+0.1)	0 (0)	-	-	-
6 (1+0.3)	10b (14.31)	-	-	-
7 (1+0.5)	10b (16.37)	-	-	-
8 (1+0.8)	12ab (26.44)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	12b (15.94)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	12b (20.06)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	36a (36.77)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	26ab (27.00)	-	-	-
13 (2+0.1)	12b (18.00)	-	-	-
14 (2+0.3)	22b (21.68)	-	-	-
15 (2+0.5)	0 (0)	-	-	-
16 (2+0.8)	0 (0)	-	-	-

LSD_{Kallus}=13.24 (p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir

4.2.1.7. *Cyclamen pseudibericum* Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. pseudibericum türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri için belirlenen tek çekirdekli evredeki mikrospor hücrelerini barındıran tomurcuklar kullanılmıştır. *C. pseudibericum* türünde birinci dönem ovül kültüründe kallus oluşumları meydana gelmiş olsa da kalluslar embriyoya dönüşmemiş ve siyahlaşarak canlılıklarını yitirmişlerdir. *C. pseudibericum* ovül kültüründe en etkili kallus oluşumu 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besisi yerinde meydana gelmiştir (%48). Etkili kallus oluşumları sırasıyla 1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%38), 1.5 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%32) içeren MS besisi yerlerinde kültüre alınan ovül eksplantlarında gözlenmiştir. Karanlık ortamda kültüre alınan ovül eksplantlarında kallus oluşumu 5. haftada gözlenmiştir. Kallusların açık kahverengi ve çok sert olduğu saptanmıştır. Kallusların üzerinde 7. haftada embriyo benzeri yapılar meydana gelmiş, fakat mikroskopik incelemeler sonucunda meydana gelen bu yapıların embriyo olmadığı saptanmıştır. Kalluslar her 4 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. İkinci alt kültür sonrası kallusların koyu kahverengi veya siyaha döndükten sonra canlılığını yitirdiği tespit edilmiştir. Canlılığını yitiren kalluslar kuruyarak daha sert bir yapı kazanmışlardır. Furukawa ve ark. (2002) *C. pseudibericum* türünde modifiye edilmiş MS besisi yerinde kültüre alınan yapraklardan %91, yaprak saplarından ise %87 kallus oluşumu elde etmişler fakat somatik embriyo elde edememişlerdir. Tez çalışmasında ise *C. pseudibericum* türünde Furukawa ve ark. (2002)'na benzer olarak kallus elde edilmiş, fakat somatik embriyo elde edilememiştir. Furukawa ve ark.(2002)'nda tez çalışmasında elde edilen kallusların aksine, beyaz renkli ve kompakt kalluslar elde edilmiştir (Şekil 4.28) (Çizelge 4.9).



Şekil 4.28. *C. pseudibericum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar A-B) *C. pseudibericum* ovül eksplantlarında meydana gelen kalluslar,

İzgü ve ark. (2016) *C. pseudibericum* türünde ovül, ovaryum, yaprak ve yaprak saplarını MS besi yerinde kültüre almışlar ve ovül eksplantarı için en etkili büyüme düzenleyicilerinin 2.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP olduğunu belirlemişlerdir. Tez çalışmasında ovül kültürü için en etkili besi yerinin ise %48 oran ile 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yeri olduğu saptanmıştır. İzgü ve ark. (2016) ovül eksplantlarında %20 oranında kallus oluştuğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar *C. pseudibericum* türünde yaprak eksplantlarında somatik embriyo benzeri yapıları 2.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l 2iP çeren MS besi yerinde, ovül eksplantlarında ise 2.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde gözlemişlerdir. Tez çalışmasında ovül kültürü denemelerinde elde edilen kalluslardan, embriyo benzeri yapıların meydana gelmediği gözlenmiştir. İzgü ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmada kallus oluşumu için yüksek oranda oksin kullanıldığı görülmektedir. 2,4-D'nin yüksek miktarda kullanılmasının etilen sentezini arttırdığı bilinmekte ve bu nedenle iki çalışma arasındaki kallus oluşumundaki farklılıkların, kullanılan 2,4-D miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.9. *C. pseudibericum* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

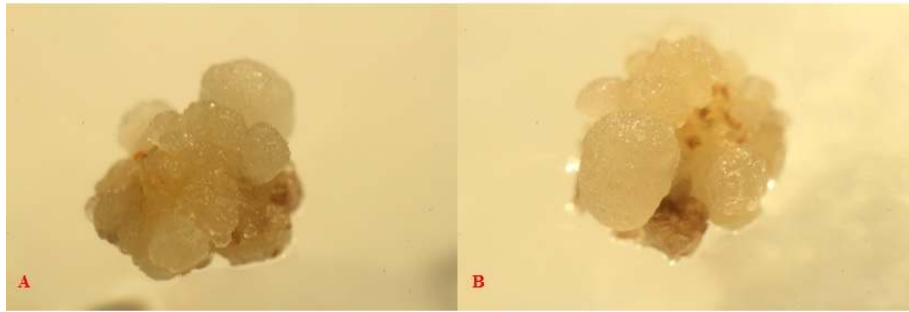
Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D mg/l+2iP mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	2f (3.68)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	12cdef (15.64)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	12cdef (15.64)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	0 (0)	-	-	-
5 (1+0.1)	36ab (36.60)	-	-	-
6 (1+0.3)	48a (43.67)	-	-	-
7 (1+0.5)	0 (0)	-	-	-
8 (1+0.8)	6ef (6.64)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	4def (7.37)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	32abc (31.28)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	38ab (34.20)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	22bcd (25.11)	-	-	-
13 (2+0.1)	12def (12.68)	-	-	-
14 (2+0.3)	22bcde (22.33)	-	-	-
15 (2+0.5)	0 (0)	-	-	-
16 (2+0.8)	0 (0)	-	-	-

LSD_{Kallus}=17.814(p<0.001)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir

4.2.1.8. *Cyclamen pseudibericum* Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. pseudibericum türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucunda etkili kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%72), 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%70) içeren MS besi yerinde kültüre alınan ovül eksplantlarında meydana gelmiştir. Kallusların koyu kahverengi sert ve kompakt yapıda oldukları saptanmıştır. Kallus üzerinde globular embriyo benzeri yapılar meydana gelse de mikroskopik incelemeler sonucunda bu yapıların embriyo olmadıkları saptanmıştır. Elde edilen kalluslardan kök oluşumları meydana gelmiş olsa da *C. pseudibericum* türünde ovül kültürü denemeleri sonucunda embriyo gelişimi ve bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir. İkinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucunda, *C. pseudibericum* türünde elde edilen kalluslar, kompakt ve beyaz renktedir. Bu bulgular, Furukawa ve ark. (2002)'nin yapmış olduğu somatik embriyogenesis çalışmasında elde edilen kallus yapıları ve renkleri ile uyum göstermektedir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. *C. pseudibericum* türünde ovül kültürü sonucu elde edilen yapılar A-B)
Ovül kültürü sonucunda elde edilen kalluslar

Çizelge 4.10. *C. pseudibercum* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo oluşumu, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D mg/l+2iP mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	2d (3.68)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	0 (0)	-	-	--
5 (1+0.1)	16bc (20.95)	-	-	-
6 (1+0.3)	18bc (22.28)	-	-	-
7 (1+0.5)	8cd (12.69)	-	-	-
8 (1+0.8)	0 (0)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	2d (3.68)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	30b (32.61)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	26bc (27.42)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	26bc (24.69)	-	-	-
13 (2+0.1)	24bc (20.95)	-	-	-
14 (2+0.3)	72a (58.66)	-	-	-
15 (2+0.5)	70a (57.51)	-	-	-
16 (2+0.8)	10cd (14.01)	-	-	-

LSD_{Kallus} =17.211(p<0.001)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir

4.2.1.9. Melody F1 Ticari Çeşidinde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

Melody F1 ticari çeşidinde 4 haftalık kültür sonunda bütün bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında kallus oluşumları gözlenmiştir. En etkili kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde %100 olarak belirlenmiştir. Kallus oluşumlarının yüksek olduğu diğer besi yerleri ise 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%72), 1.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%68) içeren MS besi yeri olarak saptanmıştır. Melody F1 ticari çeşidinde elde edilen kallusların şeffaf, beyaza yakın açık sarı veya beyaz, kırılkan ve sert yapıda olduğu gözlenmiştir. Kalluslar 4 haftada bir alt kültüre alınmışlar ve 8. hafta sonunda embriyojenik yapılar gözlenmiştir. Winkelmann ve Serek (2005) ticari siklamen çeşitlerinde yapmış oldukları ovül kültürü çalışmalarında tek genotip hariç bütün genotitlerde 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kallus oluşumunun meydana geldiğini belirtmişlerdir. Oluşan kallusların embriyoya dönüşümlerinde genotipler arasında farklılık gözlenmese de bitkiye dönüşüm konusunda farklılıkların olduğunu belirlemişlerdir. Tez çalışması kapsamında, Melody F1 ticari çeşidinde ovül kültürü denemeleri sonucunda bütün kombinasyonlarda gelişim gözlenmiştir fakat Winkelmann ve Serek (2005)'den farklı olarak embriyo oluşumlarında konsantrasyonlara göre farklılık meydana gelmiştir. Ayrıca tez kapsamında, ovül kültürü denemelerinde genotip etkisi göz önünde bulundurulmasa da farklı saksılardan alınan ovül eksplantlarında embriyo ve bitkiye dönüşümlerde farklılık gözlenmiştir (Şekil 4. 30).

Embriyolar görülmeye başladığında eksplantlar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde aydınlık ortamda (16/8 fotoperiyod gösteren büyütme odasında) kültüre alınmışlardır. Globular, kalp, torpedo ve kotiledon olmak üzere kalluslardan meydana gelen embriyolarda farklı aşamalar gözlenmiştir. Embriyo oluşumu en fazla 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%94) içeren MS ortamında saptanmış ve bunu 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%76) içeren MS ortamı takip etmiştir. Embriyolar büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alındıktan 2 hafta sonra kotiledonlar ve mikro yumru oluşumları

gözlenmeye başlamıştır. Mikro yumruların oluşumundan 1 hafta sonra hormonsuz MS ortamında spontane kök oluşumu görülmüştür. Kotiledonların ve köklerin gelişmeye başlamasından sonra eksplantlar 50 ml MS içeren magenta kaplarına transfer edilmiştir. Bitkiye dönüşümün en fazla olduğu embriyoların 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%100) içeren MS ortamında elde edilen embriyolardan geliştiği saptanmıştır. Embriyoların bitkiye dönüşümünün en fazla olduğu diğer besi yeri ise 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%80) içeren MS ortamı olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bitkilerin aklimatizasyonu gerçekleştirilmeden önce 100 ml 0.5 g/l aktif karbon içeren MS ortamında filtreli kaplarda kültüre alınmışlardır. Aklimatizasyon sonrasında en yüksek yaşama oranı 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde elde edilen embriyoların oluşturduğu bitkiler olduğu saptanmıştır (%100) (Şekil 4.30). Bu oranı 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%84.21) ve 2 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%73.91) içeren MS besi yerinde meydana gelen embriyolardan oluşan bitkiler takip etmektedir. Püschel ve ark. (2003) *Cyclamen* türlerinde eksplantların mevsimlere göre kallus ve embriyo oluşumlarını incelemiştir. Yapılan tez çalışmasında, doğal türlerle çalışıldığı için mevsim etkisi incelenememektedir. Fakat Melody F1 ticari çeşidinde çiçeklenme uzun sürmektedir.



Şekil 4.30. Melody F1 ticari çeşidinde ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen yapılar, A) Ovül kültüründe 4.haftada elde edilen embriyogenik kalluslar, B) Embriyogenik kalluslardan elde edilen farklı gelişim evrelerindeki embriyolar, C) Embriyoların olgunlaşması ile oluşan kök ve sürgün benzeri yapılar, D) Ovül eksplantlarından elde edilen bitkicikler

Bitkilerin dışarı aktarıldıktan 5 ay sonra çiçek tomurcuğu oluşturduğu gözlemlenmiş ve tomurcuklar oluştuktan 1 hafta sonra çiçekler açmaya başlamıştır.



Şekil 4.31. Melody F1 ticari çeşitte aklimatizasyon aşamaları A) Hormonsuz MS içeren filtreli kaplardan çıkarılan bitkiler, B) Bitkilerin ayrılması, C) Bitkilerin musluk suyu altında bekletilmesi, D) Bitkilerin %0.1'lik fungusite daldırılması, E) Fungusite daldırılan bitkilerin köklerinin suda yıkanması, F) Bitkilerin saksılara alınması, G) Saksılara aktarılan bitkilerin üzerine magenta kapatılarak serada kültüre almak için hazır hale getirilmesi

4.2.1.10. Melody F1 Ticari Çeşidinde Flow Sitometri Analizleri

Melody F1 ticari çeşitte ovül kültürü denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler dış koşullara aktarıldıktan sonra ploidi seviyelerini belirlemek amacı ile flow sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin hazırlanışında standart olarak arpa bitkisi kullanılmıştır. Örnekler bir birim Melody F1 yaprağına iki birim arpa yaprağı olacak şekilde hazırlanmıştır. Flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen bitkilerin diploid olduğu belirlenmiştir. Melody F1 ticari çeşidinde *C. persicum* türünde olduğu gibi gelişen kallus ve embriyo yapılarının ovül

eksplantlarının dış yüzeyindeki diploid dokulardan meydana geldiği düşünülmektedir. Flow sitometri analizleri sonucunda bitkilerin genom ağırlıkları da belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Melody F1 ticari çeşitte seraya aktarılan bitkilerin genel görünümü ve çiçeklenmesi

Çizelge 4.11. Melody F1 ticari çeşitte birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşayan bitki /Aktarılan bitki (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	32e (32.99)	0 (0)	0	0
2 (0.5+0.3)	38e (37.62)	0 (0)	0	0
3 (0.5+0.5)	44de (41.09)	6ef (9.00)	14d (17.27)	12/24 (%50)
4 (0.5+0.8)	36e (36.59)	0 (0)	0	0
5 (1+0.1)	12f (18.00)	0 (0)	0	0
6 (1+0.3)	28e (31.11)	0 (0)	0	0
7 (1+0.5)	40de (39.13)	6ef (11.06)	22cd (26.53)	13/38 (%34.21)
8 (1+0.8)	46cde (42.69)	16cde (18.00)	12d (20.06)	0
9 (1.5+0.1)	36e (36.25)	22c (27.17)	38c (37.80)	3/9 (%33.3)
10 (1.5+0.3)	8f (14.75)	0 (0)	0	0
11 (1.5+0.5)	58bcd (49.84)	4ef (7.37)	26cd (29.78)	3/10 (%30)
12 (1.5+0.8)	68b (55.83)	22cd (24.64)	28cd (31.16)	3/16 (%18.75)
13 (2+0.1)	64bc (53.35)	8def (12.69)	30cd (32.31)	14/30 (%46.6)
14 (2+0.3)	64bc (53.17)	14cde (14.31)	46c (39.51)	23/34 (%67.64)
15 (2+0.5)	100a (90.00)	94a (78.94)	100a (90.00)	66/66 (%100)
16 (2+0.8)	74b (60.04)	76b (61.20)	80b (66.51)	46/54 (%85.18)

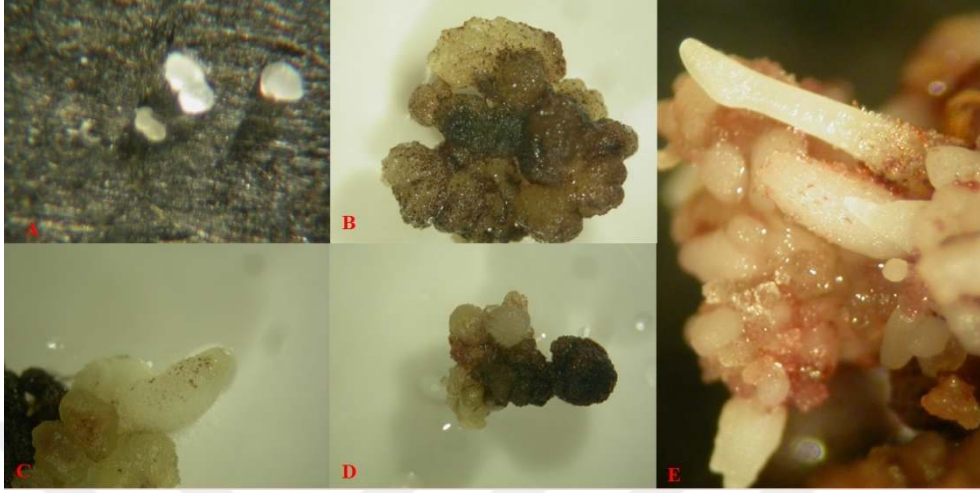
LSD_{Kallus}=11.99, LSD_{Embriyo}=13.51, LSD_{Bitki}=16.66 (p<0.001)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.1.11. Melody F1 Ticari Çeşidinde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

Melody F1 ticari çeşidinde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonuçlarına benzer olarak kontrol grubu hariç bütün konsantrasyonlarda kallus gelişimi gözlenmiştir. Kallus gelişiminin en etkili olduğu besi yerinin 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yeri (%100) olduğu saptanmıştır. Kallus gelişimlerinin en fazla olduğu diğer besi yerleri sırası ile 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%82), 2 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yerleri olarak tespit edilmiştir. Kallus yapıları mikroskopik araştırmalar sonucunda başlangıçta şeffaf, beyaza yakın açık sarı, kırılğan ve kompakt olarak belirlenmiştir. Kalluslar 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Ovül eksplantlarından elde edilen kalluslarda 2. alt kültürde (8. Hafta) embriyojenik yapıların meydana geldiği gözlenmiştir.

Embriyoların görülmeye başlaması ile birlikte eksplantlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alınmışlardır. Eksplantlar üzerinde embriyoların farklı aşamaları mikroskop yardımı ile görüntülenmiştir. Kalluslardan embriyoya dönüşümün en iyi olduğu besi yeri 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%100) içeren MS besi yeri olduğu saptanmıştır. Embriyoya dönüşümün en iyi olduğu diğer besi yerleri ise 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%46) içeren MS besi yerinde saptanmıştır. Eksplantların üzerinde globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamaları mikroskop altında gözlenmiştir. Bitkiye dönüşümün en fazla olduğu eksplantlar ise 1.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP (%62), 2 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%54) içeren MS besi yerinde kültüre alınan ovül eksplantlarında elde edilen embriyolardan meydana geldiği saptanmıştır. Kotiledonlar meydana geldikten sonra mikroyumru ve kök oluşumları meydana gelmiştir. Gelişen bitkiler daha sonra 50 ml hormonsuz MS içeren besi yerlerinde kültüre alınmış ve burada gelişimine devam etmişlerdir. Elde edilen bitkiler filtreli kaplar içerisinde 100 ml hacim olacak şekilde 0.5 g/l aktif karbon içeren MS besi yerinde kültüre alınmışlardır.



Şekil 4.33. Melody F1 ticari çeşitte ikinci dönem ovül kültüründe elde edilen yapılar
 A) Başlangıç materyali olarak kullanılan ovül eksplantları, B) Embriyojenik kallusların oluşmaya başlaması, C) Embriyojenik kalluslardan meydana gelen embriyolar, D) Globular aşamadaki embriyolar, E) Torpedo aşamasındaki embriyoların kotiledon aşamasına geçmeye başlaması

Bitkiler kültür kaplarında 1 ay süre ile kültüre alındıktan sonra dış ortama aktarılmıştır (Şekil 4. 34). Dış ortama aktarılan bitkilerin yaşama oranları Çizelge 4.12. deki gibidir. En yüksek yaşama oranı 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde meydana gelen embriyolardan elde edilen bitkilerde gözlenmiştir. Bitkiler dışarı aktarıldıktan sonra ilk bir haftalık sürede günde 3 defa her sulamada 100 ml olacak şekilde sprey ile püskürtme yöntemi ile sulanmıştır. Bir haftadan sonra bitkiler tavalara dökülen su ile dipten sulanmıştır. Bitkilerin vejetatif olarak güçlenmesi için gübreleme yapılmıştır. Gübre uygulamalarından sonra yumru çaplarında, yaprak sayılarında ve yaprak boylarında artış gözlenmiştir. Dışarı aktarılan bitkilerde 4 ay sonra çiçeklenme meydana gelmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.34. Melody F1 ticari çeşitte elde edilen bitkiler A) Hormonsuz MS besiyeri içeren filtreli kültür kaplarındaki bitkiler, B) Bitkilerde meydana gelen kök yapıları, C) Bitkilerin saksılara aktarılmadan önceki durumu D) Dış ortama aktarılan bitki



Şekil 4.35. Melody F1 ticari çeşitte dış ortama aktarılan bitkilerin gelişimi ve çiçek tomurcuklarının oluşumu, A) Saksılara aktarılan bitkilerin yapraklarının gelişimi, B) Çiçek tomurcuklarının meydana gelmesi, C) Antesis aşamasındaki çiçek tomurcukları, D) Çiçeklerini açmış olan bitkiler

4.2.1.12. Melody F1 Ticari Çeşidinde İkinci Dönem Ovül Kültürü Sonucu Elde Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Elde edilen bitkilerin flow sitometri analizleri sonucunda diploid ($2n$) olduğu saptanmıştır. Melody ticari çeşidinde de ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen bitkilerin, ovül eksplantlarının dış yüzeyindeki diploid yapıdan meydana gelen kallus ve embriyolardan oluştuğu düşünülmektedir. İkinci dönem ovül kültürü sonucunda elde edilen bitkiler, morfolojik olarak eksplantların temin edildiği ana bitki ile aynı özellikleri taşımaktadır. Elde edilen bitkilerin yaprak ayası şekli, çiçek rengi, yaprak alt yüzey rengi ana bitki ile aynı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Melody F1 ticari çeşitte ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	52defg (46.15)	0 (0)	0	0
2 (0.5+0.3)	32gh (34.24)	0 (0)	0	0
3 (0.5+0.5)	60de (50.99)	0 (0)	0	0
4 (0.5+0.8)	44efgh (41.48)	0 (0)	0	0
5 (1+0.1)	28h (31.28)	0 (0)	0	0
6 (1+0.3)	44efgh (41.48)	16de (23.31)	12ef (15.94)	8/13 (61.53)
7 (1+0.5)	62cde (52.20)	10ef (11.95)	8ef (12.69)	0
8 (1+0.8)	38fgh (37.15)	14de (19.63)	14de (19.33)	5/19 (%26.31)
9 (1.5+0.1)	68bcd (55.71)	54b (47.30)	62ab (52.07)	28/63 (%44.4)
10 (1.5+0.3)	36h (33.04)	2f (3.68)	2f (3.68)	0
11 (1.5+0.5)	56def (48.68)	24de (25.84)	32cd (34.11)	11/20 (%55)
12 (1.5+0.8)	80bc (63.44)	18de (19.62)	22de (24.64)	6/13 (%46.15)
13 (2+0.1)	64cde (53.22)	30cd (32.31)	52bc (46.38)	17/26 (%65.38)
14 (2+0.3)	64cde (53.22)	30cd (31.84)	54bc (47.35)	27/38 (%71.05)
15 (2+0.5)	100a (90.00)	100a (90.00)	76a (63.68)	100/115 (%86.95)
16 (2+0.8)	82b (65.36)	46bc (41.57)	48bc (43.20)	46/62 (%74.19)

LSD_{Kallus}=12.01, LSD_{Embriyo}=14.32, LSD_{bitki}=15.38(p<0.001)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açığı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.2. Sonbaharda Çiçeklenen *Cyclamen* Türlerinde Ovül Kültürü Bulguları

Sonbaharda çiçeklenen türler doğadan toplanarak Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Süs bitkileri serasında 1:1 oranında torf ve perlit içeren saksılarda kültüre alınmıştır. Bitkilerin kültürel bakım işlemleri yapıldıktan sonra ovül kültürü için çiçek tomurcukları alınmıştır. Ovül kültürü denemelerinde, anter kültürü için belirlenmiş olan tomurcuk boyları ile aynı veya hemen hemen aynı veya 1 mm büyük olan tomurcuklardan elde edilen ve anthesis aşamasına gelmemiş tomurcuklardan alınan ovüller kullanılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılan çiçek tomurcuklarının sırasıyla çanak yaprak, taç yaprak ve anterleri çıkarılmıştır. Ovaryum zarı da çıkarıldıktan sonra ovüller, öze ve steril şırınga uçları ile 2.4D (0.5, 1, 1.5, 2 mg/l) ve 2iP (0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg/l) 'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında deneme deseninde belirtilen şekilde kültüre alınmıştır.

4.2.2.1. *Cyclamen hederifolium* Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. hederifolium türünde en etkili kallus gelişimi %90 ile 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde gözlenmiştir (Çizelge 4. 13). Kallusların açık sarı, şeffaf, kırılgan yapıda oldukları mikroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Elde edilen kalluslarda embriyo benzeri yapılar gözlemlense de bu yapıların kallus oldukları tespit edilmiştir. *C. hederifolium* türünde etkili kallus oluşumunun gözlemlendiği diğer besi yeri de 1mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren MS besi yeri olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda da meydana gelen kallusların yapılarının, açık sarı, şeffaf ve kırılgan oldukları gözlenmiştir. *C. hederifolium* türünde kalluslardan embriyoya dönüşüm gözlenmemiştir (Şekil 4. 36). Elde edilen kalluslara her 4 haftada bir alt kültür uygulanmıştır. İkinci alt kültür sonunda kallusların koyu kahverengiye döndüğü, yumuşadığı ve canlılığını yitirdiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmaya benzer olarak, Seyring ve ark. (2009) *C. hederifolium* türünde yapmış oldukları çalışmada, ovaryum, yaprak, yaprak sapı ve

çiçek sapı eksplantlarını, 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS ve 1.5 mg/l BAP ve 1mg/l IAA içeren N69 besi yerlerinde kültüre almışlardır. Araştırmacılar, ovaryum eksplantlarında kallus elde etmişler fakat bitkiye dönüşüm sağlayamamışlardır.



Şekil 4.36. *C. hederifolium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemeleri sonucu elde edilen yapılar, A-B) Ovül eksplantlarından meydana gelen kallus yapıları

Çizelge 4.13. *C. hederifolium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

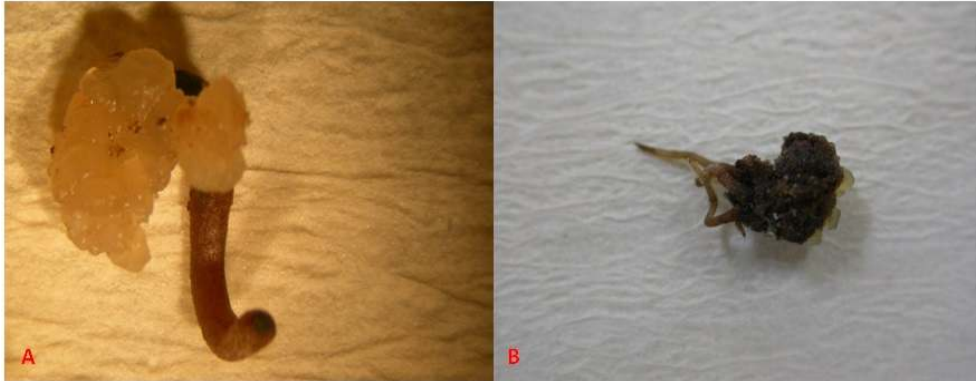
Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	4ef (7.37)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	6de (11.06)	-	-	-
5 (1+0.1)	30c (32.31)	-	-	-
6 (1+0.3)	66b (54.68)	-	-	-
7 (1+0.5)	90a (75.69)	-	-	-
8 (1+0.8)	12d (18.84)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	4ef (7.37)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	4ef (7.37)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	6def (9.00)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	0 (0)	-	-	-
13 (2+0.1)	0 (0)	-	-	-
14 (2+0.3)	0 (0)	-	-	-
15 (2+0.5)	0 (0)	-	-	-
16 (2+0.8)	0 (0)	-	-	-

LSD_{Kallus}=10.39 (p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açığı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.2.2. *Cyclamen hederifolium* Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

Ovüller materyal metoda da belirtilen deneme desenine göre MS besiyerinde kültüre alınmıştır. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri bulguları birinci dönem ovül kültürü bulguları ile benzerlik göstermiştir. Kallus gelişimlerinin en iyi olduğu ortam 1 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%62) içeren MS besiyeri olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.14) (Şekil 4.37). Kallusların açık sarı ve koyu sarı, sert ve kompakt yapıda olduğu mikroskopik araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Kalluslar her 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Kallusların renkleri 12 hafta sonra koyu sarı ve kahverengiye dönmüş, sertleşen kallusların üzerinde embriyo benzeri yapılar gözlemlense de kalluslardan embriyoya dönüşüm gözlemlenmemiştir. Kalluslar daha sonra koyulaşarak kararık canlılıklarını yitirmişleridir (Şekil 4.38).



Şekil 4.37. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinde elde edilen sürgün benzeri yapılar, A) Ovül eksplantlarından elde edilmiş olan embriyo benzeri yapılardan meydana gelen sürgün benzeri yapılar, B) Sürgün ve kök benzeri yapılar

Çizelge 4.14. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	0 (0)	-	-	-
2 (0.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
3 (0.5+0.5)	2c (3.68)	-	-	-
4 (0.5+0.8)	4c (7.37)	-	-	-
5 (1+0.1)	16b (23.31)	-	-	-
6 (1+0.3)	16b (23.02)	-	-	-
7 (1+0.5)	62a (52.02)	-	-	-
8 (1+0.8)	4c (7.37)	-	-	-
9 (1.5+0.1)	22b (27.17)	-	-	-
10 (1.5+0.3)	0 (0)	-	-	-
11 (1.5+0.5)	2c (3.68)	-	-	-
12 (1.5+0.8)	4c (5.31)	-	-	-
13 (2+0.1)	0 (0)	-	-	-
14 (2+0.3)	0 (0)	-	-	-
15 (2+0.5)	0 (0)	-	-	-
16 (2+0.8)	0 (0)	-	-	-

LSD_{Kallus}=8.013(p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açığı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

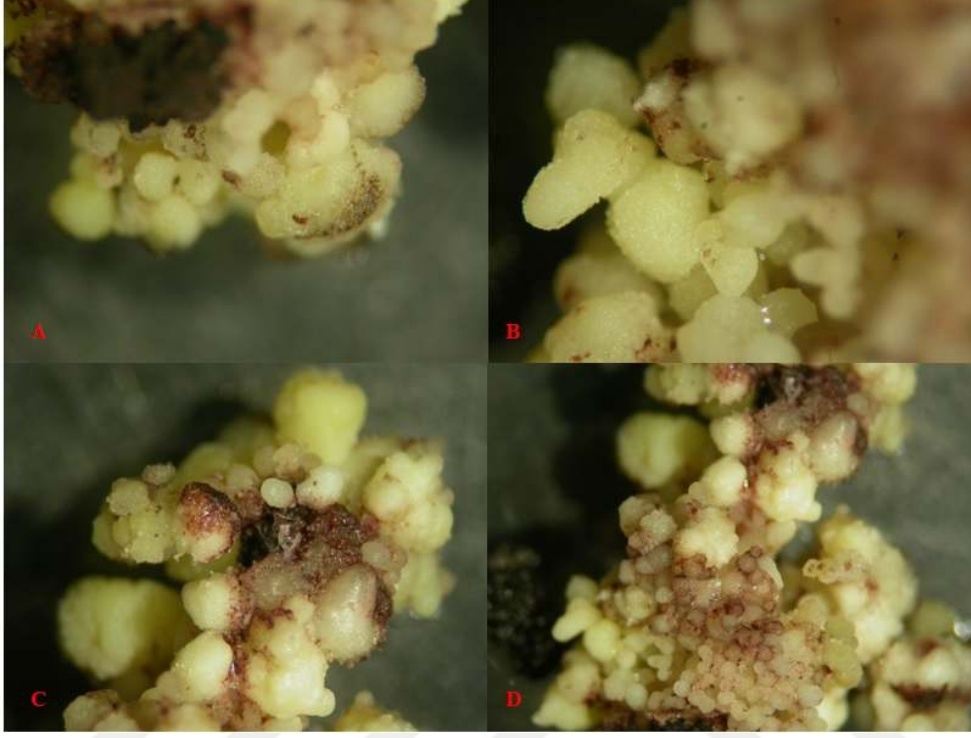


Şekil 4.38. *C. hederifolium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemeleri sonunda elde edilen yapılar, A) Embriyo benzeri yapıların meydana gelmesi, B) Torpedo aşamasındaki embriyo, C) Sürgün ve kök benzeri yapılar D) Sürgüne oluşumu

4.2.2.3. *Cyclamen cilicium* Türünde Birinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. cilicium türünde diğer türlerden farklı olarak kültüre alınan ovüller karardıktan sonra kallus oluşturmaya başlamışlardır. Bu türde en etkili kallus oluşumu, 0.5mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP (%68) ve 0.5mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%66) içeren MS besiyeriinde gözlenmiştir. *C. cilicium* türü tez çalışmasında kullanılan diğer türlere oranla daha düşük oksin konsantrasyonlarında etkili gelişim göstermiştir. Elde edilen kallusların siyah, sert, kompakt yapıda oldukları mikroskopik incelemeler sonunda belirlenmiştir. İzgü ve ark. (2016), *C. cilicium*

türünde yapmış oldukları çalışmada ovül eksplantlarını 2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kültüre almışlar ve bu tez çalışmasında elde edilen kalluslara benzer olarak koyu kahverengi ve kırılğan kallus yapıları elde etmişlerdir. Yapılan çalışmadan farklı olarak, İzgü ve ark. (2016) yüksek oranda 2,4-D içeren besi yerinde kallusları elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında kalluslar, 4 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. İkinci alt kültür aşamasında kararan kalluslardan embriyoların meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.39). Bu çalışmaya benzer olarak İzgü ve ark. (2016), *C. cilicium* türünde ovül eksplantlarının kültüre alınmasından 6-7 hafta sonra kallusların oluştuğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında kallusların embriyoya dönüşümünün en yüksek olduğu besi yeri, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%94), 0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP (%90), 0.5mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%80), 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP (%72) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.15). Seyring ve ark.(2009), *C. cilicium* türünde, ovaryum, yaprak, yaprak sapı, çiçek sapı eksplantlarını 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde ve 1.5 mg/l BAP ve 1mg/l IAA içeren N69 besi yerinde kültüre almışlardır. *C. cilicium* türünde 2 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren MS besi yerinde kültüre alınan yaprak eksplantlarında kallus oluşumunun diğer eksplantlara göre daha düşük olduğunu belirlemişler ve petiol eksplantlarının en fazla sayıda somatik embriyo oluşturduğunu saptamışlardır. Tez çalışması kapsamında, *C. cilicium* türünde embriyo oluşumu görülsede, bitkiye dönüşüm gözlenmemiştir fakat Seyring ve ark.(2009) 10 ay sonunda *C. cilicium* türünde genç yaprakların meydana geldiğini belirlemişlerdir.



Şekil 4.39. *C. cilicium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinde elde edilen embriyolar, A-B-C-D) *C. cilicium* türünde elde edilen farklı gelişim aşamalarındaki embriyolar

Embriyoların farklı aşamaları mikroskop altında gözlenmiştir. Elde edilen embriyolar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyeriinde kültüre alınmıştır. Embriyolar 4 haftada bir hormonsuz MS besiyeriinde kültüre alınmıştır fakat alt kültür aşamalarında embriyoların torpedo aşamasında tutuklu kaldıkları ve kotiledonların oluşmadığı gözlenmiştir. Torpedo aşamasında tutuklu kalan embriyolardan kotiledonları oluşturmak için ve embriyoların bitkiye dönüşümünün sağlanarak normal gelişimine devam edebilmesi için MS besiyeri 1 g/l prolin ile desteklenmiştir. Prolin uygulamasından sonra eksplantlarda bir gelişim gözlenmemiş ve elde edilen embriyolarda bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Alt kültürler sonrasında embriyolarda vitrifikasyon görülmüştür. Vitrifikasyona uğrayan embriyolar canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Çizelge 4.15. *C. cilicium* türünde birinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	68a (59.31)	90ab (73.63)	-	-
2 (0.5+0.3)	56ab (49.11)	80b (64.03)	-	-
3 (0.5+0.5)	42abcde (40.28)	72bc (59.78)	-	-
4 (0.5+0.8)	66ab (54.50)	94a (81.00)	-	-
5 (1+0.1)	52abc (46.15)	52cd (45.93)	-	-
6 (1+0.3)	40abcd (40.84)	2f (3.68)	-	-
7 (1+0.5)	32bcde (34.11)	26e (27.00)	-	-
8 (1+0.8)	38bcdef (31.84)	0	-	-
9 (1.5+0.1)	16defg (18.00)	32de (33.22)	-	-
10 (1.5+0.3)	12efg (15.64)	0	-	-
11 (1.5+0.5)	52abc (43.20)	70bc (59.99)	-	-
12 (1.5+0.8)	4fg (7.37)	0	-	-
13 (2+0.1)	16cdefg (23.31)	34de (32.31)	-	-
14 (2+0.3)	0 (0)	0	-	-
15 (2+0.5)	2g (3.68)	0	-	-
16 (2+0.8)	4g (5.31)	0	-	-

LSD_{Kallus}=25.01, LSD_{Embriyo}=14.33(p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.2.4. *Cyclamen cilicium* Türünde İkinci Dönem Ovül Kültürü Bulguları

C. cilicium türünde ikinci dönem ovül bulguları birinci dönem bulguları ile oldukça benzerlik göstermektedir. Kallus oluşumunun en fazla olduğu besi yeri 1mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP (%84) içeren MS besi yeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Ovül eksplantları kültüre alındıktan 4 hafta sonra şişerek kararmaya başlamıştır. Kararan eksplantlar aynı besi yerlerinde alt kültüre alınmıştır ve ikinci alt kültürde kallus ve embriyo oluşumları gözlenmiştir. Kallus yapıları kompakt, siyaha yakın kahverengi olarak saptanmıştır. Embriyoların oluşması ile birlikte eksplantlar bitki büyüme düzenleyicis içermeyen MS besi yerinde ve aydınlık ortamda kültüre alınmışlardır. En yüksek embriyo oluşumu 0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2iP (%86) ve 0.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP (%80) içeren MS besi yerinden elde edilen kalluslardan elde edilmiştir. Bu dönemde de elde edilen embriyolarda mikroskopik incelemeler sonucunda embriyo gelişim evrelerinin bütün aşamaları aynı eksplantlar üzerinde gözlenmiştir (Şekil 4.40). Birinci döneme benzer olarak ikinci dönem ovül kültüründe elde edilen embriyolarda da torpedo aşamasında tutuklu kalma sorunu ile karşılaşmıştır. İkinci dönemde elde edilen embriyolar, birinci dönemden farklı olarak 1 g/l prolin ve 0.1 mg/l GA₃ içeren MS besi yerinde kültüre alınmışlardır. Bu uygulamalar sonuç vermemiştir ve embriyoların tutuklu kalma halleri devam etmiştir. Von Arnold ve ark. (2002) embriyoların çimlendirilmesi ve bitkiye dönüştürülmesi için bazı çalışmalarda kazein hidrolizat ve glutamin gibi kimyasalların kullanıldığını belirtmişlerdir. Aynı besi yerinde alt kültüre alınan embriyolarda birinci dönemde de meydana gelen vitrifikasyon sorunu ile karşılaşmıştır. Şeffaflaşan embriyolar canlılıklarını yitirmişlerdir. Bu türde de bitkiye dönüşüm gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.40. *C. cilicium* türünde ikinci dönem ovül kültürü sonucu elde edilen yapılar, A) Ovül eksplantlarından elde edilen embriyojenik yapılar, B) Kallusların embriyoya dönüşmesi, C) *C. cilicium* türünde meydana gelen torpedo aşamasındaki embriyolar, D) Embriyolardan elde edilen sürgün benzeri yapıların siyahlaşarak canlılıklarını yitirmesi

Çizelge 4.16. *C. cilicium* türünde ikinci dönem ovül kültürü denemelerinden elde edilen kallus, embriyo, bitkiye dönüşüm ve yaşama oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo oluşumu (%)	Bitkiye dönüşüm (%)	Yaşama oranı (%)
Kontrol (0+0)	0	0	0	0
1 (0.5+0.1)	68ab (58.71)	86a (70.67)	-	
2 (0.5+0.3)	38bcd (39.86)	44b (40.37)	-	-
3 (0.5+0.5)	46bcd (42.64)	50b (45.00)	-	-
4 (0.5+0.8)	52bcd (46.15)	80a (66.61)	-	-
5 (1+0.1)	62abc (55.20)	50b (45.00)	-	-
6 (1+0.3)	84a (74.35)	44b (40.47)	-	-
7 (1+0.5)	36bcd (36.69)	0 (0)	-	-
8 (1+0.8)	34de (29.35)	0 (0)	-	-
9 (1.5+0.1)	36cd (35.58)	80a (63.73)	-	-
10 (1.5+0.3)	36bcd (36.59)	0 (0)	-	-
11 (1.5+0.5)	32cde (33.22)	46b (42.46)	-	-
12 (1.5+0.8)	0 (0)	0 (0)	-	-
13 (2+0.1)	20de (23.78)	36b (33.46)	-	-
14 (2+0.3)	0 (0)	0 (0)	-	-
15 (2+0.5)	32de (28.15)	0 (0)	-	-
16 (2+0.8)	10ef (11.95)	0 (0)	-	-

LSD_{Kallus}=23.11, LSD_{Embriyo}=13.60(p<0.01)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

Cyclamen türlerinde ovül kültürü denemeleri sonucunda, yalnızca *C. persicum* ve Melody F1 ticari çeşidinde bitkiye dönüşüm gözlenmiştir. Elde edilen bitkilerin flow sitometri analizlerinden sonra diploid kromozom yapısına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, *Cyclamen* türlerinde ovül kültürü yöntemi haploid bitki elde etme açısından olumlu sonuçlar verememiştir. *C. coum*, *C. pseudibericum*, *C. hederifolium* ve *C. cilicium* türlerinin hepsinde kallus oluşumları gözlene de, *C. cilicium* türü haricinde diğer türlerde embriyo gelişimi yetersiz kalmıştır. *C. cilicium* türünde elde edilen embriyolar ise torpedo aşamasında tutuklu kalmıştır. Doğal yayılış gösteren ve endemik türlerde ovül eksplantları, haploid bitki elde etme açısından olumlu sonuçlar vermemiştir. *Cyclamen* türlerinde gelişimin türler arasında ve genotipler arasında farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Bunun nedeni ise rejenerasyon ve haploidizasyon çalışmaları için genetik yatkınlık kapasiteleri olduğu düşünülmektedir.

Cyclamen türlerinde ovül ve anter kültürü denemeleri sonucunda, ovül eksplantlarında rejenerasyon yüzdelерinin anter eksplantlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gynogenesis çalışmaları ile haploid bitki elde edilmesi siklamen türlerinde olumlu sonuçlar vermemiş olsa da, hıyar, kavun, kabak gibi Cucurbitaceae familyasına ait türlerde oldukça başarılıdır. Hıyar çeşitlerinde yapılan çalışmalarda bitkilerin tomurcukları genelde antesis aşamasından bir gün önce toplanmıştır (Gemes-Juaszi ve ark., 1997; Suprunova ve Shymkova, 2008; Diao ve ark., 2009; Li ve ark., 2013; Moqbeli ve ark., 2013; Plapung ve ark., 2014; Tantasawat ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında ise ovül kültürü denemeleri için anter kültüründe belirlenen tek çekirdekli evredeki mikrosporların bulunduğu tomurcuklar kullanılmıştır. Ovül kültürü çalışmalarında önemli olan nokta çiçeklerin açmamış ve döllenmenin meydana gelmemiş olmasıdır. Hıyarda yapılan ovül ve ovaryum kültürü çalışmalarında, 4-5°C soğuk uygulamalarının haploid bitki uyarımına olumlu etkileri olmuştur. Siklamen türlerinde ise hıyar çeşitlerinin aksine soğuk uygulamalarının ovül kültürü üzerine etkileri saptanmamıştır. Hıyar çeşitlerinde ovül kültürü çalışmalarında NAA, TDZ, BA bitki büyüme

düzenleyicileri ile MS ve CBM besi yerleri yaygın olarak kullanılmıştır (Gemes-Juaszi ve ark., 2002, 1997; Suprunova ve Shymkova, 2008; Diao ve ark., 2009; Li ve ark., 2013; Moqbeli ve ark., 2013; Plapung ve ark., 2014; Tantasawa ve ark., 2014). Siklamen türlerinde yapılan ovül kültürü çalışmalarında ve bu tez çalışmasında da MS besi yeri ve 2,4-D ve 2 iP yaygın olarak kullanılan büyüme düzenleyicileridir (İzgu ve ark., 2016; Koçak ve ark., 2014; Winkelmann ve ark., 2010). Kavunda yapılan gynogenesis çalışmasında ise bölünmüş ovaryumlar, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kavunda ovaryum kültürü çalışmalarında tomurcuklar anthesis aşamasında alınmış ve 4 gün +4 °C soğuk uygulaması yapılmıştır. Tez çalışmasında ise soğuk uygulaması 2 gün boyunca yapılmış fakat haploid bitki oluşumu gözlenmemiştir. Kavunda ovaryum kültürü çalışmalarında, MS besi yeri ve TDZ, BA ve NAA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır (Malik ve ark., 2011; Ficcidenti ve ark., 1999; Gemesne-Juaszi ve ark., 1997). Cucurbitacea familyasına ait türlerde ovül ve ovaryum kültürü denemelerinde etkili karbon kaynağı 30-40 g/l olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında siklamende ovül kültürü denemelerinde Cucurbitaceae türlerine benzer şekilde 30 g/l süktroz kullanılmıştır ve *C. persicum* ve Melody F1 türlerinde bitkiye dönüşüm gözlenmiştir.

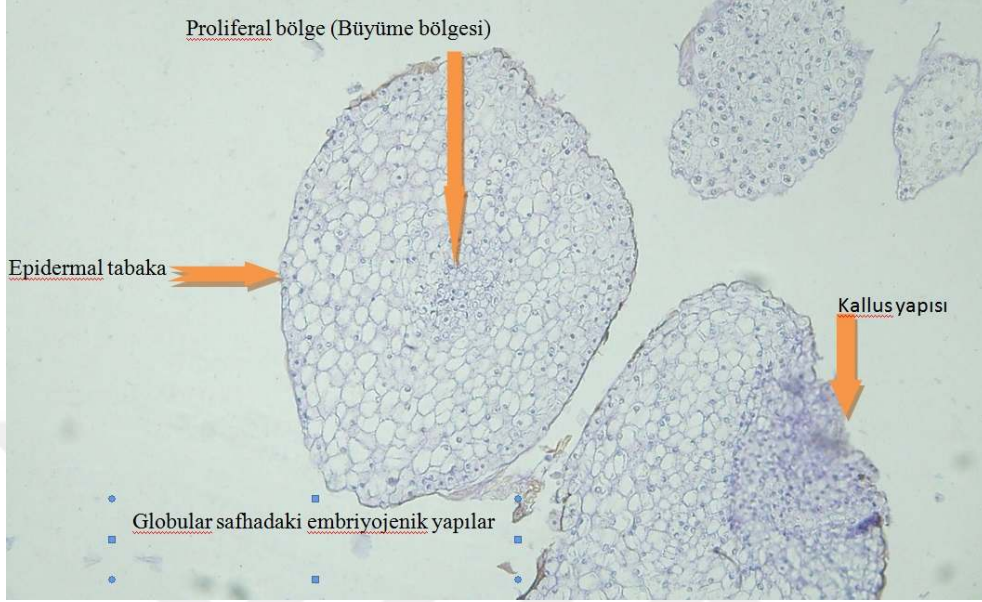
Kavun çeşitlerinde haploid bitki elde etmek için en etkili yöntemin ışınlanmış polen tekniği olduğu bilinmektedir. Sarı ve ark.(1994) yapmış oldukları çalışmada kavunda ışınlanmış polen tekniği ile haploid bitkiler elde edilmiştir. Siklamen türlerinde haploidizasyon çalışmaları yalnızca anter kültürü tekniği ile sınırlı kalmıştır. Ovül eksplantları ise somatik embriyo çalışmalarında kullanılmasının yanı sıra haploid bitki elde etme açısından kullanışlı değildir.

4.3. *Cyclamen* Türlerinde Histolojik Analiz Bulguları

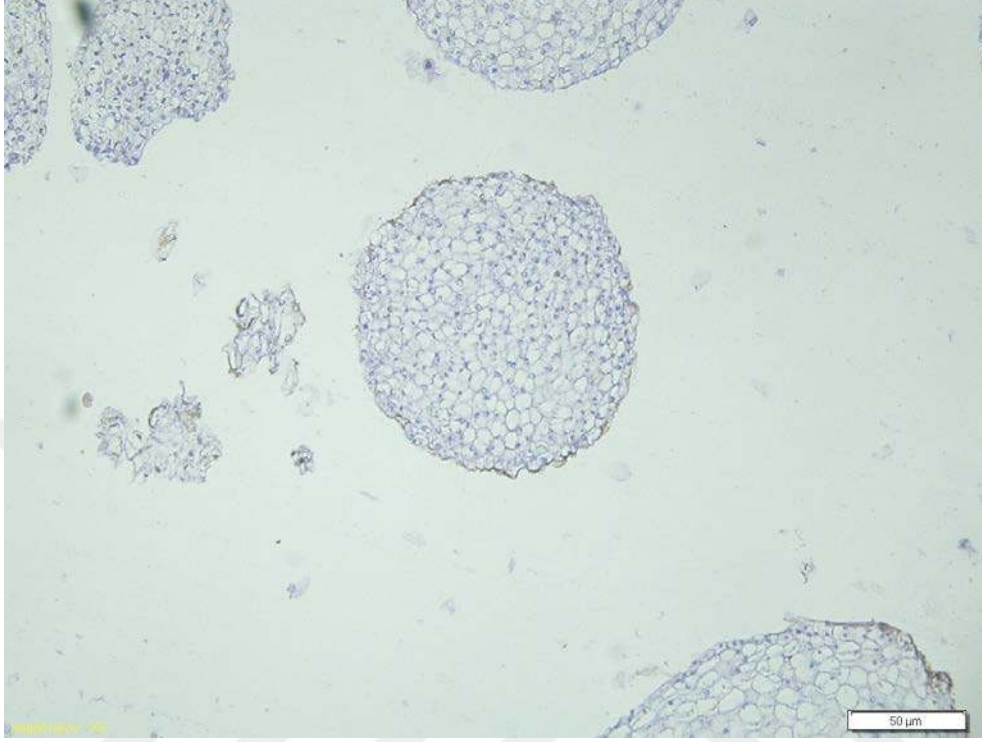
Cyclamen türlerinde 8 hafta boyunca kültüre alınmış olan ovül eksplantlarından meydana gelen embriyojenik kallus ve embriyolarda histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kallus dokuları ve embriyojenik dokuların

hücreleri arasındaki farklılıklar ortaya konulmuştur. Kallus dokularındaki hücrelerin hücre zarlarının belirgin bir şekillerinin olmadığı, embriyolardaki hücrelerde ise hücre zarlarının şekillendiği ve hücrelerin kallus dokularına göre daha düzenli sıralandığı tespit edilmiştir. Büyüme bölgelerinin embriyojenik yapıların merkezinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.41) (Şekil 4.42). Büyüme bölgelerinde bulunan hücrelerinin büyüme merkezlerine doğru gidildikçe küçüldüğü, kallus hücrelerine benzer yapı kazandığı gözlenmiştir. Wicart ve ark., (1984) *C. persicum* türünde embriyogenesis ve organogenesis oluşumlarını histolojik olarak incelemişler ve ovül, yaprak, yaprak sapı eksplantlarını kültüre almışlardır. Organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşumlarını karşılaştırmışlardır. Somatik embriyolarda bipolar yapıların oluştuğunu ve meydana gelen embriyoların ve mikro yumruların kalluslar ile vasküler bağlantılarının bulunmadığını belirtmişlerdir. Organogenesis sırasında ise oluşan tek kutuplu yapıların, kallus ile vasküler bağlantılarının olduğunu saptamışlardır. Tez çalışmasında, 8 hafta sonunda yalnızca globular embriyo elde edildiği için bu süre içerisinde embriyoların bipolar olup olmadığı hakkında net bir görüntü ortaya konulamamıştır.

Sevindik (2014), *Crocus* türlerinde yapmış olduğu somatik embriyogenesis çalışmasında embriyojenik kallus ve embriyoları histolojik olarak incelemiştir. Tez çalışmasında elde edilen bulgulara benzer olarak *C. sativus* türünde meydana gelen kallus dokularının daha düzensiz hücre dizilimine ve şekline sahip olduklarını belirtmiştir. Kallusların apikal tomurcukların bulunduğu yerde oluşmaya başladıklarını saptamıştır. Tez çalışmasından farklı olarak, safranda elde edilen kallus yapılarında vakuoller arası boşlukların fazla olduğunu gözlenmiş fakat *Cyclamen persicum* ve *C. cilicium* türlerinde elde edilen kallus ve embriyolarda vakuoller arası boşlukların fazla olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.41. *C. cilicium* türünde ovül kültürü denemelerinde meydana gelen globular embriyoların histolojik analiz sonucunda görünümü



şekil 4.42. *C. persicum* türünde ovül kültürü denemelerinde meydana gelen globular embriyoların histolojik analiz sonucunda görünümü



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz, coğrafi konuma itibari ile üç farklı floranın (Avrupa Sibirya, İran-Turan, Akdeniz) kesişim noktasında bulunduğu için oldukça zengin genetik kaynaklara sahiptir. Yaklaşık 12.500 türün 3.500'den fazlası endemiktir. Bu türler arasında 700 adet civarında geofit olarak bilinen soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitkiler bulunmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren en önemli geofitlerden bazıları da *Cyclamen* cinsi içerisinde bulunan türlerdir.

Cyclamen cinsi Myrsinaceae familyasına aittir. Dünya üzerinde 22 tür ile temsil edilen bu familyanın ülkemizde yayılış gösteren 10 türü mevcuttur. Ülkemizde yayılış gösteren türler *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile* ve *C. greacum*'dur. Bu türlerin 6 tanesi endemik olarak yayılış göstermektedir. Siklamen türlerinin ülkemizde doğal olarak yayılış göstermesi ve endemik türlerin fazla olması Türkiye'nin süs bitkileri sektörü açısından oldukça önemli materyallere sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Dünyada süs bitkileri sektöründe en çok kullanılan siklamen türü mevcut ticari çeşitlerin atası olarak bilinen *C. persicum* türüdür. *C. persicum* türünde ıslah çalışmaları klasik melezlemeler ile yapılmakla birlikte, bazı siklamen türlerindeki kendileme depresyonu gibi döllenme bozuklukları bu türün ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. İslahta kullanılan en önemli biyoteknolojik yöntemlerden biri de haploidizasyon yöntemidir. Haploidizasyon yöntemi, ıslah çalışmalarında kullanılacak olan saf hatların elde edilmesini kolaylaştırmakta, klasik yöntemlere göre çok daha kısa sürede %100 saf hatların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ülkemizde süs bitkileri sektöründe en önemli sorunların başında ıslah materyallerinin üretilmesinde dışa bağlı kalarak her yıl çok fazla miktarda royaltite (ıslahçı hakkı) ödemek zoruna kalmamız gelmektedir. Bu sorunun giderilmesi için kendi çeşitlerimizi geliştirmemiz

gerekmektedir. Bu tez kapsamında, siklamen türlerinde saf hatların geliştirilmesi için ilk adım olan haploid bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen haploid bitkilerin kromozomlarının katlanarak dihaploid bireylere çevrilmesi ile ıslah materyali olarak kullanılacak saf hatların elde edilmesi sağlanacaktır.

Tez kapsamında anter ve ovül eksplantlarının *in vitro*'da kültüre alınması ile haploid bitkilerin elde edilmesi amaçlanmış ve elde edilen bulguların sonuçları maddeler halinde sıralanmıştır.

- Haploidizasyon çalışmalarında en önemli unsur geç tek çekirdekli ve erken çift çekirdekli evreye sahip olan mikrospor hücrelerini içeren anterlerin bulunduğu tomurcukların boylarının belirlenmesidir. Tez kapsamında siklamen türlerinde farklı boylardaki tomurcuklardan alınan anter eksplantları DAPI ile boyanmış ve tek çekirdekli mikrospor hücrelerine sahip olan tomurcuk boyları *C. persicum* türünde 6.98-7.66 mm, *C. coum* türünde 5- 5.42 mm, *C. pseudibericum* türünde 7.55 mm, Melody F1 ticari çeşidinde 7.05 mm, *C. hederifolium* türünde 8.05-9.05 mm, *C. cilicium* türünde 4.74- 5.93 mm olarak belirlenmiştir. Tek çekirdekli evrelerin belirlenmesinde, DAPI ile boyama yönteminin kolay uygulanabilir ve çabuk sonuç veren bir yöntem olduğu saptanmıştır.
- Tek çekirdekli evresi belirlenen tomurcuklara ovül ve anter kültürü denemelerinden önce 2 gün boyunca +4 °C soğuk uygulaması yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında soğuk uygulamalarının olumlu etkileri net olarak ortaya konulamamıştır. Siklamen türlerinde ileride yapılacak olan çalışmalarda soğuk uygulamalarının veya sıcak şoku uygulamalarının türlere göre farklı süre ve sıcaklıklarda denenmesi önerilmektedir.
- Anter kültürü denemeleri için NAA, AgNO₃ ve aktif karbonun farklı konsantrasyonlarını içeren B5 besi yeri kullanılmıştır. Denemeler sonucunda yalnızca *C. persicum* türünde 1 µM, 3 µM, 5 µM NAA içeren

B5 besi yerinde haploid embriyoların meydana geldiği saptanmıştır. Meydana gelen embriyoların tek genotipten alınan anterlerde olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla siklamen türlerinde genotip etkisi anter kültürü yönteminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca siklamen türünde anter kültürü ile haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan AgNO_3 ve aktif karbon uygulamalarının önemsiz olduğu ortaya konulmuştur. Bu bulgudan yola çıkarak siklamen türlerinde haploidizasyon çalışmalarına başlanmadan önce başlangıç materyali olarak kullanılacak olan genotiplerin genetik yatkınlıklarının ön denemeler ile kontrol edilmesi önerilmektedir.

- *C. persicum* türünden elde edilen haploid embriyolar globular ve torpedo evrelerinde tutuklu kaldıktan sonra prolin, spermin, GA_3 ve BA içeren MS besi yerinde kültüre alınmış ve çimlenme meydana gelmiştir. Siklamende anter kültürü sonucu elde edilen yapıların çimlendirilmesi için farklı besi yeri ve farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak denemeler kurulabilir.
- Elde edilen embriyoların, embriyolardan meydana gelen kallusların flow sitometri analizleri sonucunda haploid olduğu, bu embriyolardan meydana gelen bitkilerin ise diploid olduğu belirlenmiştir. Embriyoların bitkiye dönüşümleri sırasında spontan katlanma durumu saptanmıştır. Bu konu üzerine moleküler çalışmaların yapılması, siklamen türünde spontan katlanma olayına önemli derecede ışık tutacaktır.
- Siklamende anter kültürü sonucu Melody F1 ticari çeşidinde anter duvarlarından meydana gelen kalluslarda embriyoların olduğu saptanmıştır. Anter kültürü yönteminde anterleri kültüre alırken dikkat edilmesi gereken nokta anter duvarlarına zarar vermeden ve diploid hücrelerin gelişimine katkı sağlamayacak şekilde kültüre alınmasıdır. *C. hederifolium* türünde 5 μM NAA içeren B5 besi yerinde sürgün ve kök benzeri yapılar elde edilmiş, fakat sürgün ve kök benzeri yapılar canlılığını

yitirmiştir. Siklamen türlerinde türlerin gelişimlerine göre farklı besi yeri denemeleri yapılması önerilmektedir. Ayrıca farklı büyüme düzenleyicileri, farklı karbon kaynakları ve farklı ön uygulamalar denenerek doğal yayılış gösteren türlerde ve endemik türlerde haploidizasyon çalışmalarının daha kapsamlı incelenmesi önerilmektedir.

- Siklamen türlerinde ovül kültürü denemeleri sonucunda bütün türlerde kallus oluşumları meydana gelmiş fakat embriyo oluşumu *C. persicum*, *C. cilicium* ve Melody F1 ticari çeşitte gözlenmiştir. Bitkiler ise yalnızca *C. persicum* ve Melody F1 ticari çeşitte elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerin flow sitometri analizleri sonucunda diploid olduğu belirlenmiştir.
- Siklamen türlerinde haploid bitki elde etmek için alternatif yöntem olarak ışınlanmış polen tekniği denenmelidir.
- Siklamen türlerinde haploidizasyon çalışmalarında ovül kültürü yöntemi ile türlerin hiçbirinde haploid yapılar elde edilmemiştir. Dolayısıyla siklamende ovül kültürü yöntemi haploidizasyon çalışmalarına uygun bir teknik değildir. Ovüllerde meydana gelen kallus ve embriyo gibi yapıların, ovülleri saran diploid yapıdaki zardan meydana geldiği düşünülmektedir.
- Ovül kültürü sonucu Melody F1 ticari çeşidinde ve *C. persicum* türlerinde elde edilen bitkilerin aklimatizasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen bitkilerde çiçeklenme gözlenmiştir.
- Ovül kültürü denemelerinde farklı zamanlarda meydana gelen yapılar histolojik olarak incelenmiştir. Histolojik analizler sonucunda *C. persicum* ve *C. cilicium* türlerinde 8. haftada alınan örneklerde globular aşamadaki embriyoların dokuları ve kallus dokuları incelenmiştir. Embriyolardaki epidermis dokusu, proliferal bölgeler ve hücre yapıları incelenmiştir. Kallus yapısındaki farklılaşmamış hücrelerin, embriyo dokularındaki hücrelere oranla daha karmaşık yapıda oldukları saptanmıştır. Ploriferel bölgelerdeki hücrelerin ise kallus yapısındaki hücrelere benzer şekilde

olduğu belirlenmiştir. Siklamende anterlerde farklı gelişme evreleri de histolojik olarak incelenmelidir. Ayrıca anterlerin içerisindeki mikrospor hücrelerinin dağılımlarının homojen olup olmadığı histolojik analizler ile ortaya konulmalıdır.

- Siklamende haploid bitki elde etmek için farklı tekniklerden faydalanılması önerilmektedir. Bunlardan en önemlilerinden bir tanesi de mikrospor kültürü olarak bilinmektedir. Siklamende mikrospor kültür henüz denenmemiştir. Dolayısıyla bu konunun üzerine gidilmesi ve haploid bitki elde etme olanaklarının genişletilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdollahi, M.R., Darbandi, M., Hamidvand, Y., Majdi, M., 2015. The Influence of Phytohormones, Wheat Ovary Co-Culture, and Temperature Stress on Anther Culture Response of Watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Braz J Bot* 38 (3):447–456.
- Achar, P.N., 2002. A Study Of Factors Affecting Embryo Yields From Anther Culture Of Cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 69, 183–188.
- Addam, K., Mohammad, H., Bou-Hamdan, M., Takkoush, J., Rifai, F., 2017. *Cyclamen persicum* f. *puniceum* (Gleason) Grey-Wilson New Plant Record Joined the Lebanese Flora. *International Journal of Botany Studies*, 2, 4, 12-15.
- Affre, L., Thompson, J.D., 1999. Variation in Self-Fertility, Inbreeding Depression And Levels of Inbreeding in Four *Cyclamen* species. *Journal of Evolutionary Biology*, 12 (1), 113-122.
- Alpsoy, H.C., 1999. Bazı Patlıcan Genotiplerinde İn Vitro Androgenesis Ve Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 89.
- Al Remi, F., 2013. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besin Ortamının Etkisi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Adana, 68.
- Altunkeyik, H., Gülcemal, D., Masullo, M., Alankus-Caliskan, O., Piacente, S., Karayildirim, T., 2012. Triterpene Saponins From *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry*, 73, 127-133.
- Amini, L., Mendi, Y.Y., 2016. Bazı Siklamen Türlerinde (*C. cilicium*, *C. persicum* ve *C. hederifolium*) Anter ve Ovül Kültürü Yöntemlerinin Embriyo Uyarımına Etkileri. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 34-4, 20-29.

- Anonymous, 2018. http://www.varinova.nl/?page_id=418 (Eriřim : Ocak 2018)
- Anonymous, 2017. <http://www.cyclamen.org/plants/species/cyclamen-coum/2017>
- Arı, E., 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kùltürü Çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Doktora Tezi, 187.
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N. Gümüřcü, A., 2015. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, 483-507.
- Arzate-Fernández, A. M., Nakazaki, T., Yamagata, H., & Tanisaka, T. (1997). Production Of Doubled-Haploid Plants From *Lilium longiflorum* Thunb. Anther Culture. Plant Science, 123 (1-2), 179-187.
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kùltüründe Mevsim Etkisi ve Mikrospor Gelişimi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 102.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Doku Kùltürü: Temel Laboratuar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi I, Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., SÜ Basımevi.
- Badu, M., Tripathy, B., Sahu, G. S., Kumar, A., 2017. Role of Doubled Haploids in Vegetable Crop Improvement. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6 (6), 384-389.
- Baktemur, G., Yücel, N.K., Taşkın, H., Çömlekçioğlu, S., Büyükalaca, S., 2014. Effects of Different Genotypes and Gamma Ray Doses on Haploidization Using Irradiated Pollen Technique in Squash. Turkish Journal of Biology, 38 (3), 318-327.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, ř. ř. (2013). Effect of Genotypical Factors on the Effectiveness of Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). Turkish Journal of Biology, 37 (4), 499-505.

- Berber, M., Abak, K., 2012. Kabuksuz Çekirdek Kabaklarında (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi Kullanılarak Haploid Üretimi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 75.
- Bilir Ekbiç, H., 2010. Trakya İlkeren Ve Flame Seedless Üzüm Çeşitlerinde Co₆₀ ve Kolhisin Kullanılarak Mutasyon Ve Poliploidi Oluşturma Olanakları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 152.
- Blakelsee, A.F., Belling, J., Farhnam, M.E., Bergner, A.D., 1922. A Haploid Mutant in The Jimson Weed, *Datura stramonium*. Science 55, 646–647.
- Borém, A., Miranda, G.V., 2009. Melhoramento de Plantas. Plant Breeding, fifth ed. UFV, Viçosa, MG. 529.
- Borém, A., Fritsche-Neto, R., 2014. Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars. Elsevier.
- Bossard, R., 1960. Culture Florales. 19, rue Hautefeuille, Crops. In: Plant Germplasm Conservation: Perspectives for the 2000, PARIS, 83–99.
- Çalış, I., Yuruker, A., Tanker, N., Wright, A.D., Sticher, O., 1997. Triterpene Saponins from *Cyclamen coum* var. *coum*. Planta Med 63:166–170.
- Çelik, M.E., 2016. Üç Burun Biber Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis Yöntemi İle Dihaploid Hatların Elde Edilmesi. Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Yüksek Lisans Tezi, 65.
- Çetin, S., 2002. Asmada (*Vitis* spp.) Anter Kültürü Üzerine Araştırmalar. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Doktora Tezi, 67.
- Clausen, R.E., Mann, M.C., 1924. Inheritance in *Nicotiana tabmum*. V. The Occurrence of Haploid Plants in Interspecific Progenies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 10: 121-124.
- Çürük, P., 2013. Adana Ve Çevresinde Doğal Olarak Yetişen Siklamen Türlerinin Morfolojik Ve Moleküler Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tez, 216.

- Dallman, P.R., 1998. Plant Life in The World's Mediterranean Climates. Univ. of Calif. Press, Berkeley.
- Davis, P. H., 1978. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 6.
- De Verna, J.W., Collins, G.B., 1984. Maternal Haploids of *Petunia axillaris* (Lam.) BSP via Culture of Placenta Attached Ovules. Theoretical and applied genetics, 69 (2), 187-192.
- Diao, W.P., Jia, YY, Song H, Zhang XQ, Lou QF, Chen JF., 2009. Efficient Embryo Induction in Cucumber Ovary Culture and Homozygous Identification of the Regenerants Using SSR Markers. Sci Hortic 119 (3):246-251
- Dilaver, Z. 2013. Conservation of Natural Plants and Their Use İn Landscape Architecture(M. Özyavuz, Editör). Advances in Landscape Architecture, In Tech, 978, 953, 51, 1167-2.
- Doksöz, S., 2015. *In Vitro* Androgenesis Yöntemi İle Farklı Patlıcan Genotiplerinde Dihaploid Hatların Elde Edilmesi. Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Yüksek Lisans Tezi, 59.
- Doi, H., Takahashi, R., Hikage, T., Takahata, Y., 2010. Embryogenesis and Doubled Haploid Production from Anther Culture in Gentian (*Gentiana triflora*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 102(1), 27-33.
- Dölarslan, M. ve Gül, E. , 2015. Yapraklı - Büyükyayla (Çankırı)'nın Vasküler Bitkiler Florası. Ormancılık Dergisi 11 (2), 74-91.
- Dunwell, J.M., 2010. Haploids in Flowering Plants: Origins and Exploitation. Plant Biotechnology Journal 8 (4), 377-424.
- Durna, P., 2016. Bazı Biber Genotiplerinde *In Vitro* Androgenesis Uygulamalarının Dihaploid Hat Geliştirmeye Etkisi Ve Dihaploid Hatların Morfolojik Karakterizasyonu. Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Doktra Tezi, 141.

- Ekim, T., Koyuncu, M., Güner, A., Erik, S., Yıldız, B., Vural, M., 1991. Türkiye'nin Ekonomik Değer Taşıyan Geofitleri Üzerinde Taksonomik ve Ekolojik Araştırmalar. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, İşletme ve Pazarlama Daire Başkanlığı, O. E. M. Eğitim Dairesi Başkanlığı Yayın ve Tanıtma Şube Müdürlüğü Matbaası, Ankara.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2002. Haploid Bitki Üretimi (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Bitki Biyoteknolojisi –Doku Kültürü ve Uygulamaları, 137-189.
- Ergin Yılmaz, Ö., 2005. Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum Kültürü Yolu ile Haploid Bitki Elde Edilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi Kahramanmaraş, 68.
- Eti, S., Stosser, R., 1987. Über die Fruchtbarkeit der Mandarinensorte 'Clementine' (*Citrus reticulata* Blanco). II. Entwicklung der Samenanlagen und Embryosack. Angew. Bot, 61, 505-19.
- Fari, M.G., Holb I., Bisztray, G.D., 2006. Cryopreservation of Embryogenic Suspension Cultures of *Cyclamen persicum* Mill. Proceedings of the Vth International Symposium on in Vitro Culture and Horticulture Breeding. Acta Horticulturae. 725, 391-396.
- Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S., Marco, M.D., Schiavi, M., 1999. *In vitro* Gynogenesis to Induce Haploid Plants in Melon (*Cucumis melo* L.). J Genet Breed, 53 (3), 255–257.
- Foubert, K., Theunis, M., Apers, S., Vlietinck, A.J., Pieters, L., 2008. Chemistry, Distribution and Biological Activities of 13,28-Epoxyoleanane Saponins from The Plant Families Myrsinaceae And Primulaceae. Curr Org Chem 12, 629–642.
- Furukawa, K., Kakihara, F., Kato, M., 2002. Somatic Embryos Produced from Aceptic Seedlings of Wild *Cyclamen* species. Journal of Society of High Technology in Agriculture, 14 (2), 71-80.

- Gaines, E.F., Aase, H.C., 1926. A Haploid Wheat Plant. American Journal of Botany 13 (6), 373–385.
- Gamborg, O.L., Miller, R., Ojima, K., 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Experimental cell research, 50 (1), 151-158.
- Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristof, Z., 2002. Effect of Optimal Stage of Female Gametophyte and Heat Treatment on in vitro Gynogenesis Induction in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Rep., 21 (2), 105–111.
- Gemesne-Juhasz, A., Venczel, G., Balogh, P., 1997. Haploid Plant Induction in Zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. Giromontiina Duch) and in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Lines Through In vitro Gynogenesis. Acta Hort 447:623–625
- Germanà, M.A., 2011. Gametic Embryogenesis and Haploid Technology As Valuable Support to Plant Breeding. Plant Cell Reports 30, 839–857.
- Gökçeoğlu, M., Sukatar, A., 1985. *Cyclamen hederifolium* Aiton'un Yumru Büyümesi. Doğa Bilim Dergisi. Cilt 9, Sayı: 2.
- Gu, Z. P., Cheng, K.C., 1983. In vitro Induction of Haploid Plantlets from Unpollinated Young Ovaries of Lily and Its Embryological Observations. Acta botanica sinica.
- Guha, S., Maheshwari, S.C., 1964. In vitro Production of Embryos From Anthers of *Datura*. Nature, 204 (4957), 497-497.
- Gündoğan, M.T., 2003. *Cyclamen mirabile* Hildebr. ve *Cyclamen trochopentanthum* O. Schwarz Türleri Üzerinde Bazı Fitokimyasal Araştırmalar. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and East Aegean Island (Supplement II). Edinburgh. Vol.11, 656.

- Hamidvand, Y., Abdollahi, M.R., Chaichi, M., Moosavi, S.S., 2013. The Effect of Plant Growth Regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Int J Agric Crop Sci*, 5 (10), 1089–1095.
- Han, D. S., Niimi, Y., 2004. Production of Haploid and Doubled Haploid plants from Anther-Derived Callus of *Lilium formosanum*. IX International Symposium on Flower Bulbs 673, 389-393.
- Han, D. S., Niimi, Y., Nakano, M., 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. *Plant cell, tissue and organ culture*, 47 (2), 153-158.
- Henshaw, G.G., O'Hara, J.F., Webb, K.J., 1982. Morphogenetic Studies in Plant Tissue Cultures. (Ed: Yeoman, M.M., Truman, D.E.S.): Differentiation In vitro, 231-251. Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1993. Production of Plants from Pollen in *Cyclamen persicum* Mill. Through Anther Culture. *Japanese Journal of Breeding*, 43 (2), 207-218.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1995. Interspecific Hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. Produced by Ovule Culture. *Euphytica*, 82 (1), 31-37.
- Ishizaka, H. 1996. Interspecific Hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*. *Euphytica*, 91, 109-117.
- Ishizaka, H., 1998. Production of Microspore-Derived Plants by Anther Culture of an Interspecific F1 Hybrid Between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 54 (1), 21-28.
- İzgül, T., Sevindik, B., Çürük, P., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y., da Silva, J.A.T., Mendi, Y.Y., 2016. Development of An Efficient Regeneration Protocol for Four *Cyclamen* Species Endemic to Turkey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127 (1), 95-113.

- Jalali, N., Naderi, R., Shahi Gharahlar, A., Teixeira da Silva, J.A., 2012. Tissue Culture of *Cyclamen* spp. Sci. Hortic. 137, 11–19.
- Kalyonucu Doğan, D., 2007. Bazı Yabani Tulipa Türlerinde *in vitro* Soğancık Üretimi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, 105.
- Karakullukçu Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyartıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 131.
- Karagüzel, Ö., Kaya, A.S., Aydınşakir, K., 2007. Dünyada ve Türkiye’de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu.
- Kazaz, S., 2016. Dünya Süs Bitkileri Sektöründe Ürün Deseni, Sosyo-Ekonomi ve Teknoloji Alanında Yaşanan Gelişmeler ile Türkiye’nin Gelecek Vizyonu. VI Süs Bitkileri Kongresi, Antalya, 2-12.
- Kazaz, S., Erken, K., Karagüzel, Ö., Alp, Ş., Öztürk, M., Kaya, A.S., Gülbağ, F., Temel, M., Erken, S., İzgi Saraç, Y., Elinç, Z., Salman, A., Hocagil, M., 2015. Süs Bitkileri Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, 483-507.
- Keleş, D., Özcan, C., Pınar, H., Ata, A., Denli, N., Yücel, N. K., Taşkın, H., Büyükalaca, S. 2016. First Report of Obtaining Haploid Plants Using Tissue Culture Techniques in Spinach. HortScience, 51 (6), 742-749.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., Büyükalaca, S., 2015. Effect of Pepper Types on Obtaining Spontaneous Doubled Haploid Plants via Anther Culture. HortScience, 50 (11), 1671-1676.
- Kiviharju, E., Tuominen, U., Tormala, T., 1992. The effect of Explant Material on Somatic Embryogenesis of *Cyclamen Persicum* Mill. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 28 (2), 187-194.
- Koçak, M., 2012. Siklamen (*Cyclamen persicum*)’de Somatik Embriyogenesinin Optimizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53.

- Koçak, M., İzgü, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Çürük, P., Şimşek, O., Aka Kaçar, Y., Teixeira da Silva, J.A., Mendi, Y.Y., 2014. Somatic Embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill. Sci Hort., 172, 26–33.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenovski, M., Trajkova, F. 2007. Somatic Embryogenesis in Pepper Anther Culture: The Effect of Incubation Treatments and Different Media. Scientia Horticulturae, 111 (2), 114-119.
- Koyuncu M., Ekim T., 1984. Türkiye'nin İhraç Ettiği Geofitler Ve Bunların Ekonomik Önemi. V. Bitkisel İhraç Hammaddeleri Toplantısı, Kasım, Ankara, 15-17.
- Kumar, H.G.A., Murthy, H.N., 2004. Effect of Sugars and Amino Acids on Androgenesis of *Cucumis sativus*. Plant Cell Tiss Org Cult, 78 (3), 201–208.
- Kumar, H.G.A., Murthy, H.N., Paek, K.Y., 2003. Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Cultures of *Cucumis sativus* L. SciHortic, 98 (3), 213–222.
- Kumar, H.G.A., Ravishankar, B.V., Murthy, H.N., 2004. The Influence of Polyamines on Androgenesis of *Cucumis sativus* L. Eur J Horti Sci, 69 (5), 201–205.
- Kuo-chang, G.Z.P.C., 1982. Studies on Induction of Pollen Plantlets from The Anther Cultures Of Lily J. 1004.
- Kuo-chang, G.Z.P.C., 1983. *In Vitro* Induction Of Haploid Plantlets From Unpollinated Young Ovaries Of Lily and Its Embryological Observations, 1, 1003.
- Kurtar, E.S., Balkaya, A., 2010. Production of In vitro Haploid Plants from in situ Induced Haploid Embryos in Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via Irradiated Pollen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 102 (3), 267-277.

- Kurtar, E.S., Sari, N., Abak, K., 2002. Obtention of Haploid Embryos and Plants Through Irradiated Pollen Technique in Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica*, 127 (3), 335-344.
- Lande, R., Schemske, D.W., 1985. The evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression In Plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39 (1), 24-40.
- Li, J.W., Si, S.W., Cheng, J.Y., Li, J.X., Liu, J.Q., 2013. Thidiazuron and Silver Nitrate Enhanced Gynogenesis of Unfertilized Ovule Cultures of *Cucumis sativus*. *Biol Plant*, 57 (1), 164–168
- Mathew B., Özhatay N., 2001. Türkiye'nin Siklamenleri. Türkiye Doğal Hayatı Koruma Derneği, Sirkeci, İstanbul, s32.
- Malik, A.A., Cui, L., Zhang, S.X., Chen, J.F., 2011. Efficiency of SSR Markers for Determining the Origin of Melon Plantlets Derived Through Unfertilized Ovary Culture. *Hort Sci*, 38 (1), 27–34.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I., 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer, Dordrecht.
- Metwally, E.I., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I., Haroun, S.A., Shalaby, T.A., 1998. Production of Haploid Plants from In Vitro Culture of Unpollinated Ovules of *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52 (3):117–121.
- Miyoshi, K., Asakura, N., 1996. Callus Induction, Regeneration of Haploid Plants and Chromosome Doubling in Ovule Cultures of Pot Gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Reports*, 16 (1), 1-5.
- Moqbeli, E., Peyvast, G., Hamidoghli, Y., Olfati, J.A. 2013. In vitro Cucumber Haploid Line Generation in Several New Cultivars. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 21(1), 18–25.
- Mohamed, M.F., Refaei, E.F.S., 2004. Enhanced Haploids Regeneration in Anther Culture of Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Cucurbit genetics. Coop Rep* 27:57–60.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murovec, J., Borut B., 2012. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. *Plant breeding*, InTech.
- Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J., 2009. Plant Cell and Tissue Culture-A tool in Biotechnology: Basics and Application. Springer Science & Business Media.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., Nowaczyk, P., 2012. Study of Individual Plant Responsiveness in Anther Cultures of Selected Pepper (*Capsicum* spp.) Genotypes. *Folia Horticulturae*, 24 (2), 141-146.
- Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A., Nowaczyk, P., 2014. Study of *In vitro* Anther Culture in Selected Genotypes of Genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38 (1), 118-124.
- Özdemir, B., Patlıcan (*Solanum melongena* L.)’da Mikrospor Kültüründe Ovaryum Ko-Kültür Yönteminin Haploid Embriyo Oluşumunun Uyarılması Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 79.
- Özsan, T., 2014. Farklı Genetik İlerleme Seviyesinde Bitki Kullanımının Biber (*Capsicum annuum* L.) Anter ve Mikrospor Kültüründe Haploid Bitki Eldesi Üzerine Etkileri. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 80.
- Özhatay, N., Byfield, A., 2005. Türkiye’nin 122 Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı 1-24, İstanbul, 476.
- Pirrie, A., 1985. The Use of Haploid Systems in Plant Genetic Manipulation (Doctoral dissertation, University of Nottingham).
- Plapung, P., Khamsukdee, S., Potapohn, N., Smitamana, P., 2014. Screening for Cucumber Mosaic Resistant Lines from the Ovule Culture Derived Double Haploid Cucumbers. *Am J Agric Biol Sci*, 9 (3), 261–269.

- Prange, A.N.S, Bartsch, M., Serek, M., Winkelmann, T., 2010. Regeneration of Different *Cyclamen* Species via Somatic Embryogenesis from Callus, Suspension Cultures and Protoplasts. *Sci Hortic.*, 125, 442–450.
- Prange, A.N.S., Bartsch, M., Meiners, J., Serek, M., Winkelmann, T., 2012. Interspecific Somatic Hybrids Between *Cyclamen persicum* and *C. coum*, Two Sexually Incompatible Species. *Plant cell reports*, 31 (4), 723-735.
- Prem, D., Gupta, K., Agnihotri, A., 2005. Effect of Various Exogenous and Endogenous Factors on Microspore Embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41 (3), 266-273.
- Püschel, A.K., Schwenkel, H.G., Winkelmann, T., 2003. Inheritance of the Ability for Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 72, 43–51.
- Sarı , N., Abak, K., Pıtrat, M.,Dumas De Vaulx, R.,1992. Kavunlarda (*Cucumis melo* L. var.inodorus Naud ve *Cucumis. Melo* L. var. *reticulatus* Naud) Partenogenetik Haploid Embriyo Uyartımı ve Bitki Eldesi. *Doğa-Tr. J. Of Agriculture and Forestry*, 16, 302-314.
- Sarı , N., 1994. Karpuzlarda ışınlanmış Polen Uyartımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Adana, 244 s.
- Savona, M., Ruffoni, B., Giovannini, A., Altamura, M.M., 2007. *Cyclamen persicum* Mill. cv. ‘Halios’: Somatic Embryogenesis and Phenotypic Analysis of Somatic Embryo-Derived Plants. *Acta Hortic* 743:91–98.
- Schemske, D.W., Lande, R., 1985. The Evolution of Self Fertilization and In Breeding Depression in Plants, 2. Emprical Observations, *Evolution* 39,41-52.

- Schwenkel, H.G., Winkelmann, T., 1998. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis from Ovules of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Tissue Cult Biotechnol 4, 28–34.
- Sevindik, B., 2014. Türkiye’ De Doğal Olarak Yetişen Ve Kültürü Yapılan Bazı *Crocus* Türlerinde Somatik Embriyogenesis’in Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 59
- Seyring, M., Ewald, A., Muller, A., Haensch, K.T., 2009. Screening for Propagation Suitability *In vitro* of different *Cyclamen* species. Electron J. Biotechnol., 12, 4–7.
- Shalaby, T.A., 2006. Embryogenesis and Plantlets Regeneration from Anther Culture of Squash Plants (*Cucurbita pepo* L.) as Affected by Different Genotypes. J Agric Res Tanta Univ., 32 (1):173–183.
- Sitbon, M., 1981. Production of Haploid *Gerbera jamesonii* Plants by *In vitro* culture of unfertilized ovules. Agronomie, 1, 807-812.
- Song, H., Lou, Q.F., Luo, X.D., Wolukau, J.N., Diao, W.P., Qian, C.T., Chen, J.F., 2007. Regeneration of Doubled Haploid Plants by Androgenesis of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tiss Org Cult, 90 (3), 245–254.
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J.B.M., 2006. Successful Development of a Shed-Microspore Culture Protocol for Doubled Haploid Production in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant cell reports, 25 (1), 1-10.
- Suprunova, T., Shmykova, N., 2008. *In vitro* Induction of Haploid Plants in Unpollinated Ovules, Anther and Microspore Culture of *Cucumis sativus*. (Editör: M. Pitrat) Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. Avignon, France, 371–374.

- Takamura, T., Sakamoto, K., Horikawa, M., 2011. Effect of Carbon Source on in vitro Plant Regeneration in Anther Culture of *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill.). In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro 923, 129-134.
- Takamura, T., Nakayama, M., Ishizaka, H., 2005. Inheritance of Flower Color Pigment in Crosses Between *Cyclamen* Cultivars and *Cyclamen purpurescens*. Acta Hortic., 673, 437-441.
- Takamura, T., Imose, Y., Nagita, Y., Tanaka, M. 2006. Effects of Nitrogen Source and Gellan-Gum Concentration in Medium on Plant Regeneration from Somatic Embryos in *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill.). Journal of Society of High Technology in Agriculture (Japan).
- Tanker, N., Türköz, S., 1984. *Cyclamen cilicicum* Boiss. Et Heldr var. *intaminatum* Meikle Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar, Gazi Ecz. Fak. Der., 1(2):79.
- Tantasawat, P.A., Sorntip, A., Poolsawat, O., Chaowiset, W., Pornbungkerd, P., 2015. Evaluation of Factors Affecting Embryo-Like Structure and Callus Formation in Unpollinated Ovary Culture of Cucumber (*Cucumis sativus*). Int J Agric Biol, 17 (3).
- Taşkın, H., Yücel, N. K., Baktemur, G., Çömlekçioğlu, S., Büyükalaca, S., 2013. Effects of Different Genotypes And Gamma Ray Doses on Haploidization with Irradiated Pollen Technique in Watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Canadian Journal of Plant Science, 93 (6), 1165-1168.
- Taşkın, H., 2005. Bazı Biber Genotiplerinde Anter Kültürü İle Haploid Embriyo Uyartımında Embriyo Kalitesinin Artırılmasına Yönelik Bazı Uygulamalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Yüksek Lisans Tezi, 82.

- Tiainen, T., 1992. The Role of Ethylene and Reducing Agents on Anther Culture Response of Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant cell reports, 10 (12), 604-607.
- Tosca, A., Arcara, L., Frangi, P., 1999. Effect of Genotype and Season on Gynogenesis Efficiency in *Gerbera*. Plant cell, tissue and organ culture, 59 (1), 77-80.
- Tulukoğlu, S., 2014. Karpuzlarda Anter Ve Ovül Kültüründe Soğuk Uygulaması, Thidiazuron (TDZ) ve 2,4-D Uygulamalarının Haploid Embriyo Uyarımına Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 98.
- Tuna, M., 2016. Flow Sitometri ve Tarımsal Alanlarda Kullanımı. IV. Flow Sitometri ve Tarımsal Alanlarda Kullanımı Uygulamalı Eğitim Programı, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, 24.
- Wellensiek, S.J., 1959. The effect of Inbreeding in *Cyclamen*. Euphytica, 8 (2), 125-130.
- Winarto, B., Mattjik, N. A., da Silva, J. A. T., Purwito, A., Marwoto, B., 2010. Ploidy Screening of Anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex André) Regenerants Derived from Anther Culture. Scientia horticulturae, 127 (1), 86-90.
- Winarto, B., Rachmawati, F., Pramanik, D., da Silva, J.A.T., 2011. Morphological and Cytological Diversity of Regenerants Derived from Half-Anther Cultures of *Anthurium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 105 (3), 363-374.
- Winkelmann, T., Serek, M., 2005. Genotypic Differences in Callus Formation and Regeneration of Somatic Embryos in *Cyclamen persicum* Mill. Euphytica, 144, 109–116.
- Winkelmann, T., Specht, J., Serek, M., 2006. Efficient Plant Regeneration from Protoplasts Isolated from Embryogenic Suspension Cultures of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Tissue Organ Cult., 86, 337–347.

- Winkelmann, T., 2010. Clonal Propagation of *Cyclamen persicum* via Somatic Embryogenesis. (Editörler: Jain, S.M., Ochatt, S.J.), Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology. Humana press, New York City, 81–90.
- Winkelmann, T., Ratjens, S., Bartsch, M., Rode, C., Niehaus, K., Bednarz, H., 2015. Metabolite Profiling of Somatic Embryos of *Cyclamen persicum* in Comparison to Zygotic Embryos, Endosperm, and Testa. Frontiers in plant science, 6.
- Wicart, G., Mouras, A., Lutz, A., 1984. Histological Study of Organogenesis and Embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Tissue Cultures: Evidence for a single organogenetic pattern. Protoplasma, 119 (3), 159-167.
- Xie, M., Qin, L.Y., Pan, J.S., He, H.L., Wu, A.Z., Cai, R., 2005. Flower Morphogenesis and Microspore Development Versus Anther Culture of Cucumber. Acta Bot Boreali-Occident Sin, 25(6), 1096–1100.
- Xue, G.R., Yu, W.Y., Fei, K.W., Cui, H.N., Sun, R.X. 1983. Watermelon Plants Derived by In Vitro Anther Culture. Plant Physiol Commun 4:40–42.
- Xue, G.R., Yu, W.Y., Yang, Z.Y., Sun, R.Y. 1988. The Induction of Watermelon Pollen Plants and a Preliminary Observation of the Posterity. Hereditas 10 (2):5–8.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L., 2002. Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(3), 233-249.
- Yalçın Mendi, N.Y., Çürük, P., 2016. Türkiye Florası Siklamenleri. Adana, 96.
- Yılancı, N., 2016. *Cyclamen Persicum* Mill. Çeşitlerinin Tuber Ekstraktlarının Genotoksitesinin *Allium Cepa* L. Testi İle Belirlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 68.

- Zamir, D., Jones, R. A., Kedar, N., 1980. Anther Culture of Male-Sterile Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Mutants. Plant Science Letters, 17(3), 353-361.
- Zhang, C.J., Wang, H.L., Ma, Y., Kang, Y.Q., 1994. Regeneration of Haploid Plants from Isolated Microspores of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant cell reports, 13(11), 637-640.
- Zhan, Y., Chen, J.F., Malik, A.A., 2009. Embryoid Induction and Plant Regeneration Of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Microspore Culture. Acta Horti Sin 36(2):221–226.



ÖZGEÇMİŞ

1986 Adana/ Seyhan'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2005 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde başladığı üniversite eğitimini 2010 yılında bitirdi. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri bölümünde Prof. Dr. Yeşim Yalçın Mendi danışmanlığında yüksek lisansa başladı ve 2014 yılında tamamladı ve aynı yıl içerisinde Bahçe Bitkilerin Anabilim Dalında doktora çalışmalarına başladı ve 2018 yılında doktorasını tamamladı.

