

T1538

SEKSÜEL VE APOMİKTİK ÜREYEN BAZI *ARABIS* TÜRLERİNİN *İN VİTRO*  
REJENERASYONU, GENETİK TRANSFORMASYONU VE SİTOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ †

KEMAL MELİK TAŞKIN

DOKTORA TEZİ  
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

1538

2003

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**SEKSÜEL VE APOMİKTİK ÜREYEN BAZI *ARABIS* TÜRLERİNİN *İN VİTRO*  
REJENERASYONU, GENETİK TRANSFORMASYONU VE SİTOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**KEMAL MELİK TAŞKIN**

**DOKTORA TEZİ  
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 20.01.0121.16 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2003**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ






SEKSÜEL VE APOMİKTİK ÜREYEN BAZI *ARABIS* TÜRLERİNİN *IN VITRO*  
REJENERASYONU, GENETİK TRANSFORMASYONU VE SİTOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

KEMAL MELİK TAŞKIN

DOKTORA TEZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 2/6/2003 tarihinde aşağıdaki juri tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT.(Danışman)   
Prof. Dr. M. Emin TUĞAY   
Prof.Dr. Rüştü HATİPOĞLU   
Doç.Dr. Hüseyin BASIM   
Doç.Dr. A. Naci ONUS 

## ÖZET

# SEKSÜEL VE APOMİKTİK ÜREYEN BAZI *ARABIS* TÜRLERİNİN *IN VİTRO* REJENERASYONU, GENETİK TRANSFORMASYONU VE SİTOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kemal Melik TAŞKIN

Doktora tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Kenan TURGUT

Haziran 2003, 83 Sayfa

Bu çalışmada bazı *Arabis* türlerinin (*A. drummondii*, *A. holboellii* ve *A. gunnisoniana*) üreme biyolojileri ile *in vitro* rejenerasyon yetenekleri ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyonları araştırılmıştır.

*In vitro* rejenerasyon çalışmalarında, farklı *Arabis* türlerinin steril şartlarda çimlendirilmiş bitkilerden alınan yaprak, kotiledon, hipokotil ve kökler ile saksılarda yetiştirilmiş bitkilerinden alınan olgunlaşmamış embriyoları, değişik bitki büyüme düzenleyiciler (6-benzilaminopurin, Thidiazuron,  $\alpha$ -naftalen asetik asit ve 2,4-diklorofenoksi asetik asit) eklenmiş Murashige ve Skoog (MS, 1962) ortamlarındaki rejenerasyon kapasiteleri incelenmiştir. Kallus oluşumu 10 gün içerisinde başlamıştır. Adventif sürgünler, kültürün 4. haftasından itibaren oluşmuştur. Organogenez hipokotil, kök ve olgunlaşmamış embriyolardan *Arabis* bitkisi türüne bağlı olarak meydana gelmiştir. Sürgünler %1 oranında sukroz içeren ½ MS besin ortamında köklendirilmiştir. Bu rejenerasyon protokolü daha sonra transgenik *Arabis gunnisoniana* bitkisi elde etmek için kullanılmıştır. Transformasyon çalışmalarında ise *in vitro*'da steril şartlarda çimlendirilmiş *A. gunnisoniana* bitkilerinden alınan hipokotil eksplantları, pBJ40 taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* suşu ile ko-kültive edilmiştir. Transgenik sürgünler 50 mg/l Kanamisin içeren MS besin ortamlarında seçilmiştir. Kanamisin'e dirençli sürgünlerden elde edilen bitki DNA'larında *NPTII* geninin varlığı PCR ile onaylanmıştır. Sitolojik araştırmalarda ovul-temizleme yöntemi ile embriyo kesesi gelişimi ve flow sitometri analizleri ile *Arabis* türlerinin tohum meydana getirme şekilleri ortaya çıkarılmıştır. Apomayotik embriyo kesesi gelişimi *Taraxacum* tip diplospori ile meydana gelmiştir. Flow sitometrik tohum analizi ise tohumların pseudogami ile oluştuğunu göstermiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Arabis*, apomiksi, *in vitro* rejenerasyon, *Agrobacterium*, transformasyon, embriyo kesesi gelişimi, flow sitometri

### JÜRİ

Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)

Prof. Dr. M. Emin TUĞAY

Prof.Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Doç.Dr. Hüseyin BASIM

Doç.Dr. A. Naci ONUS

## ABSTRACT

### **IN VITRO REGENERATION, GENETIC TRANSFORMATION AND DETERMINATION OF CYTOLOGICAL PROPERTIES OF SOME SEXUAL AND APOMICTIC *ARABIS* SPECIES**

**Kemal Melik TAŞKIN**

**PhD in Field Crops**

**Adviser: Prof. Dr. Kenan TURGUT**

**June, 2003, 83 pages**

In this work, the reproductive biology, *in vitro* regeneration ability and genetic transformation of *Arabis* species (*A. drummondii*, *A. holboellii* and *A. gunnisoniana*) via *Agrobacterium tumefaciens* were investigated. Various explants (leaves, cotyledons, hypocotyls, roots and immature embryos) excised from seedlings that were either grown in sterile conditions or pots were tested in Murashige and Skoog (MS, 1962) medium supplemented with plant growth regulators (6-benzylaminopurine, Thidiazuron,  $\alpha$ -naphthalen acetic acid and 2,4-diclorofenoxy acetic acid). Callus formation started in ten days and a high frequency of callus formation (up to 100%) was obtained. Shoots were obtained after 4 weeks in culture from hypocotyls, roots and immature embryos depending on species and plant growth regulators used. Regenerated shoots were rooted on half-strength MS basal medium supplemented with 1 % (w/v) sucrose, with or without NAA. This protocol then used to produce transformed *Arabis gunnisoniana* plants. *A. gunnisoniana* hypocotyl explants were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 harbouring pBJ40. Transgenic shoots were selected on MS medium supplemented with 50 mg/l kanamycin. PCR analysis verified the presence of the *NPTII* gene in the plant DNA isolated from kanamycin resistant shoots. In cytological works, the use of ovule-clearing technique to characterize embryo sac development and flow cytometry analysis to reveal seed formation in *Arabis* species were investigated. Apomeiotic embryo sac development was detected as *Taraxacum* type diplosporous dyad formation. Flow cytometric seed screen analyses revealed pseudogamous apomixis.

**KEY WORDS:** *Arabis*, apomixis, *in vitro* regeneration, *Agrobacterium*, transformation, embryo sac development, flow cytometry.

#### COMMITTEE

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. M. Emin TUĞAY

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Assoc. Prof. Dr. A. Naci ONUS

## ÖNSÖZ

Bilimi, sanatı, bu güzel dünyayı ve herşeyden önemlisi bir birey olarak içinde bulunduğum zamanı ve ülkemi; dolayısıyla hayatı ve kendimi daha iyi tanıdığımı inanıyorum artık. Tüm bunlar Şubat 1998'den bu yana Doktora eğitimimle başladı. Bilim ahlakını, evrenselliğini, sınır tanımazlığını, araştırma hırsını ve ufku açık olmayı öğrenirken, bilimin ne mekan ne de kişilerle sınırlı olmadığını gördüm. Sanatsa inceliği, ayrıntıları, duyguları, haz almayı, görmeyi ve anlamayı ve doğayı korumayı öğretti. İnsan ve doğaya övgüyü gördüm. Şimdi yeni bir yüzyılda ve onun getirdikleri ile bilimde ve sanatta yenilikler içerisindeyiz. Biyoteknoloji bu yenilikler içinde bir devrim olmuştur. Özellikle Bitki Biyoteknolojisinde doku kültürü yöntemleri ile bitkilere gen aktarımı yöntemleri sayesinde birçok bitkinin ıslahında tarım açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir. Buna ek olarak, apomiksi gibi sınırlarını henüz çözmeye çalıştığımız birçok temel araştırmada bu güne dek kullanılan en güçlü araçlar yine Biyoteknolojik yöntemler olmuştur. Apomiktik üreme günümüzde Bitki Biyoteknolojisinin en gözde konusu haline gelmiştir. Çünkü bu üreme mekanizmasının sunduğu vaatler çok önemlidir. Apomiktik üreme özelliğinin Biyoteknolojik yöntemlerle bu özelliği göstermeyen kültür bitkilerine aktarılması şu anda vejetatif yollarla üretimi yapılan birçok kültür bitkisinin tohumla üretilmesine, tohum maliyetinin azalmasına ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde üreticilerin hibrit gücünde kayıp olmaksızın kendi tohumlarını üretmelerine olanak sağlayacaktır. Bu çalışmanın Apomiksini anlaşılmada temel mekanizmaları ortaya çıkarabilmek için çok yararlı olacağına inanıyorum.

Bana tez konumu belirterek bu konuda çalışma fırsatını sağlayan, bilgi, tecrübe ve desteğini gördüğüm danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Kenan TURGUT'a (A.Ü.Z.F.) teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın bir kısmını yürütmek için bana kendi laboratuvarında çalışma olanağı tanıyan ve bu esnada önümde yeni ufuklar açan Sayın Prof.Dr. Rod J. SCOTT'a (Bath Üniversitesi, Biyoloji ve Biyokimya Bölümü, İngiltere) ve çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emin TUĞAY'a (A.Ü.Z.F.) teşekkür ederim. Ayrıca gerek doktora derslerini aldığım gerekse destek ve yardımlarını gördüğüm Doç.Dr. Hüseyin BASIM'a (A.Ü.Z.F.), Doç.Dr. Naci

ONUS'a (A.Ü.Z.F.) ve Prof.Dr. Gülten KARPUZOĞLU'na (A.Ü.T.F.) teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın yürütülmesi esnasında büyük manevi desteklerinin yanısıra, çalışmalarımda yardımcı olan Sayın Yard. Doç.Dr. Mehmet BİLGİN'e ve Dr. A. Gülhan ERCAN ŞENÇİÇEK'e teşekkür ederim. Ayrıca arkadaşlarım Sayın Dr. Mehtap KILIÇ'a, Araş. Gör. Emine Ş. OKUDAN'a (A.Ü.M.F.), Araş. Gör. Ayşegül NASIRCILAR'a (A.Ü.F.F.), Araş. Gör. Süreyya BİLMEN SARIKCIOĞLU'na (A.Ü.Z.F.), Gıda Yüksek Mühendisi Birsen TORUN'a, Dr. A. Tulay BALCI ve Dr. Adrian MASSEY'e, Araş. Gör. Safinaz YAŞAK (A.Ü.Z.F.) ve Dr. Hasan ELMASULU'ya, tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ŞAHİN'e manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Bu çalışmayı destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne, TÜBİTAK ve British Council'e teşekkür ederim. Ayrıca, annem Fatma ve babam Ali TAŞKIN'a, ağabeyim Adil ve eşi Gülay ile oğulları Ali ve Yiğit TAŞKIN'a, ablam Mine TAŞKIN'a, ablam Belgin ve eşi Serdar ile oğulları Vahap Can KIROĞLU'na ve ağabeyim Reşit ve eşi Süreyya TAŞKIN'a varlıkları, yürekleri, sevgileri ve destekleri yaşam kaynağım olduğu için çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	10
2.1. Apomiksi ile İlgili Kaynaklar.....	10
2.2. <i>In Vitro</i> Rejenerasyon ve Genetik Transformasyon ile İlgili Kaynaklar.....	20
2.3. Embriyo Kesesi Gelişimi ile İlgili Kaynaklar.....	26
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Genel Doku Kültürü Koşulları.....	33
3.2. Steril Koşullarda Fidelerin Büyütülmesi.....	33
3.3. Doku Kültürü ve Bakteri Kültürü Ortamları.....	33
3.4. <i>In vitro</i> Rejenerasyon Çalışmaları.....	35
3.5. Transformasyon Çalışmaları.....	36
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	37
3.7. Sitolojik Araştırmalar.....	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
4.1. Farklı <i>Arabis</i> Türlerinin <i>In Vitro</i> Rejenerasyonu.....	40
4.2. <i>Arabis gunnisoniana</i> 'ın Genetik Transformasyonu.....	52
4.3. <i>A. gunnisoniana</i> 'da Embriyo Kesesi Gelişimi Üzerine Sitolojik Araştırmalar.....	56
4.4. Megasporosit Hücre Duvarlarında Kalloz Birikimi.....	62
4.5. <i>Arabis</i> Tohumlarının Flow Sitometrik Analizi.....	67
5. SONUÇ.....	72
6. KAYNAKLAR.....	75
7. ÖZGEÇMİŞ.....	83



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
BAP	6-benzilaminopurin
NAA	$\alpha$ -naftalen asetik asit
2,4-D	2,4-diklorofenoksi asetik asit
TDZ	Thidiazuron (N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)
FAA	Formalin-Asetik Asit-Alkol
LB	Luria Broth
aad	Spektinomisin direnç geni
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T-DNA	Transfer DNA
GUS	$\beta$ -glukuronidaz
NPTII	Neomisin fosfotransferaz geni
cM	Santimorgan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1. 1. Pseudogamik gametofitik apomiktik üreme mekanizmaları ile seksüel üreme süreçlerinin karşılaştırılması.....2
- Şekil 2.1. *Arabidopsis*'te yabancı-tip ovul gelişimi.....29
- Şekil 3.1. pBJ40 genetik haritası.....38
- Şekil 4.1. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarından 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ortamındaki kallus rejenerasyonu (10 günlük).....44
- Şekil 4.2. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarından 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ortamındaki adventif sürgün rejenerasyonu (30 günlük).....44
- Şekil 4.3. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantından sürgün rejenerasyonu (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında bir aylık kültür).....45
- Şekil 4.4. *A. gunnisoniana* kök eksplantından sürgün rejenerasyonu (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında bir aylık kültür).....45
- Şekil 4.5. *A. holboelli* olgunlaşmamış hipokotil eksplantından kallus oluşumu (0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ortamında 10 günlük kültür).....48
- Şekil 4.6. *A. holboelli* olgunlaşmamış hipokotil eksplantından kültürün 2. haftasından sonra gelişmeye başlayan embriyogenik kallus.....48
- Şekil 4.7. *A. holboelli* olgunlaşmamış hipokotil eksplantından 3 haftalık kültürlerinden 0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ortamındaki somatik embriyo rejenerasyonu.....50

Şekil 4.8. <i>A. holboelli</i> olgunlaşmamış hipokotil eksplantından gelişen farklı büyüme evrelerindeki somatik embriyolar.....	50
Şekil 4.9. <i>A. holboelli</i> olgunlaşmamış hipokotil eksplantlarından rejenere olan ve hiç bir bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamlarında kök ve kotiledon oluşturmuş somatik embriyo.....	51
Şekil 4.10. <i>A. gunnisoniana</i> adventif sürgünlerinde kültürün 5-6. haftasından itibaren köklendirme ortamlarında oluşmaya başlayan kökler.....	51
Şekil 4.11. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> suşu GV 3101 BJ40 ile transforme edilmiş hipokotil eksplantlarından elde edilmiş kanamisine dirençli sürgünler.....	54
Şekil 4.12. Kanamisin içeren seçici besin ortamlarından yetiştirilen ve köklendikten sonra toprağa aktarılan transgenik sürgünler.....	54
Şekil 4.13. Transforme edilmiş <i>A. gunnisoniana</i> bitkilerinin <i>NPTII</i> geni primerleri ile PCR analizleri.....	55
Şekil 4.14. Transforme edilmiş <i>A. gunnisoniana</i> bitkilerinin spektinomisin direnç geni ( <i>aadA</i> ) primerleri ile PCR analizleri.....	55
Şekil 4.15. Sera koşullarında yetiştirilmiş <i>A. gunnisoniana</i> bitkilerinden alınan çiçek tomurcukları.....	58
Şekil 4.16. <i>A. gunnisoniana</i> 'da ortalama boyu 0.5-1 mm olan pistillerde erken ovul gelişimini.....	59
Şekil 4.17. <i>A. gunnisoniana</i> 'da ortalama boyu 1.5 mm olan pistillerde mayoz sonrası dyad oluşumu.....	59

Şekil 4. 18. <i>A. gunnisoniana</i> 'da ortalama boyu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde Dejenere olan Mikropilar megaspor (DM) ile genişleyen Kalazal megaspor (KM).....	60
Şekil 4. 19. <i>A. gunnisoniana</i> 'da kalazal megasporun mitoz bölünme geçirmesi ile meydana gelmiş, büyük bir vakoul (V) içeren iki nukleuslu embriyo kesesi.....	60
Şekil 4. 20. <i>A. gunnisoniana</i> 'da dört nukleuslu embriyo kesesi.....	61
Şekil 4.21. <i>A. gunnisoniana</i> 'da sekiz nukleuslu tam olarak gelişmiş embriyo kesesi.....	61
Şekil 4. 22. <i>A. gunnisoniana</i> 'da ortalama boyu 5 mm'ye ulaşan pistiller Embriyo (Emb) ve Endosperm (En) gelişimi.....	62
Şekil 4.23. Boyu 0.5 mm olan <i>A. gunnisoniana</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kaloz birikimi.....	64
Şekil 4.24. Boyu 1 mm olan <i>A. gunnisoniana</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kaloz birikimi.....	64
Şekil 4.25. Boyu 1.3 mm olan <i>A. gunnisoniana</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kaloz birikimi.....	65
Şekil 4.26. Boyu 0.5-1 mm olan <i>A. holboellii</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kaloz birikimi.....	65
Şekil 4.27. Boyu 1-1.5 mm olan <i>A. holboellii</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kaloz birikimi.....	66

Şekil 4.28. Boyu 2 mm olan <i>Arabidopsis thaliana</i> pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kalloz birikimi.....	66
Şekil. 4. 29. Seksüel veya Apomiktik üreyen bitkilerde erkek veya dişi gametlerin mayoz geçirmelerine bağlı olarak meydana gelen embriyo ve endosperm hücreleri nukleus içeriği.....	68
Şekil 4. 30. <i>A. drummondii</i> tohumlarının flow sitometri analizi.....	71
Şekil 4.31. <i>A. gunnisoniana</i> ve <i>A. holboellii</i> tohumlarının flow sitometri analizi.....	71
Şekil 4. 32. <i>A. gunnisoniana</i> tohumlarının flow sitometri analizi.....	71

## ÇİZELGELER DİZİNİ

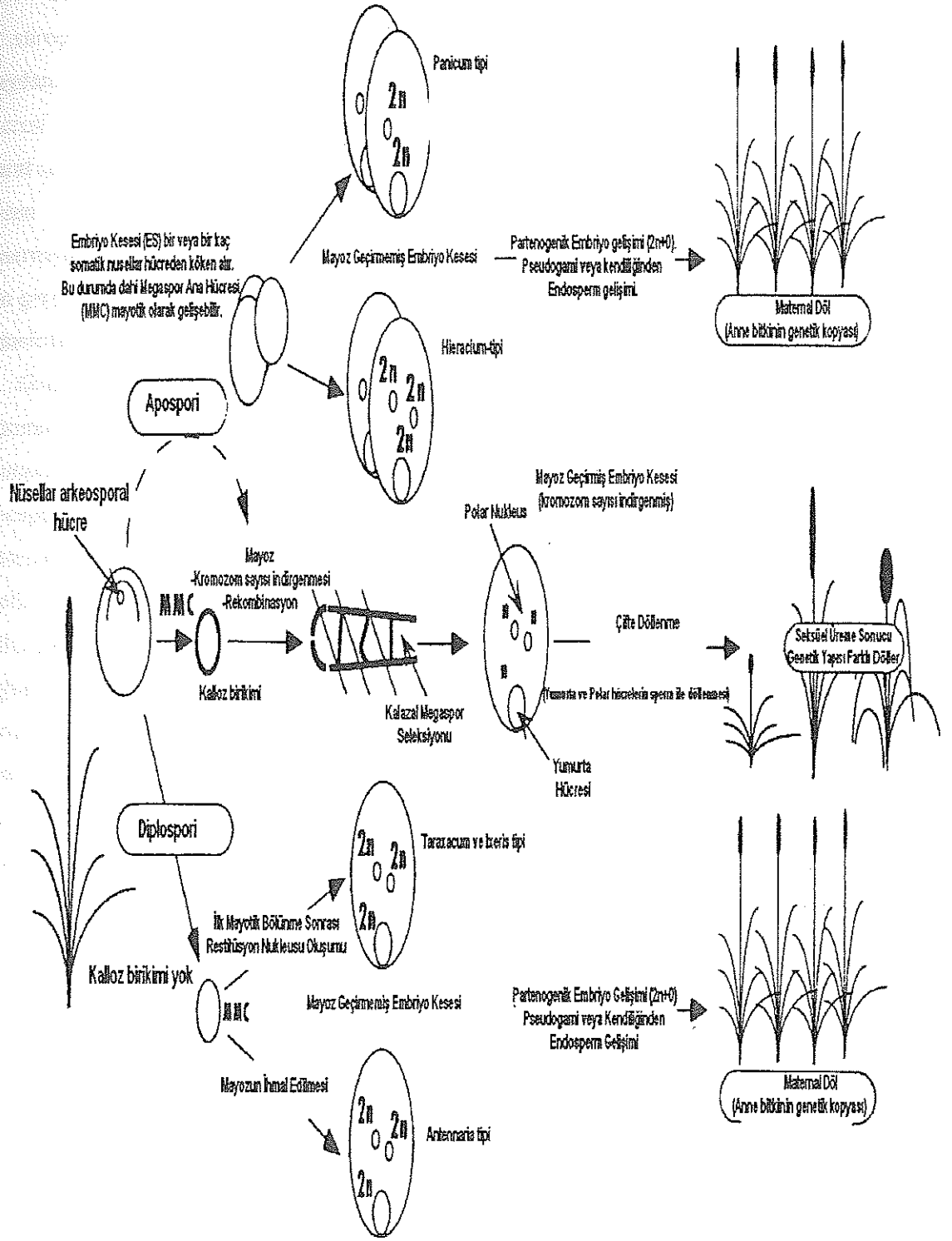
Çizelge 1.1. Angiospermlerde farklı familyalardaki Apomiktik Taxaların Sayısı.....	1
Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	34
Çizelge 4.1. Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının <i>Arabis gunnisoniana</i> hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri.....	41
Çizelge 4.2. Değişik TDZ, NAA ve 2,4-D konsantrasyonlarının <i>Arabis gunnisoniana</i> hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri.....	41
Çizelge 4.3. Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının <i>Arabis drummondii</i> hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri.....	46
Çizelge 4.4. Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının <i>Arabis holboellii</i> olgunlaşmamış zigotik embriyo kotiledon eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri. ....	49
Çizelge 4.5. <i>A. gunnisoniana</i> ovullerinde embriyo kesesi gelişimi.....	58
Çizelge 4.6. <i>Arabis</i> tohumlarının Flow sitometrik analizi.....	70

## 1. GİRİŞ

Apomiksi 400 farklı bitki türünde gözlenen aseksüel bir üreme şeklidir (Koltunow 1993). En çok *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*'de yaygındır (Çizelge 1.1). *Citrus* ve elma dışında tarımsal önemi olan bitkilerde ise rastlanmaz. Seksüel üremede dişi ve erkek gametlerin birleşmesi sonucunda fertil ve birbirinden farklı genetik yapıya sahip tohumlar oluşur. Buna karşın, apomiktik embriyolar erkek gamet olmaksızın üretilir. Bu yüzden, ana bitki ile genetik olarak özdeş olan apomiktik dölleri hem bitki ıslahı hem de tohum üretimi için büyük öneme sahiptir (Koltunow 1993). Bilinen 40'dan fazla bitki familyasında apomiksini evrimsel süreç içerisinde değişik zamanlarda seksüel atalardan köken aldığı düşünülmektedir. Bu nedenle, büyük ihtimalle seksüel ve apomiktik üreme birbirine benzer sistemlerle kontrol edilmektedir. Ayrıca fakültatif apomiktikler seksüel ve apomiktik üremenin birarada olabileceğine işaret etmektedir. Günümüzde apomiksini iki farklı tipi tanımlanmıştır; Sporofitik ve gametofitik apomiksi. Sporofitik apomiksine embriyo mayoz geçirmemiş sporofitik bir hücreden köken alır (adventif embriyoni). Adventif embriyolar olgun ovüllerde nusellus ve iç integüment adındaki iki somatik dokudan farklılaşırlar. Özellikle nusellar formu daha yaygındır ve *Citrus* türlerinde nasıl oluştuğu açıklanmıştır. Apomiktik *Citrus* türlerinde, seksüel ve apomiktik süreçler aynı ovül içerisinde oluşur. Seksüel embriyo kesesine ait yumurta ve merkezi hücreler sırasıyla embriyo ve endosperm oluşturmak için döllenirken, nusellar embriyolar zigotik embriyo etrafındaki nusellar dokudan kendiliğinden gelişirler. Gametofitik apomiksi ise Diplospori ve Apospori adında iki farklı mekanizmadan oluşur. Her iki süreç de adventif embriyoniden farklı olarak ovül gelişiminin erken safhasında başlar. Diplospori, megaspor ana hücresi farklılaştığı anda apospori ise daha sonra oluşur ve embriyo mayoz geçirmemiş bu megagametofitlerden köken alır (Şekil 1.1.).

Çizelge 1.1. Angiospermlerde farklı familyalardaki apomiktik taksonların sayısı

Familya	Apospori	Diplospori	Adventif Embriyoni	Toplam
Asteraceae	18	51	-	69
Gramineae	68	27	-	95
Liliaceae	-	1	6	7
Rosaceae	65	3	-	68
Rutaceae	2	-	5	7
Urticaceae	2	7	-	9
Diğer 28 familya	5	15	33	53



Şekil. 1.1. Pseudogamik gametofitik apomiktik üreme mekanizmaları ile seksüel üreme süreçlerinin karşılaştırılması (Leblanc ve Mazzucato 2001)



Seksüel üreme mayoz geçirmiş gametlerin oluşumu ve füzyonlarını gerektiren bir süreçtir. Dişi gamet oluşumu ve döllenme ovül adı verilen özel üreme organında meydana gelir (Drews vd 1998). Genelde ovül içerisindeki tek bir hücre (megaspor ana hücresi) mayoz bölünmeye uğrayarak kromozom sayısı yarıya indirilmiş 4 spordan ibaret tetradı oluşturur. Bunlardan sadece bir tanesi mitotik bölünmelerle dişi gametleri içeren olgun embriyo kesesine dönüşür. Ardından yumurta hücresi bir sonraki generasyonu verecek embriyoyu ve merkezi hücreler de tohum gelişme ve çimlenmesi için gerekli endospermi oluşturmak üzere erkek gamet (sperm) ile döllenir. Buna karşın, gametofitik apomiksi sırasında bu adımlardan birçoğu ya atlanır ya da değiştirilmiştir; 1) Gametofitik apomiktiklerde mayoz sonrası kromozom sayısı yarıya inmez (apomayoz) fakat buna rağmen embriyo kesesi gelişmeye devam eder. Diplosporide apomayotik hücre mayoz geçirmemiş bir megaspor ana hücresinden köken alır. Aposporide ise ovül içerisinde megaspor ana hücresi dışında bir hücreden gelişir. 2) Apomayotik yumurta hücresi döllenme olmaksızın embriyoya dönüşür (partogenez). 3) Merkezi hücreler ya kendiliğinden (otonom) ya da döllenme (pseudogami) ile endospermi geliştirirler (Koltunow 1993, Viella-Calzada vd 1996). Genetik çalışmaların çoğunlukla melezleme ve rekombinasyona bağlı olması apomiktiklerle çalışmayı zorlamıştır. Yine de çoğu apomiktik bitki mayoz geçirmiş normal polen üretebilmektedir. Bu sayede apomiksini kalıtımı apomiktikler ve bunların seksüel üreyen yakın akraba türleri aralarında yapılan melezlemelerdeki açılım oranları ile araştırılabilir. Bu tür analizler gametofitik apomiktiklerin hemen hemen hepsinin poliploid olması nedeniyle zordur. Ayrıca hibritlerdeki üreme sistemlerinin belirlenmesi zaman alıcı sitolojik gözlemler gerektirmektedir. Sonuç olarak apomiksini kontrolü hakkında çok az bilgi vardır. *Ranunculus auricomus* ve *Panicum maximum* üzerinde yapılan araştırmalar, aposporinin bu iki türde dominant tek bir gen tarafından kontrol edildiğini göstermiştir (Koltunow 1993). Daha sonraki çalışmalarda, hem diplospori hem de aposporinin diğer bazı türlerde de bu açılım modeline uyduğunu göstermiştir. Bu modele göre apomiktik bitkiler Aaaa genotipindedir (A: dominant apomayoz, a:seksüel üreme) ve seksüel üreme potansiyeline sahiptirler fakat bu özellikleri dominant apomiksi faktörü tarafından baskılanmıştır (Grossniklaus vd 2001).

Yukarıda belirtilen model birkaç türde moleküler işaretleyicilerle de desteklenmiştir. Bugüne kadar test edilen tüm örneklerde apomayoz lokusu etrafında rekombinasyonun baskılandığı bulunmuştur. Örneğin, aposporik *Pennisetum squamulatum* ve diplosporik *Erigeron annuus*'da beklenenden çok daha fazla sayıda moleküler işaretleyicinin apomayoz ile birlikte açıldığı tespit edilmiştir (Ozias Akins vd 1998, Noyes ve Riseberg 2000). Yine *Brachiaria decumbens*, *Tripsacum dactyloides* ve *Paspalum simplex*'de mısır ve çeltik işaretleyicileri ile yapılan karşılaştırmalı haritalama çalışmalarında apospori ile ilgili bölgenin rekombinasyona uğramadığı bulunmuştur (Pessino vd 1998, Grimanelli vd 1998a). Bu işaretleyicilerin seksüel yakın akraba türlerde 15 ile 40 santimorgan (cM) arasında bir DNA bölgesi boyunca yayıldığı gözlenmiştir. Rekombinasyonun baskılanmış olması özellikle haritaya dayalı klonlama (map-based cloning) çalışmalarını zorlaştırabilir. Çünkü, işaretleyiciler apomiksi lokusuna çok yakın bağlantılı olsalar bile fiziksel olarak uzakta olabilirler. Apomayoz lokusu için rekombinasyon hem dikotiledon hem de monokotiledon türlerde baskılandığından dolayı ortak bir karakter olabilir. Bu karakter *Brassica*'lardaki kendine uyumsuzluk (*S*) lokusu gibi birden fazla genin dahil olduğu kompleks fonksiyonu olan bir bölge olabilir (Awadalla ve Charlesworth 1999). Alternatif olarak, evrimsel açıdan uzun süre aseksüel üremenin sonucu ortaya çıkmış olabilir (Welch ve Meselson 2000). Apomiktik *Pennisetum* türlerinde apospori ile birlikte açılım gösteren işaretleyiciler aynı türün seksüel akrabalarında tespit edilememiştir (Ozias-Akins vd 1998, Roche vd 1999).

Apomiksi seksüel üremeden apomayoz, partenogenez ve endosperm gelişimi (otonom ya da pseudogamik) ile ayrılır. Apomiksinin bu elementlerinin kaç genle idare edildiğini anlamak için bir dizi araştırma yapılmıştır. *Ranunculus auricomus* ve *Panicum maximum* üzerine yapılan araştırmalar partenogenez ve aposporinin yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Nogler 1984). Dahası apomiksi tek bir Mendel karakteri olarak bir sonraki döllere aktarılmıştır. Benzer olarak *Hieracium piloseloides*'de üç elementin hepsi birden tek bir karakter olarak kontrol edilir (Bicknell vd 2000). Bu türlerde apomiksi bütün elementleri tek bir gen veya sıkı şekilde birbiri ile bağlantılı birkaç gen kompleksi ile kontrol ediliyor olabilir. Buna karşın diğer türlerde, apomiktik ve seksüel türler arasında yapılan melezlemeler hem seksüel hem de apomiktik üremeye

ait çeşitli elementleri taşıyan döller vermiştir. *Taraxacum officinale*'de diplospori ve otonom endosperm gelişimi gösteren fakat, partenogenetik olmayan hibritler elde edilmiştir (Van Dijk vd 1999). Buna benzer apomiksi rekombinantları *Poa pratensis*'de de rapor edilmiştir (Matzk vd 2000). Sonuç olarak her iki türde apomiksinin elementlerinin farklı genlerle kontrol edildiği öne sürülmektedir. *Erigeron annuus*'da diplospori (A) ve partenogenez (P) iki farklı gen olarak haritalanmıştır (Noyes ve Rieseberg 2000).

Gametofitik apomiktikler genellikle poliploid iken yakın seksüel akrabaları diploiddir. Birçok türde apomiksi ve diploidinin uyuşmadığı gösterilmiştir (Nogler 1982, Bicknell 1997, Kojima ve Nagato 1997). Tetraploid apomiktik *Ranunculus*'da haploid yumurta ve sperm hücresinin birleşmesi sonucu oluşan diploid döllerin apomiktik olarak üreyemediği fakat anter kültürü ile elde edilmiş diploid bireylerin apomiktik oldukları bulunmuştur (Nogler 1982). Bu sonuçlara göre apospori lokusunun (A) gametlerde resesif letal olduğu hipotez edilmiştir (Nogler 1982). A lokusu poliploid apomiktik oluşturmak üzere diploid gametler ile kalıtlanabilirken, diploid oluşturmak üzere haploid gametlerle kalıtlanamazlar. Buna ek olarak, A lokusu ile yakından bağlantılı mutasyonlar da haploid gametlerin fonksiyonel olmalarını engellemiş olabilir. Sonuç olarak A lokusunu taşıyan haploid gamet, döl oluşumuna katılmaz ve A lokusunun açılım oranını bozar. Apomiksi lokusu *Tripsacum dactyloides*, *Pennisetum squamulatum* ve *Erigeron annuus* gibi diğer türlerde de açılım oranı bozukluğu gösterir (Grimanelli vd 1998a, b, Ozias Akins vd 1998, Noyes ve Rieseberg 2000).

Kültür bitkilerinin iyileştirilmesi için kullanılan birçok ıslah stratejisinde amaç hibrit tohum üretimidir. Hibrit tohumlar ebeveynlerinden daha verimli ve güçlü bitkiler oluşturur. Bununla birlikte, hibrit tohum üretimi uzun süren kendileme ve seleksiyon süreçleri sonunda elde edilen saf hatların oluşturulmasına bağlıdır. Fakat kültür bitkilerinin çoğunun seksüel yollarla üremesi sebebi ile tohumların hibrit gücü ancak bir generasyon sürer. Bunun nedeni, ticari hibritlerdeki uniform karakterlerin hibrit döllerinde genetik açılıma uğramasıdır. Buna karşın apomiksi, ana bitki ile genetik özdeş tohumlar üretebilen bir sistem sağlayarak hibrit gücünü sabitleyebilir. Ayrıca, lokal varyetelerin ıslah kaynağı olarak kullanılabilmesine olanak sağlayarak, bitki genetik

kaynaklarının korunmasına hizmet edeceği gibi, bitki ıslahının etkinliğini artıracaktır. Bu nedenle, apomiktik tohumların geliştirilmesi üreticilere hibrit tohumlarının performanslarını kaybetmeden çoğaltma ve kendi lokal çeşitlerini kullanabilme şansı taniyacaktır. Tohum şirketleri ise, apomiksinin ıslah şemalarını basitleştirerek, doku kültürü masraflarından ve üretim giderlerinden kurtularak yararlanacaklardır. Henüz mekanizması tam olarak bilinmese bile, yukarıda anlatılan özelliklerinden dolayı apomiktik üremenin tarıma büyük yararları olacağı bildirilmiştir (Koltunow 1993, Grossniklaus vd 1998). Apomiksinin seksüel üreyen kültür bitkilerine aktarılması sayesinde ortaya çıkabilecek yararlar şu şekilde özetlenebilir;

a) Apomiksi sayesinde iki farklı türün melezlenmesi ile elde edilen bireyler de dahil olmak üzere, istenilen her bitki bireyi genetik olarak sabitlenecek, hem seksüel hem de vejetatif olarak üretilen kültür bitkilerinde yeni ıslah stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlanacaktır. Apomiksi, ıslah süreçlerinde bitki familyası temeline bağlı stratejileri birey bazına çevirecektir.

b) Apomiksi, hemen hemen bütün kültür bitkilerinden sınırsız sayıda hibrit çeşit eldesini, verimli atasal hatlarla onlardan türetilen hibritlerin devamını ve büyük ölçeklerde üretimini hızlandıracaktır. Bu özellikle daha önce hibrit teknolojisi geliştirilmemiş çok sayıda kültür bitkisi için bir devrim olacaktır. Özellikle, özel bir ıslah programı ile elde edilmiş  $F_1$  hibritlerin genotipleri sabitlenecek, bu sayede tohumlar klonal olarak sürekli ve ucuz bir şekilde üretilecektir. Apomiksi hibrit tohum üretiminde maliyeti azaltacaktır. Tozlaşma ve döllenme aksaklıkları nedeniyle meydana gelen ürün kayıplarının önüne geçilecektir. Hibrit tohumlar, doğrudan üreticiler tarafından çoğaltılacaktır.

c) Şu anda birçok sebze, meyve ağacı ve süs bitkisinin klonal çoğaltılmasında kullanılan doku kültürleri gibi pahalı ve zaman alıcı vejetatif çoğaltımdan kaçınmayı sağlayacaktır. Apomiksi çelikle çoğaltmanın yerini alacaktır.

d) Apomiksi sayesinde yetiştirme koşulları, patojen popülasyonu ve pazarlama ihtiyacına göre etkili olabilecek hızlı ve esnek bitki ıslahı yapılabilecektir.

e) Vejetatif olarak üretilen patates, kasava, tatlı patates ve yam gibi kültür bitkilerinin gerçek tohumla çoğaltılmasına ve bu sayede vejetatif üretim esnasında taşınan hastalıklara engel olunacaktır.

f) Otonom apomiksinin erkek steril varyetelere aktarılması ile transgenik karakterlerin yayılması engellenecektir.

g) Gelişmekte olan ülkelerde sürdürülebilir tarıma faydalar sağlayacaktır. Örneğin, kendine döllen çeltik varyeteleri birçok ülkede kendilenmiş hat olarak üretilmektedir. Buna karşın hibrit varyetelerin kullanılması ile verimin %20 oranında arttığı gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı apomiksi çeltikte ekonomik faydalar sağlayacaktır.

Apomiksi teknolojisi “Yeşil Devrim” sırasında adapte edilmiş yarı bodur tahıl varyetelerinin iyileştirilmesine olanak sağlayarak tarımsal üretimde çok büyük artışa yol açacaktır. Tüm bu olumlu etkilerden dolayı, apomiksi teknolojisinin uygulamaya geçirilmesi günümüzde Bitki Biyoteknolojisinin en önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir.

Apomiksiyi tarımsal açıdan kullanılabilir hale getirmek için yapılan ilk çalışmalarda, birbirine yakın türler arasında melezlemeler yapılmıştır. Örneğin apomiktik *Tripsacum* ile seksüel mısır bitkileri arasında yapılan türler arası melezlemede başarı elde edilmiştir. Moleküler işaretleyiciler kullanılarak *Tripsacum*'da apomiksisi kontrol eden lokusun mısır bitkisine aktarıldığı gösterilmiştir (Leblanc vd 1996). Bu lokuslar şu anda apomiksise aday genler için analiz edilmektedir. Yine benzer bir çalışmada, apomiktik *Pennisetum squamulatum* ile seksüel *P. glaucum* arasında yapılan melezlemelerden obligat apomiktik bir hat elde edilmiş ve yapılan araştırmalar *P. squamulatum* genomunda yakın seksüel akrabalarında gözlenmeyen apomiksisi ile ilgili bir bölge olduğunu göstermiştir (Ozias-Akins vd 1998). Apomiksisi kültür bitkilerine aktarılmasındaki direkt yollardan biri de genetik mühendisliğidir. Bu amaç doğrultusunda apomiksiyi kontrol eden genlerin izole edilmesi gerekmektedir.

Alternatif olarak mRNA populasyonları arasında moleküler karşılaştırmalar yapılmaktadır. Örneğin, seksüel ve apomiktik *Pennisetum ciliare* ovaryumlarında farklı genlerin ifade olduğu tespit edilmiştir (Viella-Calzada vd 1996). Apomiksis ile ilgili genleri tanımlamak için kullanılabilir bir başka yöntemse mutasyon çalışmalarıdır. Erkek kısır *Arabidopsis* hatlarında yapılan mutasyon çalışmalarında döllenme olmaksızın endosperm oluşturabilen mutantlar elde edilmiştir (Luo vd 1999). Özetle, apomiksiyi kontrol eden genetik elemanları belirlemek için seksüel ve apomiktik model bitkilerle çalışmak gerekmektedir (Grossniklaus vd 1998). Ayrıca tarımsal sistemler için en uygun özelliklere sahip apomiktik üreme seçilmelidir. Burada sporofitik ve gametofitik apomiksi ile obligat (zorunlu) ve fakültatif üreme arasında tercih yapılmalıdır. Bir obligat apomiktik kısa süreli avantaj sağlasa bile tarımsal sistemlerde arzu edilmeyebilir. Çünkü seksüel üremeye geri dönüş olmaması yeni varyetelerin ıslahını zorlaştırır. Bununla beraber fakültatif apomiktikler, özel bir genotipin hem seksüel hem de aseksüel üremelerle daha uyumlu olmasına yol açar. Sporofitik apomiksi ise pseudogamiye ihtiyaç duyduğu için çok kullanışlı olmayabilir.

*Arabis* (*Brassicaceae*) cinsinde çok çeşitli üreme mekanizmaları vardır. Bu cins içerisinde bazı türler tamamen seksüel ürerken, bazıları apomiktik olarak ürerler. *Arabis gunnisoniana* ve *A. holboellii* hem pseudogamik hem de fakültatif apomiktik olarak, *A. drummondii* ise seksüel üreyen bir tür olarak tanımlanmıştır (Roy 1995). Pseudogami apomiksinin oldukça yaygın bir formudur. Pseudogamik bitkilerde yumurta hücresi partenogenetik olarak gelişirken, endosperm gelişimi için polar nukleusların polen hücresi ile döllenmesi gerekir. *Arabis* türlerinde erkek bireylerde polen fonksiyoneldir, bu sayede seksüel ve apomiktik bireyler arasında melezlemeler yapılabilir. Bu çalışmada, yukarıda belirtilen doğal apomiktik ve seksüel *Arabis* türleri model bitki olarak seçilmiştir. Bu türlerdeki üreme sistemlerini kontrol eden moleküler süreçleri araştırabilmek için, bir genetik transformasyon sistemi geliştirilmelidir. Literatür taramalarında henüz bu türlere ait bir genetik transformasyon sistemi ile karşılaşılmanmıştır. Bu çalışmada, seksüel ve apomiktik üreyen bazı *Arabis* türlerinin *in vitro* rejenerasyon yetenekleri, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyonu ve sitolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu projeden elde edilen sonuçlar, *Arabis* türlerinde apomiksisini kontrol eden genetik mekanizmaların ortaya

çıkarılmasında kullanılacaktır. Daha ileriki projelerde genetik transformasyon sistemi sayesinde bu bitkiye çeşitli işaretleyici genler aktarılacak ve bu genlerin kalıtımı incelenecektir. Ayrıca, apomiksisi kontrol eden genlerin izolasyonu ve tanımlanabilmesi için transpozon ve T-DNA mutagenesiz gibi bazı tekniklere olanak sağlayacaktır. Kalıtımı izlenebilecek işaretleyici genleri sayesinde otonom endosperm gelişimi hakkında moleküler seviyede bilgi elde edilecektir. *Arabidopsis thaliana* ile yakın akraba olan *Arabis gunnisoniana*'da halihazırda apomiksinin elemanları ile ilgili olabilecek, çeşitli araştırmacılar tarafından *Arabidopsis*'ten izole edilmiş bazı genlerin fonksiyonları incelenebilecektir (Koch vd 1999). Böylelikle, dölleme olmaksızın endosperm ve embryo gelişimi hakkında bir model oluşturulacaktır. Bunların sonucunda, apomiksinin kültür bitkilerine aktarılması tartışılacaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Apomiksi ile ilgili kaynaklar

Dujardin ve Hanna (1989), obligat apomiktik *Pennisetum squamulatum*'dan *Pennisetum purpureum*'e apomiksiyi aktarmak için türler arası melezleme yapmışlardır. Melezleme sonucunda F<sub>1</sub> hibritler ve obligat apomiktik bir geri melez (BC<sub>1</sub>) elde edilmiştir. Çalışmada erkek gametler apomiktik ebeveynden alınmıştır. Buna karşılık, F<sub>1</sub> hibritlerinden obligat apomiktik aynı zamanda da erkek fertil geri melezler (BC<sub>2</sub>) meydana gelmemiştir. Daha sonra erkek kısırılığın üstesinden gelmek için *P. glaucum* x *P. purpureum* hibritleri ile *P. glaucum* x *P. squamulatum* hibritleri melezlenmiştir. Elde edilen hibritler (2n=42) apomiksi ile ilgili genlerin *P. glaucum*'a aktarılması için tetraploid *P. americanum* (2n=28) ile 3 kez geriye melezlenmiştir. Sonuçta kısmen erkek fertil obligat apomiktik bir geri melez (BC<sub>3</sub>) elde edilmiştir.

Koltunow (1993), apomiktik üremeyi ve süreçlerini tanımlayarak apomiktik üreme üzerine yapılan araştırmaları özetlemiştir. Buna göre, apomiksi angiospermilerin dişi üreme organlarında meydana gelen aseksüel bir üreme şeklidir. Apomiktik üreme diplospori, apospori ve adventif embriyoni olmak üzere 3 farklı mekanizmadan oluşur. Diplospori ve apospori ovül gelişiminin erken safhalarında gözlenirken, adventif embriyo ovül gelişiminin daha geç safhasında başlar. Diplospori ve aposporide mayoz gerçekleşmez, embriyo kromozom sayısı indirgenmemiş bu gametofitten döllenme olmaksızın gelişir. Bu nedenle diplospori ve apospori gametofitik apomiksi olarak adlandırılır. Buna karşılık adventif embriyolar megagametofit dışındaki ovül dokularından köken alır. Bu nedenle adventif embriyoni sporofitik apomiksi olarak bilinir. Derlemede ayrıca apomiksini genetik olarak aktarılan bir karakter olduğu ve az sayıda gen tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir.

Ozias-Akins vd. (1993), apomiksiyi *Pennisetum squamulatum*'dan seksüel *P. glaucum*'a aktarmak için yaptıkları araştırmada obligat apomiktik bir geri melez hattı (BC<sub>3</sub>) elde etmişlerdir. Moleküler işaretleyici analizleri (RFLP ve RAPD) bu hattın apomiktik ebeveynden (*P. squamulatum*) genomik DNA taşıdığını göstermiştir. Bu



moleküler işaretleyiciler arasından seçilen 3 RFLP klonuna ait DNA baz dizileri sayesinde özgün primerler elde edilmiş, bu primerler daha sonraki geri melezlerin moleküler analizlerinde kullanılmıştır. Sonuçta apomiktik üremenin iki moleküler işaretleyici ile birlikte kalıtım gösterdiği ve tek bir kromozom ile aktarılabileceği belirtilmiştir.

Sherwood vd. (1994), tetraploid *Pennisetum ciliare*'de aposporinin kalıtımını araştırmışlardır. Çalışmada hem seksüel hem de apomiktik bitkiler kullanılmıştır. Seksüel bitkilerin kendilenmesi veya kendi aralarında melezlenmeleri sadece seksüel döl vermiştir. Buna karşılık, seksüel ve apomiktik bitkilerin melezlenmeleri sonucunda aposporik ebeveyne bağlı olarak seksüel ve apomiktik üreme yaklaşık 15: 13 veya 3: 8 oranlarında açılım göstermiştir. Bu oranlar apospori ile ilgili öne sürülen daha önceki modellere uymamış olmasına rağmen *Panicum maximum* için önerilen modele uyar. Bu modele göre apospori ifade olabilmek için tetrazomik olarak kalıtılan tek bir lokusun dominant alleline (A) ihtiyaç duyar. İkinci bir lokustan dominant başka bir allel (B) ise seksüel üremeyi sağlar.

Koltunow vd. (1995), apomiksinin tarıma faydalarını tartışmışlardır. Buna göre, apomiktik süreçler sonucunda oluşan döller ana bitki ile genetik olarak özdeş olduğu için apomiksi ile üstün özellikli varyetelerin genotipleri sabitlenebilir, tozlanma ve döllemeye bağlı olmaksızın sürekli ve ucuz bir şekilde tohum elde edilebilir. Vejetatif olarak çoğaltılan birçok kültür bitkisi bu yolla üretilebilir. Günümüzde tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılan hibrit çeşitleri bir sonraki generasyonda genetik açılımlar meydana geleceği için tohum kaynağı olarak kullanılamaz. Bu nedenle, hibrit tohum üretimi için, ebeveyn hatların sürekli üretilmesi ve melezlenmesi gerekmektedir. Apomiksi sayesinde hibrit gücü sabitlenebilir, ebeveyn hatların çoğaltılması veya erkek steril bitkilerin kullanılmasından kaçınılabılır. Kısaca, apomiksi hibrit tohum üretiminde maliyeti önemli ölçüde azaltacaktır. Derlemede ayrıca apomiksinin genetik temelinin daha iyi anlaşılabilmesi için model bitkiler (*Hieracium* ve *Arabidopsis*) önerilmiştir.

Calzada vd. (1996), apomiktik üreme hakkında yaptıkları derlemede apomiksiyi tanımlamış, apomiktik süreçler hakkında bilgi vermişlerdir. Buna göre, apomiktiklerde

embriyolar mayoz bölünme ve döllenme olmaksızın partenogenetik olarak gelişirken endosperm ya döllenerek (pseudogami) ya da kendiliğinden gelişir. Derlemede ayrıca apomiksinin tarıma faydaları tartışılmıştır. Buna göre, ekonomik önemi olan seksüel bitkilerden elde edilecek apomiktikler sayesinde hibrit genotiplerin üretimi ve kullanımı artacaktır.

Leblanc vd. (1996), apomiksiyi tetraploid ( $2n: 72$ ) *Tripsacum*'dan mısır bitkisine ( $2n: 20$ ) aktarmak için yaptıkları çalışmalarda geri melezlerle her iki türden de birer genom taşıyan polihaploid ( $2n: 28$ ) mısır-*Tripsacum* bitkileri elde etmişlerdir. Bu bitkiler tamamen erkek steril olmalarına karşın mısır ile tozlaştırıldıklarında apomiktik olarak tohum meydana getirmişlerdir. Ayrıca bu bitkilerde mayoz başarısız olmuş, diplospori gelişmiştir. Bu çalışma mısır gibi diploid bir bitkinin de apomiksi ile üreyebileceğini, dolayısıyla diplospori ve poliploidinin bağlı olmadığını göstermiştir.

Viella-Calzada vd. (1996), seksüel ve apomiktik *Pennisetum ciliare* ovaryumlarındaki genlerin ifadelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada 22 farklı primer kullanılarak, 200-600 bp arasında değişen büyüklüklerde 2268 cDNA fragmenti elde edilmiştir. Bunlar arasından 8 tanesi tanımlanarak klonlanmıştır. Northern analizlerine dayanarak bu cDNA'lardan sadece 1 tanesinin seksüel, 2 tanesinin apomiktik ve 1 tanesinin de her iki ovülde de ifade olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan fragmentlerden 3 tanesi tespit edilemezken, bir tanesi hem ovüllerde hem de gövde ve yapraklarda bulunmuştur. Bu çalışma *P. ciliare*'nin seksüel ve apomiktik üremeyi karşılaştırmak için model sistem olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

Bicknell (1997), bir çalışmasında *Hieracium aurantiacum*'dan diploid apomiktik bir bitki izole etmiştir. Gametofitik apomiktikleri içeren birçok bitki grubunda olduğu gibi *Hieracium* cinsinde de bu güne kadar çalışılmış bütün apomiktik biyotiplerin poliploid olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *H. aurantiacum*'un apomiktik populasyonlarında varyasyon elde edilmiş, taksondaki diğer bitkiler gibi aposporik ama diploid bir bitki gözlenmiştir. Bu bitkide mayoz bölünme normal değildir ve endosperm kendiliğinden döllenme olmaksızın gelişebilmektedir. Buna rağmen tohum bağlama yeteneği daha azdır. Araştırmacılar *Hieracium* cinsinde apomiksinin ifade olabilmesi

için poliploid seviyenin şart olmadığını bildirmişlerdir.

Burson (1997), bazı *Paspalum* türlerinin üreme mekanizmalarını sitolojik yöntemlerle araştırmıştır. Buna göre *P. modestum*, *P. monostachyum*, *P. repens* ve *P. alcalinum* seksüel diploid ( $2n=2x=20$ ) genotiplere sahiptir. Mayoz, bu genotiplerde düzenlidir. *P. modestum* seksüel olmasına karşın ovüllerin % 43'ünde dişi gametofit bozulmuştur. *P. alcalinum* ve *P. paucilolium*'un 2, *P. falcatum* ve *P. unispicatum*'un 1 ve *P. polyphyllum*'un 3 genotipinin tetraploid olduğu bulunmuştur ( $2n=4x=40$ ). Hangi tür olursa olsun bütün tetraploidlerin fakültatif aposporik apomiksi ile ürediği tespit edilmiştir.

Bonilla ve Quarin (1997), *Paspalum minus*'un pentaploid ırklarının üreme sistemlerini araştırmışlardır. *P. minus* Kuzey ve Güney Amerikada geniş alanlara yayılmış otsu bir türdür. Daha önceki araştırmalar bu tür içerisinde diploid, tetraploid ve pentaploid ırkların var olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada sitolojik araştırmalar pentaploid ırklarda mayozun düzensiz olduğunu işaret etmiştir. Mayoz metafaz I'den sonra durur ve nükleus mitoz meydana getirecek şekilde yeniden düzenlenir. Erkek mayositlerde ise mayoz sonrası kromozom sayısı indirgenmemiş 2 polen taneciği oluşur ( $2n=5x=50$ ). Ovüllerde, arkeosporal hücreden mayoz geçirmemiş 2 megaspor oluşur. Bunlardan mikropilar bölgede bulunanı dejenere olurken diğeri diplosporik embriyo kesesi meydana getirir. Mayoz geçirmemiş yumurta hücresi ise partenogenez ile embriyo oluşturur. Buna ek olarak, diplosporik embriyo kesesi etrafında aposporik embriyo kesesi gelişir.

Gustine vd. (1997), *Pennisetum ciliare*'de apospori ile bağlı moleküler işaretleyiciler tespit etmişlerdir. *P. ciliare*'de apospori ototetraploid olarak döllere aktarılan tek bir gen ile kontrol edilir. Daha önceki araştırmalar bu gen ile birlikte aktarılabilen sadece 2 tane işaretleyicinin varlığını işaret etmiştir. Bu araştırmanın amacı apospori lokusu ile birlikte açılım gösteren yeni işaretleyiciler tanımlamak ve bir linkage haritası oluşturmaktır. Araştırmada seksüel bir klon olan B-2s ile aposporik Higgins ve B-12-9 klonları melezlenmiştir. Elde edilen döller bulk segregant analizi için RAPD işaretleyicileri ile taranmıştır. Beşyüz dekanukleotid primerler kullanılarak

apospori ile bağlantısı olan 5 yeni moleküler işaretleyici bulunmuştur.

Barcaccia vd. (1998), fakültatif aposporik bir tür olan *Poa pratensis*'de partenogenez kalıtımını araştırmışlardır. Araştırmada apomiktik genotipler ve seksüel klonlar arasındaki melezler RAPD ve AFLP işaretleyicileri ile analizi edilerek apomiksi ile ilgili olabilecek genetik bağlantı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntem sayesinde partenogenezi kontrol eden gene yakınlığı 6.6 cM olan bir AFLP işaretleyicisi ile hedef bölgeyi çevreleyen 15.4 cM'lık bir genomik pencere tespit edilmiştir. Yine partenogenez lokusunu taşıyan kromozom bölgesinin ilave RAPD ve AFLP işaretleyicileri ile haritası çıkarılmıştır. Partenogenez ve belirli sayıda AFLP işaretleyicisi arasında belirlenen bağlantı bu karakterin monogenetik olarak idare edildiğini ileri süren hipotezleri desteklemiştir.

Grimanellii vd. (1998a), mısır bitkisinin yakın akrabası tetraploid *Tripsacum*'da apomiksi kalıtımını araştırmışlardır. Buna göre poliploid *Tripsacum*'lar diplosporik apomiksi ile ürer. Diplosporide mayoz bölünme gerçekleşmez (apomayoz) ve kromozom sayısı indirgenmemiş gametler partenogenezle embriyo oluşturur. *Tripsacum*'da diplosporik apomiksiyi kontrol eden kromozom, mısır RFLP problemleri kullanılarak hem tetraploid hem de diploid seksüel türlerde haritalanmış ve bu kromozom ile mısır genomunda bir bölge arasında yüksek düzeyde benzerlik bulunmuştur. Seksüel bitkiler ve mısır ile karşılaştırıldığında apomiktik tetraploidlerde bu bölgede rekombinasyon büyük ölçüde baskılanmaktadır. Bu sonuç apomiksini tek bir genle kontrol edildiğini işaret etse bile ilgili bölgenin birbiri ile bağlı bir grup lokus ile kontrol edilebileceğini göstermiştir. Sonuçlara göre seksüel *Tripsacum* genotiplerinde 40 cM'lık bir alanı kaplayan apomayoz ile ilgili bu bölge tek bir genetik öge olarak aktarılır, ama henüz hangi genlerin işe karıştığı bilinmemektedir.

Grimanellii vd. (1998b), diplospori bağlı moleküler işaretleyiciler kullanarak mısır-*Tripsacum* hibrit ve geri melezlerini analiz etmişlerdir. *Tripsacum* apomiktik kompleksinde poliploidlerin hepsi diplosporik apomiksi ile ürerken diploidler seksüeldir. Sonuçlar *Tripsacum*'da apomiksiyi kontrol eden gen ya da genlerin haploid gametler aracılığı ile aktarıldığında, apomiksi allellerinin kaybına yol açan bir sistem ile

bağlantılı olduğunu işaret etmiştir. Ayrıca bu model apomiksi ve poliploidi arasındaki ilişki için bir açıklama sunar.

Grossniklaus vd. (1998), yaptıkları derlemede apomiksi üzerine yürütülen araştırmaları özetlemişlerdir. Buna göre, apomiktik bitkiler mutasyonlarla değil, seksüel akrabalar arasında meydana gelen hibridizasyonlar sonucunda evrim geçirmişlerdir. Günümüzde araştırmalar daha çok kültür bitkilerinin yakın akrabaları (*Tripsacum* ve *Pennisetum* gibi) üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlara ek olarak hem doğal apomiktik yabancı bitkilerde hem de seksüel üreyen model bitkilerde genetik mühendisliği yolu ile apomiktik üreme hakkında daha fazla bilgi elde edilmeye çalışılmaktadır. Derlemede ayrıca apomiksinin ekonomik ve sosyal faydalarından bahsedilmiştir.

Ozias-Akins vd. (1998), *Pennisetum squamulatum*'da apomiksiye bağlı moleküler işaretleyiciler sayesinde aposporinin muhtemelen seksüel genotiplerde alleli olmayan farklı bir lokus tarafından genetik olarak kontrol edildiğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmada obligat aposporik bir tür olan *P. squamulatum* aynı genus içerisindeki seksüel *P. glaucum* ile melezlenmiş ve apomiksi ve seksüel üreme arasında açılım veren 397 bireyden oluşan hibrit popülasyonu elde etmişlerdir. Bu hibritlerde haritalanan 13 moleküler işaretleyicinin 12 tanesinin apospori ile beraber açılım verdiği bulunmuştur. Böylelikle aposporiye özgün bölgenin genetik rekombinasyona uğramadığı ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak apomiksi lokusunu içeren kromozom bölgesinin rekombinasyona uğramaması tesadüf olabileceği gibi ilgili genin fonksiyonunu koruyabilmesi için evrimsel süreç içerisinde de meydana gelmiş olabileceğine işaret edilmiştir.

Roche vd. (1999), *Cenchrus ciliaris* ve *Pennisetum squamulatum*'da apospori özgün bölgenin ortak olduğunu bildirmiştir. Çalışmada *P. squamulatum*'da apospori ile bağlı 12 moleküler işaretleyici tespit edilmiştir. Bu 12 moleküler işaretleyiciden 6 tanesinin aposporik ve seksüel *C. ciliaris* genotipleri arasında dominant olduğu bulunmuştur. Geriye kalanlardan 5 tanesi apospori ile sürekli bağlantı verirken 1 tanesi 84 dölde düşük düzeyde rekombinasyon vermiştir. Bunlara ek olarak tespit edilen diğer moleküler işaretleyicilerle beraber DNA dizi analizleri her iki türde de apospori özgün

genomik bölgenin korunmuş olduğunu göstermiştir.

Tas ve Van Dijk (1999), diploid seksüel ve triploid apomiktik *Taraxacum* türleri arasında melezlemeler yapmışlar ve apomiktik üremenin kalıtımını incelemişlerdir. Bu melezler diploid x diploid melezlerinden çok daha az tohum bağlamıştır. Canlı kalabilen döllerin %90'nının kendilenme sonucu oluşan diploidler olduğu allozim işaretleyicileri ile tespit edilmiştir. Bunun nedeni, aneuploid polenin sporofitik kendine uyumsuzluğu ortadan kaldırmasıdır. Araştırmada hibrit oldukları allozim analizleri ile tespit edilen 26 dölden 15'inin triploid, 4'ünün diploid ve 7 tanesinin de tetraploid olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre diploid hibritlerin triploidlerden daha az olmasının iki nedeni olabilir; ya haploid polen canlı değildir ya da diploid polen sayıca fazla miktarda meydana gelmiştir. Çalışmada ayrıca emaskülasyon sonrası izole edilmiş çiçeklerde apomiktik tohum gelişimi incelenmiştir. Buna göre triploidlerin 1/3'ünde ve tetraploidlerin hepsinde apomiktik olarak tohum gelişimi gözlenirken diploidlerde bu yolla tohum gelişmemiştir.

Van Dijk vd. (1999), apomiktik üremenin kalıtımını incelemek için diploid seksüel ve triploid apomiktik *Taraxacum* türlerinde melezlemeler yapmışlardır. Hibritlerin üreme sistemlerini açığa çıkarmak için apomiktik olmayan diploid ve triploid hibritler diploidlerle melezlenmiş ve meydana gelen dölleri analiz edilmiştir. Ebeveynin iki diploid hibrit olduğu melezlemede tohum bağlama oranı önemli ölçüde azalmıştır. Buna karşılık fertil olarak tanımlanan 9 hibrit tür 3 tip içerisinde sınıflandırılmıştır. Bunlar A tipi ( $n+n$  hibritleri), B tipi ( $n+n$  ve  $2n+n$  ya da  $2n+0$  ve  $2n+n$  karışımı hibritler) ve C tipidir (sadece  $2n+n$  hibritleri). C tipi bitkilerde yapılan mikrosatellit analizler  $2n$  yumurta hücresinin bir restitüsyon mekanizmasıyla oluştuğunu işaret etmiştir. Bununla beraber tıpkı diğer apomiktlerde olduğu gibi C tipi bitkilerde de mikrosporogenez normal ilerlemiştir. Bu sonuçlar C tipi bitkilerinin diplospori ile ürediklerini ama partenogenetik olmadıklarını göstermiştir. Bu tip bitkiler diğer apomiktik türlerde oldukça nadirdir. Çalışmada sonuç olarak, diplospori ve partenogenez gibi apomiksi elementlerinin birbirinden bağımsız olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar *Taraxacum*'da apomiksi için önerilen tek bir lokus modeli ile çelişir. Bunun yerine araştırmacılar *Taraxacum*'da apomiksiyi birkaç lokusun

kontrol ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Albertini vd. (2001), *Poa pratensis*'de sitolojik yöntemler kullanarak yaptıkları incelemeler sonucunda apospori ve partenogenezin birbirinden bağımsız olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada seksüel ve apomiktik ebeveynler arasında melezlemeler yapılarak F1 populasyonu elde edilmiştir. Bu döllerin yaklaşık yarısının partenogenetik olduğu bulunmuştur. Partenogenetik bu bitkilerde ve ayrıca partenogenetik olmayan 2 bitkide de apospori tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *P. pratensis*'de apospori ve partenogenezin iki farklı genetik faktörle kontrol edildiğini ve her iki sürecin de gelişimsel olarak bağımsız olabileceğini göstermiştir.

Alves vd. (2001), Brezilya'da geniş alanlarda kültürü yapılan tetraploid apomiktik doğal bir tür olan *Brachiaria brizantha* (*Poaceae*)'nin pseudogamik olarak ürediğini tespit etmişlerdir. Çalışmada bu türe ait çiçekler, stigmaları kesildiği zaman tohum bağlayamamıştır. Çünkü çoğu apomiktik bitkide olduğu gibi yumurta hücresi partenogenetik olarak gelişirken, endosperm için döllenme gerekmektedir. Sitolojik analizler polar nükleusların döllenerek triploid endosperm oluşturduğunu göstermiştir.

Bicknell vd. (2000), iki *Hieracium* türünde apomiktik üremenin tek bir gen ile kontrol edildiğini bildirmiştir. Çalışmada apomiktik *Hieracium* biyotipleri triploid *H. piloselloides* ( $2n=27$ ,  $x=9$ ) ve aneuploid *H. aurantiacum* ( $2n=3x+4=31$ ) ve seksüel biyotipler melezlenmiştir. Bu bitkilerin döllerinde apomiksi hem haploid hem de diploid erkek gametlerce taşınabilen monogenik dominant bir karakter olarak kalıtlanmıştır. Benzer diğer sistemlerde olduğu gibi bu bitkilerin döllerinde de diploid apomiktlere rastlanılmamıştır. Araştırmacılar bunun nedeninin haploid gametlere karşı bir seleksiyonun varlığından ziyade diploid zigotların hayatta kalmalarını engelleyen bir seleksiyonun olabileceğini belirtmişlerdir.

Koltunow vd. (2000), ploidipleri farklı *Hieracium* bitkilerinde apomiksinin gelişimsel olarak korunmadığını bildirmişlerdir. *Hieracium* cinsinin bazı üyeleri fakültatif apomiktiktir. Bu türlerde üreme mekanizması apospori, otonom embriyo ve endosperm gelişimi olmak üzere 3 elemandan oluşur. *H. piloselloides* (D3) ve *H.*

*aurantiacum* (A3.4)'da apospor embriyo kesesinin meydana gelme zamanı ve embriyo kesesinin oluşma şekli farklıdır. Genetik çalışmalar her iki türde apomiksinin 3 elemanının tek bir dominant lokus tarafından kodlandığını göstermiştir. Bu çalışmada, D3 ve A3.4 kökenli bir grup *Hieracium* bitkisinde ve bunların hibritlerinde apomiktik üreme mekanizması histolojik yöntemlerle incelenmiştir. Buna karşın ebeveynlerde gözlenen üreme şekline, incelenen bitkilerde rastlanılmamış, apomiksi elemanlarında değişiklikler meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, diğer genetik faktörlerin apomiksinin başlama zamanı, yeri ve gelişme evrelerini etkileyebileceğini bildirmişlerdir.

Noyes ve Rieseberg (2000), triploid *Erigeron annuus*'da apomiksinin birbirinden bağımsız iki lokus tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir. *Erigeron* (*Asteraceae*) genusunda 6 türde diplosporik apomiksi tespit edilmiştir. Bu çalışmada, triploid apomiktik *E. annuus* ( $2n=27$ ) ve diploid seksüel *E. strigosus* ( $2n=18$ ) arasında yapılan bir melezlemeden elde edilen 130 F1 hibridinde apomiktik üreme açılımı incelenmiştir. Moleküler işaretleyici analizleri polisomik kalıtılan birbirine çok yakın 4 işaretleyicinin partenogenez ile ilişkili olduğunu, univalent kalıtlı 11 işaretleyicinin ise sadece diplospori ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuca göre, diplospori ve partenogenez birbirinden bağımsız olarak kalıtılır. Diploid F1'lerde apomiksiye rastlanmamıştır. Araştırmacılar bunun nedenin partenogenez lokusuna karşı resesif letal gametofitik bir seleksiyonun var olması ve diplosporiyi taşıyan bölgenin univalent kalıtım göstermesi olabileceğini belirtmişlerdir.

Bantin vd. (2001), *Tripsacum dactyloides* (*Poaceae*)'i partenogenez çalışmak için doğal bir model sistem olarak belirlemişlerdir. Çalışmada mısır bitkisinin yakın akrabası olan *T. dactyloides*'de partenogenez ile ilgili genlerin ifadesi araştırılmıştır. Ayrıca diploid seksüel ve poliploid apomiktik *T. dactyloides*'in genom büyüklüğü sırası ile 7.37 pg (2C), 14.74 pg (4C) ve 22.39 pg (6C) olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre diploid genom büyüklüğü mısırın yaklaşık 1.35 katıdır. Tohumların %92 oranında apomiksi ile meydana geldiği flow sitometrik tohum analizi ile gösterilmiştir. Apomiktik tohumlarda mayoz geçirmemiş yumurta hücrelerinin %10 oranında döllendiği bulunmuştur. Ayrıca tetraploidlerde embriyoların kendiliğinden geliştiği,



*aurantiacum* (A3.4)'da apospor embriyo kesesinin meydana gelme zamanı ve embriyo kesesinin oluşma şekli farklıdır. Genetik çalışmalar her iki türde apomiksinin 3 elemanının tek bir dominant lokus tarafından kodlandığını göstermiştir. Bu çalışmada, D3 ve A3.4 kökenli bir grup *Hieracium* bitkisinde ve bunların hibritlerinde apomiktik üreme mekanizması histolojik yöntemlerle incelenmiştir. Buna karşın ebeveynlerde gözlenen üreme şekline, incelenen bitkilerde rastlanılmamış, apomiksi elemanlarında değişiklikler meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, diğer genetik faktörlerin apomiksinin başlama zamanı, yeri ve gelişme evrelerini etkileyebileceğini bildirmişlerdir.

Noyes ve Rieseberg (2000), triploid *Erigeron annuus*'da apomiksinin birbirinden bağımsız iki lokus tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir. *Erigeron* (*Asteraceae*) genusunda 6 türde diplosporik apomiksi tespit edilmiştir. Bu çalışmada, triploid apomiktik *E. annuus* ( $2n=27$ ) ve diploid seksüel *E. strigosus* ( $2n=18$ ) arasında yapılan bir melezlemeden elde edilen 130 F1 hibridinde apomiktik üreme açılımı incelenmiştir. Moleküler işaretleyici analizleri polisomik kalıtılan birbirine çok yakın 4 işaretleyicinin partenogenez ile ilişkili olduğunu, univalent kalıtlı 11 işaretleyicinin ise sadece diplospori ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuca göre, diplospori ve partenogenez birbirinden bağımsız olarak kalıtılır. Diploid F1'lerde apomiksiye rastlanmamıştır. Araştırmacılar bunun nedenin partenogenez lokusuna karşı resesif letal gametofitik bir seleksiyonun var olması ve diplosporiyi taşıyan bölgenin univalent kalıtım göstermesi olabileceğini belirtmişlerdir.

Bantin vd. (2001), *Tripsacum dactyloides* (*Poaceae*)'i partenogenez çalışmak için doğal bir model sistem olarak belirlemişlerdir. Çalışmada mısır bitkisinin yakın akrabası olan *T. dactyloides*'de partenogenez ile ilgili genlerin ifadesi araştırılmıştır. Ayrıca diploid seksüel ve poliploid apomiktik *T. dactyloides*'in genom büyüklüğü sırası ile 7.37 pg (2C), 14.74 pg (4C) ve 22.39 pg (6C) olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre diploid genom büyüklüğü mısırın yaklaşık 1.35 katıdır. Tohumların %92 oranında apomiksi ile meydana geldiği flow sitometrik tohum analizi ile gösterilmiştir. Apomiktik tohumlarda mayoz geçirmemiş yumurta hücrelerinin %10 oranında döllendiği bulunmuştur. Ayrıca tetraploidlerde embriyoların kendiliğinden geliştiği,

endospermin ise döllenmeye ihtiyaç duyduğu işaretleyici genler (GUS) sayesinde belirlenmiştir.

Bicknell vd. (2001), apospori ile üreyen *Hieracium* türlerinde apomiksi fonksiyonunu yitirmiş mutantlar elde etmişlerdir. Araştırmada, *Hieracium* cinsi *Pilosella* alt cinsindeki türlerde apomiksinin tek bir lokusta dominant bir karakter olarak aktarıldığı ama apomiksinin ifade olma oranının birbiri ile bağımsız birkaç modifiye edici bölgenin etkisi altında olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, apomiksi ile ilgili olabilecek bölgelerin belirlenebilmesi için değişik yöntemler uygulanmaya başlandığı belirtilmektedir. Araştırmacılar mısır transpozon genleri, T-DNA ve gama ışınları mutasyonları aracılığı ile mutantlar izole etmeye çalışmışlardır. Aseksüel tohumların ışınlanması sonucu toplam 69 stabil mutant elde edilmiştir. Ayrıca *Agrobacterium* aracılığı ile elde edilmiş iki mutantta seksüel üreme korunurken, apomiksi kaybedilmiştir. Bu mutantların birinde apomiksi aposporiyi başlatan öncül hücrelerin meydana gelmemesi nedeniyle, diğerinde ise öncül hücrelerin bölünmemesi nedeniyle fonksiyonunu yitirmiştir.

Blakey vd. (2001), doğal apomiktik poliploid *Tripsacum dactyloides*'de apomiksinin kalıtımını araştırmışlardır. Diploid seksüel ( $2n=2x=36$ ) ve tetraploid apomiktikler ( $2n=4x=72$ ) arasında yapılan melezlemeler sonucunda triploid döller meydana gelmiştir. Triploid bu bitkilerin %50'si steril iken, bazılarının diplosporik apomiktik üremeden dolayı fertil olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla araştırmada bu bitkilerde apomiksi ve fertilete arasında bir ilişki kurulmuştur. Bu bitkilerde tohum bağlama oranı mayoza eğilim artınca azalmıştır. Çünkü gametler eşit oranda dağılım gösterememiştir. Ayrıca, yukarıda açıklanan fertilitate ve 5 RFLP işaretleyicinin birlikte açılım gösterdiği bulunmuştur. Bu işaretleyicilerin mısır bitkisinde benzer şekilde fertilitateyi kontrol eden bölge üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Araştırmacılar, mısır ve *Tripsacum*'da fertilitateyi kontrol eden genlerin korunduğunu bildirmişlerdir.

Grimanelli vd. (2001), derlemelerinde gametofitik apomiksi ve kalıtımı hakkında bilgi vermişlerdir. Buna göre diplospori ve apospori olmak üzere iki farklı süreçten meydana gelen gametofitik apomiksidede embriyo kesesi mayoz geçirmemiş bir

spordan köken alır. Seksüel üreme ile aralarında 3 temel farklılık vardır. Bunlar mayozun gerçekleşmemesi (apomayoz), embriyonun döllenmeksizin oluşması (partenogenez) ve fonksiyonel bir endospermın oluşmasıdır. Apomiksi kalıtsal bir karakter olmasına rağmen genetik kontrolü henüz açıklanamamıştır. Bununla birlikte araştırmalar bazı türlerde apomiksinin monogenik olarak kontrol edildiğini göstermiştir. Ayrıca apomayoz ve partenogenezin hem birlikte hem de tamamen bağımsız olarak açılım gösterebileceği bulunmuştur. Derlemede apomiksinin buğdaygil bitkilerinde farklı genetik lokusların fonksiyonu sonucu ortaya çıkmış olabileceği belirtilmektedir.

Roche vd. (2001), seksüel *Pennisetum glaucum* ve apomiktik F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*) arasında yapılan melezlemelerde apospori özgün genomik bölgenin (AÖGB) Mendel kurallarından saptığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bunun nedeninin seksüel üreme ve embriyo gelişiminin erken safhalarında 4 farklı süreç esnasında olabileceğini belirtmişlerdir. Bunlar sırası ile mayoz bölünme, dişi gametofit gelişimi, döllenme ve daha ileriki embriyo-endosperm gelişimi dönemleridir.

## 2.2. *In vitro* Rejenerasyon ve Genetik Transformasyonla ilgili Kaynaklar

De Block vd. (1984), rejenere olmuş bitkilerde ve onların döllerinde yabancı genlerin ifadesini araştırmışlardır. Çalışmada kanamisin, kloramfenikol ve metotraksat direnç genleri içeren *Agrobacterium* suşları kullanılarak transgenik tütün bitkileri elde edilmiştir. Bu transgenik bitkiler normal gelişmelerini tamamlayarak tohum üretmişlerdir. Araştırmacılar, bu sistemin diğer bitkilere gen aktarmak için de kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Patton ve Meinke (1988), kültüre alınmış *Arabidopsis thaliana* kotiledonlarından bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yabanıl tip *A. thaliana* çeşidi Columbia 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında yüksek oranda rejenerasyon vermiştir. Kotiledon eksplantlardan kültürün 2-3 . haftasından sonra yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Kültürde transformasyon çalışmalarında kullanılan higromisin, kanamisin ve G-418 antibiyotiklerinin kotiledon eksplantlarının gelişimini ve sürgün oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Ayrıca, rejenerasyon yeteneği

yüksek olan kotiledon eksplantlarının gen aktarımı çalışmaları için uygun bir materyal olduğu belirtilmiştir.

Raineri vd. (1990), çeltik bitkisinin genetik transformasyonunu araştırmışlardır. Yabancıl tip *Agrobacterium tumefaciens* suşu A281 ile inoküle edilen çeltik embriyoları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamlarında tümörogenik kallus oluşturmuştur. Bu dokuların DNA hibridizasyon analizleri sonucunda T-DNA'n çeltik genomunda var olduğu bildirilmiştir.

Blake vd. (1991), PCR'in *Agrobacterium* aracılığı ile yapılan transformasyon çalışmalarında, bitki genomuna aktarılan genlerin varlığını tespit etmek için alternatif bir teknik olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada, *A. tumefaciens* aracılığı ile kanamisin direnç geni (*NPTII*) ve *GUS* geni aktarılmış transgenik yoncalarda bu genlerin varlıkları PCR ile tespit edilmiştir.

Özcan vd. (1992), bezelye bitkisinin olgunlaşmamış kotiledonlarından *in vitro*'da adventif sürgün rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yüksek oranda sürgün rejenerasyonu, kallus gelişimini takiben 0.5 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Embriyo ucunun bağlandığı kotiledon bölgelerinin yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olduğunu, ancak embriyo ucunun varlığının adventif sürgün oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Ortama gümüş nitrat eklenmesi sürgün sayısını artırmamıştır.

Wu vd. (1992), *in vitro*'da *Arabidopsis thaliana* zigotik embriyolarının kültüründen bitki rejenerasyonu elde etmişlerdir. *A. thaliana* zigotik embriyoları *in vitro*'da 3 farklı tipde rejenerasyon göstermiştir; 1) Normal bitki gelişimi 2) Morfogenetik kallus oluşumu 3) Somatik embriyogenez. Zigotik embriyolar gelişimlerinin erken safhalarında mekanik olarak izole edilip sıvı B5 besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Çalışmada ancak globüler safhaya ulaşmış embriyolardan rejenerasyon elde edilebilmiştir.

Hassan vd. (1993), bazı *Rubus* genotiplerine *Agrobacterium* aracılığı ile gen

aktarımını araştırmışlardır. Çalışmada yaprak ve internodlardan alınmış eksplantların rejenerasyon yetenekleri üzerine çeşitli sitokinin, oksin ve antibiyotiklerin etkisi araştırılmıştır. Sitokininlerden TDZ (Thidiazuron) yüksek oranda sürgün verirken BA (benzyladenine) herhangi bir rejenerasyon vermemiştir. Oksinler ise rejenerasyonu artırmamıştır. Antibiyotiklerden kanamisin organogenezini önemli ölçüde azaltmış hatta yüksek oranda kanamisin içeren besin ortamlarında organogenez elde edilememiştir. Ardından, *NPT II/ GUS* ve *NPT II/ GAT* genlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* suşları kullanılarak transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Bachem vd. (1994), polifenol oksidaz geninin antisense inhibisyonu ile patates yumrularında enzimatik kahverengileşmenin engellendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, *in vitro*'da MS besin ortamlarında büyütülen patates bitkilerinden kesilen boğumarası eksplantları *Agrobacterium tumefaciens* suşu GV3101 ile transforme edilmiştir. Antisense polifenol oksidaz geni patates yumrularında özellikle melanin oluşumunu engellemiştir.

Barghchi vd. (1994), *Arabidopsis thaliana*'ın C24 ve Landsberg erecta ekotiplerine ait olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından yüksek oranda transformasyon elde etmişlerdir. Çalışmada en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.1 mg/l BA ve 0.1-0.4 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından kültürün ikinci haftasından sonra başarılmıştır. Araştırmacılar bu rejenerasyon sistemini *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon metodunu kullanarak, yüksek oranda transgenik bitki elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Courtney- Gutterson vd. (1994), *Agrobacterium* transformasyonu aracılığı ile *Chrysanthemum* bitkisinde çiçek rengini modifiye etmeye çalışmışlardır. Çalışmada, kimerik chalcone sentaz (CHS) geni, hem sense hem de antisense düzende pembe çiçekli bitkilere aktarılmıştır. Transgenik bu bitkiler arasında tamamen beyaz veya uçuk pembe renkte çiçekleri olan bitkiler tespit edilmiştir. Buna karşın kontrol bitkilerde beyaz çiçekli bitkilere rastlanılmamıştır. Araştırmacılar, çiçeklerdeki beyaz rengin tarla denemeleri sırasında nesiller arasında korunan bir özellik olduğunu bildirmişlerdir.

Kunik vd. (1994), virüslere karşı dirençli transgenik domates bitkileri elde etmişlerdir. Virüslere karşı direnç sağlayan TYLCV (domates sarı kıvrıcıklık virüsü) manto proteini geni *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile domates bitkilerine aktarılmıştır. Çalışmada ilgili geni taşıyan bütün transgenik domateslerin virüslere karşı dirençli oldukları bildirilmiştir.

Turgut vd. (1998), *Brassica napus* L. Topaz çeşidine ait kotiledon eksplantlarını kullanarak çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin in vitro sürgün oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada çeşitli sitokin ve oksinler ile iki tip kotiledon eksplantı kullanılmış olup, yüksek oranda adventif sürgün elde edilmiştir. 2/3 distal kotiledon eksplantları 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamında, kotiledon + petiol eksplantları ise 4 mg/l BAP ve 2 mg/l Kinetin ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında yüksek oranda (sırası ile %80 ve %90) adventif sürgün vermişlerdir. Çalışmada, ayrıca kotiledon eksplantlarının diğer türlerde de iyi rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir.

Hong ve Debergh (1995), *in vitro*'da *Allium porrum* fideleri sürgün ucu eksplantlarından somatik embriyo eldesini araştırmışlardır. Çalışmalarında çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren modifiye edilmiş B5 besin ortamları kullanılmıştır. Kültür sürgünlerin çoğaltılması, noduler kallus indüksiyonu ile somatik embriyoların üretilmesinden oluşmuştur. Çalışmada 2,4-D'in somatik embriyo eldesi için besin ortamında mutlaka bulunması gerektiği bildirilmiştir.

Martineau vd. (1995), domates ovaryumlarında sitokinlerin miktarını moleküler seviyede düzenleyerek meyveleri sert transgenik bitkiler üretmişlerdir. Çalışmada, domates bitkisine *Agrobacterium* aracılığı ile sitokin biyosentezinde anahtar bir enzim olan kimerik isopentil transferaz (*ipt*) geni aktarılmıştır. Domates ovaryumlarında yüksek oranda ifade olabilecek şekilde düzenlenen *ipt* geni transgenik domates ovaryumlarında sitokin seviyesini yükseltmiştir. Tarla koşullarında ard arda 3 sene boyunca yapılan testlerde transgenik bitkilerde sert meyve sayısının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Taylor vd. (1996), kasava (*Manihot esculenta*) bitkisinde kallus ve suspansiyon kültürleri geliştirmişlerdir. Çalışmada embriyogenik doku gelişimi kontrolünde oksin ve temel tuzların etkisi ortaya çıkarılmıştır. Kültürler Gresshoff ve Doy temel besin ortamlarında picloram varlığında yürütülmüş, yüksek oranlarda rejenerasyon elde edilmiştir. Araştırmacılar bu rejenerasyon sisteminin transgenik kasava elde etmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Luo ve Koop (1997), kültüre alınmış *Arabidopsis thaliana* olgunlaşmamış zigotik embriyo ve yaprak protoplastlarından somatik embriyo eldesini araştırmışlardır. Olgunlaşmamış zigotik embriyolar 6, yapraklar ise 5 farklı ekotipten alınmıştır. İki kültür sisteminde de deneysel şartlar somatik embriyo induksiyonu için kurulmuştur. Çalışmada her iki eksplant tipi için en uygun ekotip, gelişme dönemi ve bitki büyüme düzenleyicileri tespit edilmiştir.

Khalafalla ve Hattori (1999), *Vicia faba* kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonunu araştırmışlardır. Kotiledon eksplantları BAP ve TDZ içeren MS besin ortamlarında yüksek oranda adventif sürgün vermiştir. Çalışmada sürgünlerin 0.5 mg/l NAA içeren ½ kuvvet MS ortamında köklendirildiği bildirilmiştir.

Luo vd. (1999), *Astragalus adsurgens* kallus kültürlerinde somatik embriyo ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Embriyogenik kallus, hipokotil eksplantlarından 2 mg/l 2,4 D ve 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Somatik embriyolar ise 1-2 mg/l BA ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında üretilmiştir. Çalışmada embriyolar tam bitkiciklere hiç bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS besin ortamında dönüştürülmüştür.

Victor vd. (1999), yerfıstığı tohumlarından sürgün rejenerasyonuna TDZ ve BAP'in etkilerini araştırmışlardır. Yerfıstığı tohumları 2.2 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında somatik embriyo, 11.26 mg/l BAP içeren MS besin ortamında ise sürgün rejenerasyonu vermiştir.

Gaj (2001), *Arabidopsis thaliana*'ın in vitro'da olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kullanarak rejenerasyonunu araştırmışlardır. Farklı gelişme dönemlerindeki embriyolardan alınan eksplantlar 1.1 mg/l 2,4 D içeren B5 besin ortamlarında yüksek oranda somatik embriyo vermiştir. Çalışmada eksplantlardan alınan zigotik embriyo gelişim dönemlerinin rejenerasyon oranını etkilediği belirtilmiştir.

Hamama vd. (2001), jojoba yaprak dokularından somatik embriyo rejenerasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada öncelikle yaprak eksplantları değişik bitki büyüme düzenleyicileri içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Buradan elde edilen embriyogenik kalluslar somatik embriyo oluşturmak üzere değişik bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında alt kültüre alınmış ve yüksek oranda sürgün elde edilmiştir.

Polanco ve Ruiz (2001), mercimek bitkisine ait 4 çeşidin olgunlaşmamış tohumlarından bitki rejenerasyonuna etki eden faktörleri araştırmışlardır. Boyutları 1 ve 6 mm arasında değişen olgunlaşmamış tohumlar in vitro'da değişik miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren 10 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyonu kültürün 4. haftasından sonra BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Çalışmada, tohum boyutunun rejenerasyon oranına etkili olduğu bildirilmiştir.

Tawfik ve Noga (2001), *Cuminum cyminum* L. hipokotil ve gövde segmentlerine ait eksplantlardan sürgün rejenerasyonuna etki eden faktörleri araştırmışlardır. Çalışmada, yüksek oranda sürgün rejenerasyonu 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamlarında gövde boğum aralarından kesilmiş eksplantlardan elde edilmiştir. Sürgünler bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamında köklendirilirken, bitkilerin hayatta kalma oranları polietilen glikol kullanarak %73 oranda arttığı bildirilmiştir.

Tivarekar ve Eapen (2001), *Vigna radiata* olgunlaşmamış kotiledonlarından bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Hasat edilmeden bir hafta önce embriyolardan izole edilen olgunlaşmamış kotiledonlar BA, TDZ, Gibereellik asit ve IAA gibi bitki büyüme



düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu BAP ve IAA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Çalışmada aktif kömürün sürgün oluşumunu engellediği bildirilmiştir.

### 2.3. Embriyo Kesesi Gelişimi ile İlgili Kaynaklar

Böcher (1951), *Arabis holboellii*'nin farklı varyetelerinde polen ve embriyo kesesi gelişimlerini araştırmışlardır. Orijini Greenland olan, araştırmada kullanılan materyaller Kopenhak Botanik Bahçesinden elde edilmiştir. Tohumlar Nisan ayında ekilmiş ve bunu takip eden ilk mevsimde rozetler oluşmuştur. Buna karşın bitkiler ancak 1 yıl sonra çiçeklenmiştir. Çalışmada, diploid ve triploid materyallerde ovül temizleme tekniği ve sitolojik gözlemlerle embriyo kesesi ve polen gelişimi incelenmiştir. Buna göre, seksüel diploid materyallerde mayoz normal düzende ilerlerken, triploidlerde durum farklıdır. Triploidlerde embriyo kesesi ve polen mayoz bölünme geçirmeksizin, apomayoz ile meydana gelir. Apomayozde embriyo kesesi ana hücresi tam bir mayoz geçirmez ve seksüel süreçlerin tersine tetrad yerine dyad oluşturur. Ardından dyadlardan üstte bulunan hücre dejenere olurken geriye kalan hücre mitotik bölünmeler ile kromozom sayısı indirgenmemiş bir embriyo kesesi meydana getirir (*Taraxacum* tipi). Polen diploidlerde normal mayoz ile oluşurken triploidlerde hem mayotik hem de apomayotik süreçler gözlemlendiği bildirilmiştir. Triploidlerde mayoz sonucu, çoğunlukla kromozom sayısı birbirinden farklı polenler meydana gelmiştir. Mayoz geçirmemiş polen çimlenebilme yeteneğine sahiptir, ama emaskulasyon steriliteye neden olur. Embriyo kesesinde yumurta ve merkezi hücre nukleusları etrafında polen nukleusu gözlenmiş olmasına karşın, döllenme ile karşılaşmamıştır. Triploid materyallerde endosperm nukleusu hekzaploid iken, diploidlerde tetraploiddir. Embriyo merkezi hücrelerin endospermi oluşturmasından hemen sonra mikropilar uçta gelişmeye başlar.

Young vd. (1979), bazı buğdaygil türlerinin üreme sistemelerini belirlemek için temizlenmiş (cleared) pistil ve kalın kesit alma tekniklerini geliştirmişlerdir. Çalışmada, *Cenchrus ciliaris*'de seksüel ve aposporik embriyo kesesi gelişimi ortaya çıkarılmıştır. İlk teknikte *Cenchrus ciliaris* pistilleri formalin-asetik asit-alkol (FAA) içerisinde fikse

edilmiş ve metil salisilatta temizlenerek, interferans kontrast mikroskopunda incelenmiştir. İkinci teknikde ise, pistiller plastik içerisine gömülmüş, kesit alınmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Araştırmacılar her iki tekniğin de embriyo kesesi morfolojisi üzerinde aynı sonucu gösterdiğini, buna karşın temizlenmiş pistil tekniğinin diğerine göre daha basit ve hızlı olduğunu bildirmişlerdir.

Crane ve Carman (1987), Doğu Avustralya ve Yeni Zellenda kökenli *Elymus rectisetus*'da apomiksi mekanizmalarını araştırmışlardır. Çalışmada birbirinden farklı bölgelerden toplanmış heksaploid 23 *Elymus* ekotipinde, temizlenmiş ovül tekniği kullanılarak megasporogenez araştırılmıştır. Bu çeşitler arasında 17 tanesinin apomiksi ile ürediği bildirilmiştir. Seksüel çeşitlerde mayoz, Poliganum tiptedir. Apomiktik gelişim ise mayotik gelişmeye göre daha yavaş ilerlemiş ve dyad (2n), hemidyad veya direk binukleat embriyo kesesi oluşumu ile sonlanmıştır. Dyad oluştuğunda iki hücreden biri dejenere olurken kalazal kısımdaki genişleyip 8 hücreli embriyo kesesine dönüşmüştür. Buna karşın polen gelişiminin seksüel ve apomiktiklerde normal olduğu bildirilmiştir.

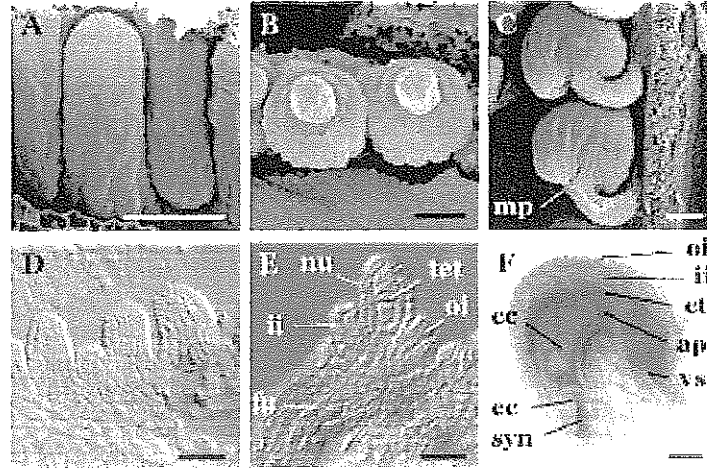
Carman vd. (1991), diplosporik *Elymus rectisetus* ve seksüel akrabası *Elymus scabrus*'da megasporogenez sırasında hücre duvarı yapılarını karşılaştırmışlardır. Hücre duvar yapıları morfolojisinde belirgin farklılıklar bildirilmiştir. Profaz ve metafaz I sırasında mayotik megaspor ana hücresi mikropilar duvarı, apomiktik olanlardan çok daha kalındır. Buna karşın, kalazal duvar kalınlığının erken safhada farklı olmadığı bildirilmiştir. Mayotik tetrad ve dyad'ların mikropilar, kalazal ve lateral hücreleri apomayotik megaspor ana hücresi dyad ve binukleat hücrelerinden daha kalındır. Çalışmada ayrıca, seksüel angiospermlerde megaspor ana hücre duvarları etrafında biriken kalloz araştırılmıştır. Sitolojik incelemeler kallozun *E. scabrus* megaspor ana hücre duvarları etrafında biriktiğini, ama apomiktik *E. rectisetus*'da birikmediğini ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, *E. rectisetus* megaspor ana hücrelerinin şekil ve duvar yapılarının seksüel akrabası *E. scabrus*'dan farklı olmasının nedeninin kalloz eksikliği olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, diğer diplosporik türlerde de kalloz birikiminde eksiklik olduğunu ve bu özelliğin diplosporik bitkiler için genel bir özellik olabileceğini belirtmişlerdir.

Leblanc vd. (1995), bazı *Tripsacum* türlerinde megasporogenez ve megagametogenezi araştırmalarıdır. Araştırmacılar, *Tripsacum*'un mısır ıslahı için apomiksi gibi önemli karakterler sağlayacağını bildirmişlerdir. Çalışmada, 10 farklı *Tripsacum* türünün üreme biyolojisi benzil benzoat-dibutil pitalat solusyonunda temizlenmiş ovüllerde interferans kontrast mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, anilin mavisi solusyonu ile megasporogenez esnasında kalloz birikimi araştırılmıştır. Diploid genotipdeki bitkilerin seksüel süreçlerle poliploid formları ise diplosporik apomiksi (*Antennaria* tip) ile üredikleri bildirilmiştir. Bununla beraber az sayıda *Taraxacum* tip diplospori de gözlenmiştir. Ayrıca, sitolojik incelemeler kalloz dokusunun sadece seksüel megasporofit duvarlarında biriktirdiğini ortaya çıkarmıştır.

Roy (1995), *Arabis* türlerindeki doğal üreme sistemlerini araştırmıştır. Çalışmada enzim elektroforezi, melezleme ve sitolojik yöntemler kullanılarak 6 farklı *Arabis* türünün üreme sistemi incelenmiştir. Buna göre, ploidi seviyeleri farklı (2n, 3n ve 4n) ve allozim varyasyonu nispeten yüksek *A. holboellii*'nin pseudogamik apomiksi ile ürediği bildirilmiştir. Melezleme çalışmaları *A. holboellii*'nin tohum bağlayabilmesi için polene ihtiyaç duyduğunu ortaya çıkarmıştır. *A. gunnisoniana* (3n) ve *A. lignifera* (2n) ise pseudogamik apomiksi ile üremesine rağmen populasyonlarda allozim varyasyonu gözlenmemiştir. Hem *A. lignifera* hem de *A. gunnisoniana* populasyonlarında izoenzim varyasyonu belirlenemediğinden pseugamiyi test etmek için *A. holboellii* polenleri kullanılmıştır. *A. lignifera* x *A. holboellii* melezleri başarısız olurken, *A. gunnisoniana* x *A. holboellii* melezleri tohum bağlamıştır. *A. drummondii* ve *A. crandallii*'nin seksüel yollarla ürediği bildirilmiştir. Buna karşın *A. hirsuta*'nın üreme sistemi anlaşılamamıştır.

Schneitz vd. (1995), *Arabidopsis thaliana*'da yabancı-tip ovül gelişimini araştırmışlardır. Çalışmada, ovül gelişiminin erken safhalarından 8 nükleuslu endosperm safhasına kadar olan bütün süreçler tanımlanmıştır. Sitolojik gözlemler boyanmış ve hemen ardından temizlenmiş ovüllerde ışık mikroskobu ile yapılmıştır. Bu sayede hem fazla sayıda ovül incelenmiş, hem de zaman alıcı diğer tekniklerden kaçınılmıştır. Araştırmacılar ovülün nispeten küçük bir organ olduğunu ve gelişimi

esnasında üç farklı elementden ibaret olduğunu belirtmişlerdir. Bunlar distal uçta megaspora köken veren hücreleri içeren nusellus, integumentlerle çevrili kalaza ve proksimal uçta vasküler dokuları içeren funikulusdur. Bu 3 element ovül gelişiminin çok erken safhalarında belirginleşir. Megaspor ana hücresi nusellusdan gelişir ve mayoz bölünme geçirerek tetradları meydana getirir. Ardından tetrad içerisinde fonksiyonel olmayan 3 nukleus dejenere olurken geriye kalan çekirdek ard arda mitoz bölünmeler geçirerek 8 nukleuslu embriyo kesesini oluşturur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Arabidopsis*'te yabancı-tip ovül gelişimi. (A-C) Elektron mikroskobu çekimleri. (D-F) Işık mikroskobu çekimleri. (A-D) Megaspor ana hücresi farklılaşması öncesinde ovül primordiyumu belirginleşir. (B, E) Nusellus içerisinde gelişmiş tetrad ile iç ve dış integümentleri belirginleşmeye başlamış ovül. (C, F) Döllenmeden hemen sonra olgun ovül. (C) Ovülün alt kısmında embriyo kesesi içine sperm hücrelerinin aktarıldığı mikropilde gelişmeye başlamış ve funikulusa yapışmış bir polen tüpü görülmektedir. (F) Döllenme yokluğunda embriyo kesesi içerisinde farklı hücre tipleri açıkça görülmektedir. Kısaltmalar; ap, antipodal hücreler; cc, merkezi hücreler; ch, kalaza; ec, yumurta hücresi; et, endotelyum; fu, funikulus; ii, iç integüment; mp, mikropil; nu, nusellus; oi, dış integüment; syn, sinerjid; tet, tetrad; vs, vasküler bağ

Peel vd. (1997b), buğday ve apomiktik *Elymus rectisetus*'un melezlenmesi ile elde edilmiş hibritlerde mayotik anomalileri araştırmışlardır. Çalışmada, buğday ( $2n=6x=42$ , AABBDD) ile diplosporik ve  $2n$  polen üreten *Elymus rectisetus* ( $2n=6x=42$ , StStYYWW) melezlenmiş ve elde edilen 4 hibritde ( $2n=9x=ABDStStYYWW$ ) apomayoz ve  $2n$  polen oluşumunu araştırmışlardır. Pistiller kaloz birikimi ve sitolojik gözlemler için temizlenmiştir. Çoğu megaspor ana hücresinde kaloz seksüel türlerdeki gibi birikirken pistillerin %4.7'sinde kaloz gözlenmemiştir. Bu özellik *E. rectisetus*'a ait megaspor ana hücrelerinde gözlenen apomayoz ile aynıdır. Hibritlerde  $2n$

kromozomlu polen oluşumu ile karşılaşılmasa bile çok sayıda mayoz anamolileri bildirilmiştir.

Barcaccia vd. (1997), *Poa pratensis* L. seksüel ve apomiktik genotipleri arasındaki melezleme ile elde edilen döllerde RAPD ve flow sitometri analizleri kullanarak parental genomun kalıtımını araştırmışlardır. *Poa pratensis* fakültatif aposporik olmasına karşın, obligat apomiksiden seksüel üremeye kadar çeşitli üreme şekillerine sahiptir. Ayrıca kendilenme de gözlenmektedir. Çalışmada, seksüel ve apomiktik genotiplerin melezlenmesi ile elde edilmiş 9 farklı döl analiz edilmiştir. Flow sitometri ve RAPD analizlerinin melezleme veya apomiktik süreçlerle oluşmuş döleri ayırt edebilmek için etkin teknikler olduğu bildirilmiştir.

Naumova (1997), tropikal yem bitkilerinde sitolojik ve fonksiyonel açıdan apomiksiyi araştırmıştır. Çalışmada, bu bitkilerde apomiksiyi sitolojik olarak belirlemek üzere kallos testi, temizleme metodları, embriyo kesesi analizleri, flow sitometri ve elektron mikroskobu gibi değişik teknikler karşılaştırılmıştır. Ayrıca, seksüel üreme, diplospori ve apospori tanımlanmıştır.

Peel vd. (1997a), diplosporik *Eragrostis curvula* ve *Tripsacum* türleri ile aposporik *Pennisetum ciliare*, *Pennisetum squamulatum* ve *Poa pratensis*'de megaspor ana hücresi etrafında kallos birikimini araştırmışlardır. Çalışmada, pistiller anilin mavisi içeren ortamlarda temizlenmiş ve UV mikroskobunda incelenmiştir. Araştırmada incelenen 376 pistil arasında sadece 1 tanesinde kallos birikimi gözlenmiştir. Bu pistilin *Eragrostis curvula*'dan alındığı ve muhtemelen fakültatif seksüel olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, megasporogenezde kallos eksikliğinin çoğu diplosporik tür için genel bir özellik olabileceğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, aposporik türlerde de megaspor ana hücresi etrafındaki kallos miktarının az olduğu bildirilmiştir.

Koltunow vd. (1998), *Hieracium*'da seksüel ve apomiktik gelişimleri araştırmışlardır. Çalışmada çoğu üyesi apomiktik olan *Hieracium* cinsine ait seksüel ve apomiktik türler üzerinde sitolojik araştırmalar yapılmış, apomiktik ve seksüel üreme karşılaştırılmıştır. Seksüel bir tür olan *H. pilosella* embriyo kesesinin *Poliganum* tipde

olduğu ve tohum bağlamak için döllenmeye ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir. Buna karşın, *H. aurantiacum* ve *H. piloselloides* otonom aposporik apomiktik olduğu ve bu türlerde hem embriyonun hem de endosperminin kendiliğinden döllenme olmaksızın meydana geldiği belirtilmiştir.

Naumova vd. (1999), *Brachiaria decumbens*'in diploid ve tetraploid genotiplerinde apomiksi ve seksüel üremeyi araştırmışlardır. Çalışmada, diploid ve tetraploid genotiplerde mayotik ve aposporik embriyo kesesi gelişimi ile endosperm gelişimi sitolojik açıdan incelenmiştir. Hem diploid hem de tetraploid genotiplerin fakültatif apomiktik olduğu bildirilmiştir. Obligat seksüel diploid bulunamamıştır. Di(ha)ploidlerde ise apomiksinin görünme oranı tetraploidlere göre daha düşük olmuştur. Bunlara göre araştırmacılar, *B. decumbens*'in üremesinde diploid-tetraploid-(di) haploid döngünün devam ettiğini ama triploidlerin oluşmadığını ileri sürmüşlerdir.

Matzk vd. (2000), bazı monokotil ve dikotil bitkilerin olgunlaşmış tohumlarını kullanarak üreme sistemlerini araştırmışlardır. Çalışmada, obligat ve fakültatif apomiktik veya seksüel 32 türe ait tohum örnekleri flow sitometri ile analiz edilmiştir. Sonuçta, dişi ve erkek gametlerin mayoz geçirip geçirmemelerine, embriyonun zigotik veya partenogenetik yolla oluşmasına ve endospermin otonom veya pseudogamik olmasına bağlı olarak 10 farklı üreme süreci tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu tarama sisteminin seksüel türlerde sporofitik veya gametofitik mutantların seçiminde, fakültatif apomiktik türlerden seksüel ve obligat apomiktik genotiplerin ayrılmasında ve özgün üreme süreçlerinin kalıtımını incelemeye çok yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Matzk vd. (2001), *Hypericum perforatum*'un üreme sistemini araştırmışlardır. Çalışmada, fakültatif apomiktik *H. perforatum*'a ait 113 genotipin üreme sistemleri olgunlaşmış tohumlar kullanılarak flow sitometri ile analiz edilmiştir. Bu analiz sistemi seksüel ve aseksüel üreme süreçlerini birbirinden ayırt eder. Araştırmacılar *H. perforatum*'da birbirinden farklı 11 üreme şekli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ilk kez, bazı genotiplerde endospermin kendiliğinden, döllenme olmaksızın oluştuğu ama embriyonun seksüel süreçlerle meydana geldiği bildirilmiştir. Buna ek olarak, henüz tam olarak açıklanamamış bir mekanizma ile oluşmuş diploid bitkiler keşfedilmiştir.

Çoğu bitkinin tetraploid, fakültatif seksüel veya apomiktik olmasına karşın, diploid obligat seksüel ve tetraploid obligat apomiktik bitkiler de bildirilmiştir. Yine çok sayıda mayoz geçirmiş olmasına rağmen partenogenetik olarak gelişmiş veya mayoz geçirmemiş ama döllenmiş yumurta hücrelerinden oluşmuş embriyolarla karşılaşmıştır. Endosperm ise çoğunlukla aposporik embriyo kesesinde merkezi hücrelerin döllenmesi sonucu pseudogami ile gelişmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Genel Doku Kültürü Koşulları

Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yürütülmüş olup, diseksiyonda kullanılan aletler (pens, bisturi vd.) %99'luk etil alkole batırıldıktan sonra alevden geçirilmiştir. Eksplantlar, 9 cm'lik cam petri kablarında kültüre alınmıştır. Petri kablarının etrafını sarmak için strech film kullanılmıştır. Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı (Çizelge 3.1) bütün çalışmalarda temel ortam olarak kullanılmıştır. Kültürler, sıcaklığı 25 °C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık 4000 lüks ışık şiddeti olan kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır. Çalışmada kullanılan petri kapları ve diğer cam malzemeler ya Pasteur fırınında 180 °C'de 2 saat boyunca kuru, ya da otoklavda 120 °C'de 20 dakika sürede yüksek sıcaklık ve basınç ile steril edilmiştir.

#### 3.2. Steril Koşullarda Fidelerin Büyütülmesi

*Arabis* türlerine ait tohumların yüzey sterilizasyonu %10'luk ticari sodyum hipokloritde 10 dakika süre ile yapılmıştır. Daha sonra, üç defa steril sudan geçirilen tohumlar çimlendirme için agar ile katılaştırılmış Murashige ve Skoog (MS) besin ortamına alınmıştır. Tohumlar sıcaklığı 25 °C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan kültür odalarında çimlendirilmiştir.

#### 3.3. Doku Kültürü ve Bakteri Kültürü Ortamları

Doku kültürü çalışmalarında temel olarak hazır MS besin ortamı (Sigma M-5519) kullanılmıştır. Hazır MS ortamına %3 oranında sükröz ve %0.8 oranında agar ilave edilmiştir. Katılaştırmadan önce 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılarak pH= 5.7'ye ayarlanmıştır. Ortamlara büyüme düzenleyicileri üretici firma tarafından önerilen kullanım talimatlarına göre eklenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak, oksin ve sitokininler kullanılmıştır. Naftalenasetik asit (NAA) ve 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) %70'lik etanolde, 6-benzilaminopurin (BAP) 1 N HCl'de, thidiazuron (TDZ) ise DMSO içerisinde çözülmüştür.



Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

MADDELER	(mg/l)
<b>I) Makro Elementler</b>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.000
$\text{KNO}_3$	1900.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.000
<b>II) Mikro Elementler</b>	
KI	0.830
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.200
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.780
Titriplex III	37.300
<b>III) Vitaminler</b>	
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0.500
Pyrodoxine-HCl	0.500
Thiamine-HCl	0.100
Glycine	2

Bakteri kültürlerinin üretilmesinde Luria Broth (LB) besin ortamı kullanılmıştır. LB besin ortamı 1 litre'de 10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extract ve 5 g NaCl içerir. LB ortamı 1 N NaOH ile pH= 7.4 ayarlanmıştır. Sıvı bakteri kültürleri uygun antibiyotikleri içeren LB besin ortamında -80 °C'de saklanmış gliserol stoklardan büyütülmüştür. Ardından bir öze yardımı ile agarlı besi ortamında tek koloniler elde edilmiştir. Transformasyonda kullanılan bakteriler bu tek kolonilerden sıvı LB besin ortamlarında bir gece süreyle 28 °C'de orbital bir çalkalayıcıda üretilmiştir. Seleksiyonda kullanılan antibiyotikler, otoklav sonrası ortamlar yaklaşık 40 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, filtre sterilizasyonu ile ilave edilmiştir. Gliserol stoklar ise 2 ml'lik tüpler içerisinde %60 gliserol ve %40 LB içeren solusyonların tek koloniden üretilmiş bakteri kültürleri ile bire bir oranda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Bu stoklar -80 °C'de saklanmıştır. Tüm besin ortamları 121 °C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edilmiştir.

### 3.4. *In Vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

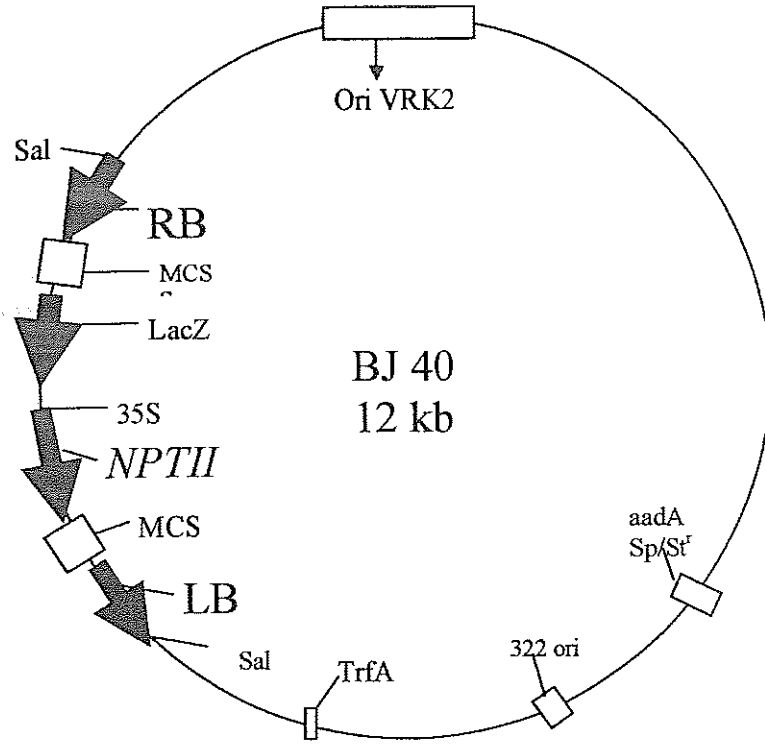
*In vitro* rejenerasyon çalışmalarında aseptik şartlar altında çimlendirilmiş 7 günlük veya 4 haftalık fidelerden alınan çeşitli eksplantlarla (hipokotil, kotiledon, yaprak ve kök), bu bitkilere ait çiçeklerden gelişmiş baklalardan steril şartlar altında çıkarılan olgunlaşmamış embriyolar kullanılmıştır. Eksplantlar, içerisinde 30 ml MS besin ortamı ile %3 oranında sükröz, %0.8 oranında agar ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ, NAA ve 2,4-D) içeren 9 cm'lik petri kablarında kültüre alınmıştır. Her bir petri kabına 10 eksplant yerleştirilmiş, bütün kültürler 25 °C'de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır. Deneme başına 100 eksplant kullanılmış, her deneme en az 3 kez tekrarlanmıştır. Eksplantlar her 15 günde bir alt kültüre alınmıştır. Rejenerasyon çalışmalarından elde edilen adventif sürgünler içerisinde torf ve kum karışımı (1:3) olan viyollere aktarılmıştır. Nem kaybını önlemek amacıyla viyoller 2 hafta süreyle üzerinde küçük delikler açılmış şeffaf plastik torbalar ile kaplanmıştır. Bu aşamadan sonra bitkiler normal gelişimlerini tamamlamak üzere saksılarda seralara yerleştirilmiştir.

### 3.5. Transformasyon Çalışmaları

*A. gunnisoniana* hipokotil eksplantları *Agrobacterium tumefaciens* suşu GV3101 pBJ40 ile transforme edilmiştir. Bir binary vektör olan BJ40 (13 kb) T-DNA sınırları içerisinde 35S promotörü kontrolünde Kanamisin'e karşı direnç sağlayan *NPTII* geni (Bevan vd 1983) taşımaktadır (Şekil 3.1). Eksplantlar steril koşullarda çimlendirilmiş 7 günlük fidelerden alınmıştır. Yaklaşık 100 hipokotil eksplant MS besin ortamı içeren 9 cm petri kaplarında biriktirilmiş ve *Agrobacterium* ile inoküle edilmiştir. *Agrobacterium* kültürü 100 mg/l spektinomisin dihidroklorid, rifampisin, karbenasilin ve 25 mg/l gentamisin içeren 100 ml LB besin ortamında, 28 °C'de 200 rpm hızındaki bir çalkalayıcıda yapılmıştır. Bir gecelik *Agrobacterium* kültürleri 13.000 rpm'de santrifüj ile çöktürülmüş, ardından 10 ml sıvı MS ile süspansiyon edilmiştir. Hipokotil eksplantlar tek tek ya doğrudan bakteri solüsyonuna alınarak 3-5 saniye süre ile ya da 1/10 ve 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri solüsyonlarında 3 ve 15 dakika süreler ile enfekte edilmiştir. Enfekte edilen eksplantlar bitki büyüme düzenleyicilerin ilave edildiği MS besin ortamlarında ko-kültivasyona alınmıştır. Bundan 24 ya da 48 saat sonra hipokotil eksplantları, içerisinde 400 mg/l Augmentin ve 50 mg/l Kanamisin içeren rejenerasyon ortamlarına (0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP içeren MS) alınmıştır. Augmentin, ko-kültivasyonunu takiben ortamda bulunan bakterilerin gelişimini engellemek, Kanamisin ise transgenik bitkilerin seçimi için ortamlara ilave edilmiştir. Eksplantlar her 15 günde bir alt kültüre alınmıştır. Kanamisinli besin ortamlarından elde edilen sürgünler %1 sukroz, 0.1 mg/l NAA ve 50 mg/l kanamisin içeren ½ MS besin ortamlarında köklendirilmiştir. Ardından torf ve kum karışımı (1:3) içeren viyollerde büyümeye bırakılmıştır. Kontrol eksplantları bakteri içermeyen sıvı MS içerisine daldırılmış, ardından kanamisin içeren veya içermeyen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Transformasyonda kullanılan antibiyotikler antibiyotik direnç genlerini taşıyan bitki ve bakteri hücrelerinin seçiminde ve ko-kültivasyon sonrası *Agrobacterium*'un gelişiminin engellenmesinde kullanılmıştır. Rifampisin metanolde, kanamisin, augmentin, spektinomisin dihidroklorid, karbenasilin ve gentamisin ise destile suda çözülmüştür. Bütün antibiyotikler filtrasyonla (por çapı 0.22 µm) steril edilip, -20 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genomik DNA'lar transgenik bitki adayları yapraklarından Phytopure Plant DNA Extraction Kit (Nucleon, Biogenesis, Glasgow, UK) kullanılarak izole edilmiştir. PCR reaksiyonu 100 ng kalıp DNA, 10 µM dNTP, 10 µM primer ve 0.36 ünite Taq polimeraz (Bioline) karışımından meydana gelmiştir. Döngüler 94 °C'de 30 saniye, 58 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika toplam 35 döngü olacak şekilde programlanmıştır. *NPTII* genine özgün P2 (5' TTGTCAAGACCGACCTGTCC 3') ve KanIII (5' CGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGG 3') primerlerinden 550 bp'lik DNA bandı beklenmiştir. Bunun dışında, ayrıca *plazmit* üzerinde T-DNA sınırları içerisinde yer almayan bir bölgeye ait primerler kullanılmıştır. *Plazmit* üzerinde T-DNA sınırları içerisinde yer almayan Spektinomisin direnç genine ait aadAF (ATG AGG GAA GCG GTG ATC GCC GAA) ve aadAR (TTA TTT GCC GAC TAC CTT GGT GAT) primerleri transformasyonda *Agrobacterium* kontaminasyonu olmadığını göstermek için seçilmiştir. Bu primerlerden 790 bp'lik bir PCR ürünü beklenmiştir. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon olmadığını göstermek için transforme edilmemiş sürgünlerden izole edilen genomik DNA'lar kontrol olarak kullanılmıştır. PCR ürünleri agaroz gel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromide ile U.V. altında görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. pBJ40'nin genetik haritası

### 3.7. Sitolojik Araştırmalar

Çalışmada kullanılan *Arabis* türlerinin orijini Kuzey Amerika'dır. Bu bitkiler, içerisinde torf ve ince kum karışımı olan saksılarda tohumlardan geliştirilmiş, 20 °C'de uzun gün koşulları altında yetiştirilmiştir. Bitkiler bu şartlar altında ancak 4 ya da 6 ay gibi bir sürede çiçeklenmiştir. Çiçeklenme en az 3 ay boyunca devam etmiştir. Tohumlar baklalar olgunlaştıkları zaman elle toplanmıştır. Sitolojik araştırmalarda *Arabis* türlerine ek olarak bu cinsin yakın akrabası *Arabidopsis thaliana* da seksüel üreme için bazı denemelerde kontrol olarak kullanılmıştır. Embriyo kesesi gelişimini mikroskop altında incelemek için sera koşullarında yetiştirilmiş 4-5 aylık bitkilerden alınan çiçek tomurcukları FAA ( Formaldehit %40 : Etanol %70 : Asetik asit %98 ) içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta fikse edilmiş, ardından %70'lik Etanol içerisinde 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Fikse edilmiş çiçeklerden pistiller sterio mikroskop altında ince uçlu pens ve bistrü yardımıyla çıkarılmıştır. Ardından pistil dokuları artan konsantrasyonlarda Etanol serisi (%70, 80, 90 ve 100) ile 20'şer dakika boyunca dehidrate edilmiştir. Pistiller içerisinde, sırasıyla 1: 2, 1:1 ve 2:1 oranlarında metil

salisilat ve etanol olan karışımlarda, 1'er saat süre ve son olarak da saf metil salisilat içerisinde 12 saat boyunca temizlenmiş ve ovüller tek tek çıkarılarak embriyo kesesi gelişimi incelenmiştir (ovüle temizleme) (Naumova vd., 1999). Temizlenmiş ovüller Nomarsky optikleri kullanılarak incelenmiştir. Pistil boyu (ovaryumun dip kısmından stigmanın ucuna kadar) bir cetvel yardımı ile ölçülerek pistiller boyutlarına göre sınıflandırılmıştır. Aynı bitkiye ait farklı çiçeklerden alınan pistiller boylarına (0.5-1, 1-1.5, 1.5-2 ve 2-5 mm) göre tek tek incelenmiştir. Toplamda üç farklı bitkiden bitki başına en az 300 temizlenmiş ovül Nomarski optik kullanılarak incelenmiştir. Embriyo kesesi içeriği (embriyo kesesi içerisindeki nukleus sayısı, tetrad ya da dyadların veya endosperm ve embriyo keselerinin varlığı) kayıt edilmiştir.

Megaspor ana hücresi etrafında kallos dokusu birikimi ise aniline mavisi ile incelenmiştir. FAA içerisinde fikse edilmiş *A. gunnisoniana* ve *A. holboellii* çiçeklerden ovüller disekte edilmiş, ardından da anilin mavisi (50 mmol  $K_2HPO_4$  içerisinde 136  $\mu$ mol anilin mavisi, pH 9.5) içerisinde 15 dakika süre ile boyanmıştır (Carman vd 1991). Örnekler ultra viole (U.V.) mikroskobu altında, UG-1 exciter filtre, Y-455 dichroic ayna ve L-435 bariyer filtresi ile incelenmiştir. Bu çalışmada, seksüel üreyen *Arabidopsis thaliana* kontrol olarak kullanılmıştır. Ovüller rastgele çiçeklerden pistil boyu dikkate alınarak seçilmiş tür başına en az 10 pistil incelenmiştir.

*Arabis* türlerinde gözlenen üreme şekillerini ortaya çıkarmak için ayrıca bu türlere ait olgunlaşmış, kuru tohumlar flow sitometri ile analiz edilmiştir. Her türe ait 1-50 tane tohum örneği DNA boyayan bir boya olan DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ile hazırlanmış tampon içerisinde mekanik olarak parçalanmış, ardından da filtrelerden (30  $\mu$ m) geçirilip buz üzerinde depolanmıştır. Hücreler içerisindeki DNA miktarları (C değerleri) PLOIDY ANALYZER Partec ile analiz edilmiştir (Matzk vd 2000).

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Farklı *Arabis* Türlerinin *In vitro* Rejenerasyonu

Bu çalışmada 3 farklı *Arabis* türünün *in vitro* rejenerasyonu araştırılmıştır. Eksplant olarak steril şartlar altında yetiştirilmiş bitkiciklerden alınan yaprak, kotiledon, hipokotil ve kökler kullanılmıştır. Bu eksplantların *in vitro* rejenerasyon yetenekleri üzerine farklı konsantrasyonlarda oksin ve sitokinlerin etkisi araştırılmıştır. İlk çalışmalar yaprak ve kotiledonların organogenesis uyarmak için uygun olmadıklarını göstermiştir. En etkili adventif sürgün rejenerasyonu aseptik şartlar altında yetiştirilmiş 7 günlük fidelerden kesilmiş hipokotil ve 4 haftalık fidelerden kesilmiş kök eksplantlarının kullanımı ile başarılmıştır. Eksplantlarda kallus, sürgün ve kök indüksiyonu uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi ve konsantrasyonuna ve bitki türüne göre de değişmiştir. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2, iki aylık kültürlerden elde edilen sonuçları göstermektedir. Bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ ve NAA, 2,4-D) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış hipokotil eksplantları kültürün ilk 10 günü içerisinde %100 oranında kallus oluşturmuştur. Eksplantların kesim uçlarında kompakt ve koyu yeşil renkte gelişmeye başlayan kalluslardan 4 hafta sonunda çok sayıda adventif sürgün meydana gelmiştir. Kültürde, bunu takiben yüksek oranda adventif sürgün elde edilmiştir. Yüksek miktarlardaki bitki büyüme düzenleyicileri adventif sürgün oluşumunu baskılamıştır.

*A. gunnisoniana* ile yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında 2, 4 ve 8 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve NAA olmaksızın hazırlanan MS besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.1). Kültürün ilk haftasında hacimce genişleyen eksplantlarda, kallus oluşumu kültürün 10. gününden itibaren başlamıştır. Kültür ortamlarından 2, 4 ve 8 mg/l BAP içeren ortamlar ile 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP ve ayrıca 0.1 mg/l NAA + 8 mg/l BAP içeren ortamlardaki tüm eksplantlarda kallus oluşmuştur (Şekil 4.1). Bununla birlikte 0.1 mg/l NAA ve hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamı kallus oluşturmamıştır. Yüksek BAP konsantrasyonları içeren ortamlarda (4 ve 8 mg/l BAP) kallus miktarı azalmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının *Arabis gunnisoniana* hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Kallus <sup>1</sup> (%)	Sürgün <sup>1</sup> (%)	Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı <sup>2</sup>
0	0	20	1.6 ± 0.8
2 BAP	100	50	1.6 ± 0.7
4 BAP	100	50	1.3 ± 0.7
8 BAP	100	50	1.5 ± 1.07
0.1 NAA	0	0	0 ± 0
0.1 NAA + 2 BAP	100	100	8.75 ± 0.3
0.1 NAA + 4 BAP	100	100	4.8 ± 1.5
0.1 NAA + 8 BAP	100	10	0.5 ± 0.1

<sup>1</sup> Kallus ya da sürgün oluşturmuş eksplantların yüzdesi. <sup>2</sup> ± Standart hata  
Gözlemler kültürün 6-8. haftasında yapılmıştır. Her uygulama başına 100 eksplant kullanılmış ve her deneme 3 kez tekrarlanmıştır.

**Çizelge 4.2.** Değişik TDZ, NAA ve 2,4-D konsantrasyonlarının *Arabis gunnisoniana* hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Kallus <sup>1</sup> (%)	Sürgün <sup>1</sup> (%)	Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı <sup>2</sup>
0	0	20	1 ± 0.2
0.5 TDZ	0	0	0 ± 0
1 TDZ	0	0	0 ± 0
2 TDZ	0	0	0 ± 0
0.1 NAA	0	0	0 ± 0
0.1 NAA + 0.5 TDZ	100	100	7.8 ± 0.3
0.1 NAA + 1 TDZ	100	100	4.1 ± 0.1
0.1 NAA + 2 TDZ	100	100	4.4 ± 0.2
0.1 2,4-D	0	0	0 ± 0
0.1 2,4-D + 0.5 TDZ	10	0	0 ± 0
0.1 2,4-D + 1 TDZ	100	100	5 ± 0.4
0.1 2,4-D + 2 TDZ	100	100	2 ± 0.1

<sup>1</sup> Kallus ya da sürgün oluşturmuş eksplantların yüzdesi. <sup>2</sup> ± Standart hata  
Gözlemler kültürün 6-8. haftasında yapılmıştır. Her uygulama başına 100 eksplant kullanılmış ve her deneme 3 kez tekrarlanmıştır.



*A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarında organogenesis, eksplantların kesim yüzeylerinde meydana gelmiştir. Kültürün 4. haftasında 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren ortamlarda %100 oranında, yalnızca 2, 4 ve 8 mg/l BAP içeren ortamlarda ise %50 oranında adventif sürgün meydana gelmiştir (Şekil 4.2). Hiç bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında ve 0.1 mg/l NAA + 8 mg/l BAP içeren ortamlarda sırası ile %20 ve %10 oranında adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Yalnızca NAA içeren ortamlarda ise hiç bir gelişme olmamıştır (Çizelge 4.1).

Eksplant başına düşen sürgün sayısı ise kullanılan BAP konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmiştir. 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA + 8 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında sırasıyla eksplant başına 8.75, 4.8 ve 0.5 adet sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bununla birlikte 2 mg/l BAP içeren besin ortamlarında eksplant başına 1.6, 4 mg/l BAP içeren ortamda 1.3 ve 8 mg/l BAP içeren ortamda ise 1.5 adet sürgün rejenerasyonu oluşmuştur. Yalnızca NAA içeren ortamlarda ise hiç bir gelişme olmamıştır. Bununla birlikte hiç NAA içermeyen ortamlarda eksplant başına düşen sürgün miktarı azalmıştır. Eksplant başına en az sürgün rejenerasyonu 4 ve 8 mg/l BAP ve 0.1 mg/l + 8 mg/l BAP içeren ortamlarla hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında sırası ile 1.3, 1.5, 0.5 ve 1.6 olmuştur (Çizelge 4.1).

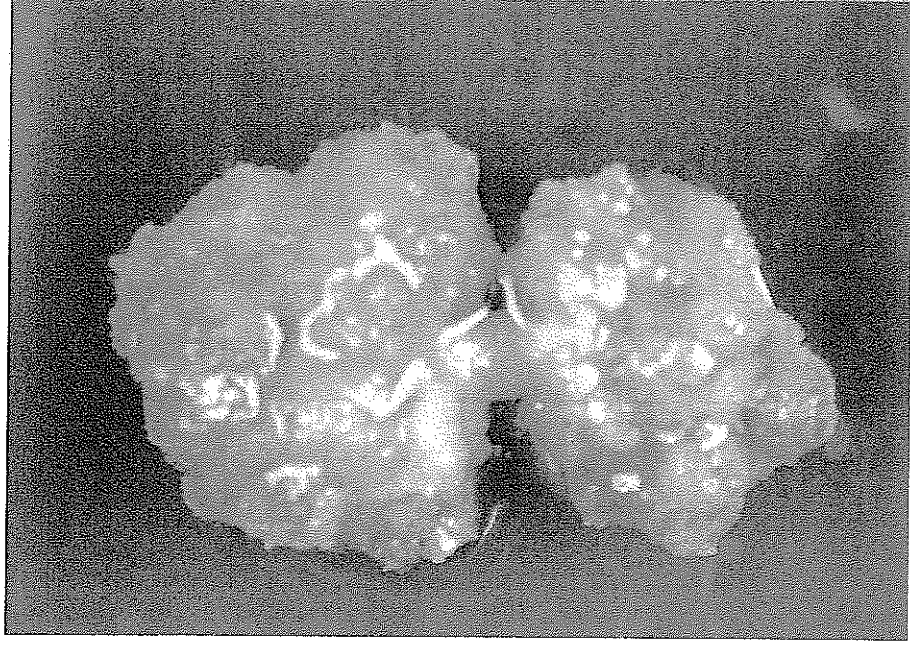
*A. gunnisoniana* ile yapılan bir başka *in vitro* rejenerasyon çalışmasında 0.5, 1 ve 2 mg/l TDZ ile 0.1 mg/l NAA ve NAA olmaksızın hazırlanan MS besin ortamları test edilmiştir (Çizelge 4.2). Eksplantlar kültürün ilk haftasında hacimce genişlemiş, kültürün 10. gününden itibaren yüksek oranda (%100) kallus oluşturmuştur. Bununla birlikte 0.1 mg/l NAA ve hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamı ve yalnızca 0.5, 1 ve 2 mg/l TDZ içeren besin ortamlarındaki eksplantlar kallus oluşturmamıştır (Çizelge 4.2). Yüksek oranda TDZ içeren besin ortamlarında eksplant başına düşen sürgün sayısı azalmıştır. Hipokotil eksplantlarında organogenesis, eksplantların kesim yüzeylerinde meydana gelmiştir. Kültürün 4. haftasında 0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA, 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA ve 2 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarındaki tüm eksplantlar adventif sürgün vermiştir (%100). Hiç

bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında ise %20 oranında adventif sürgün oluşumu gözlenirken, yalnızca TDZ içeren besin ortamlarında (0.5, 1 ve 2 mg/l) hiç bir gelişme olmamıştır (Çizelge 4.2).

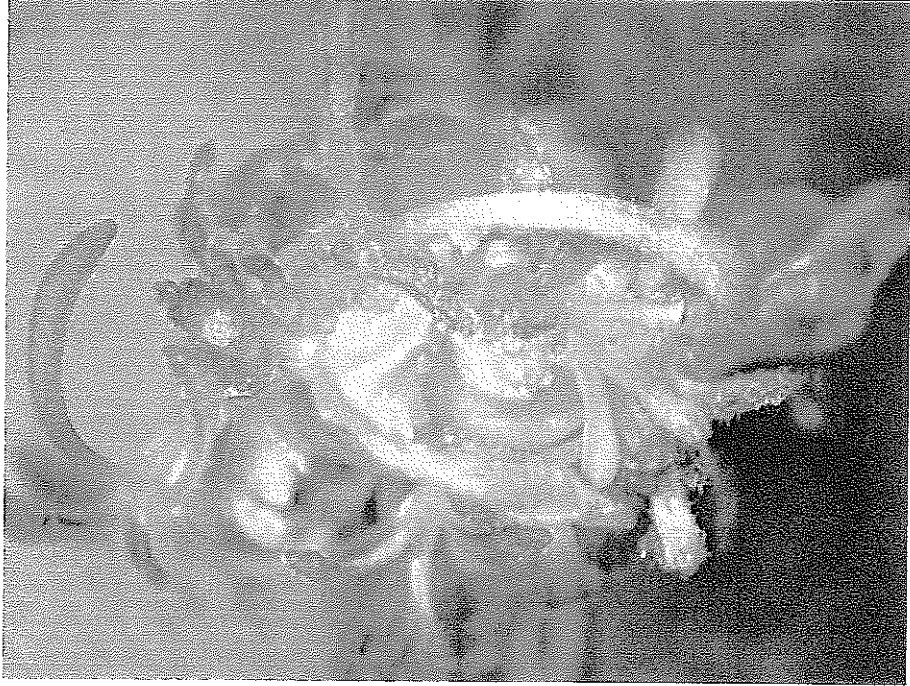
Eksplant başına düşen sürgün sayısı ise kullanılan TDZ konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmiştir. Kültürün 4. haftasından itibaren 0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA, 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA ve 2 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren ortamlarda sırasıyla eksplant başına 7.8, 4.1 ve 4.4 adet sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Bununla birlikte yalnızca TDZ veya NAA içeren MS besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu olmamıştır. Bu denemede NAA yerine bir başka oksin olan 2,4-D kullanıldığında hipokotil eksplantlarda yüksek oranlarda kallus elde edilmesine rağmen adventif sürgün rejenerasyonunda azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Kültürün 4. haftasından itibaren 0.1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l TDZ içeren ortamlarda ve 0.1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ içeren ortamlarda sırasıyla eksplant başına 5 ve 2 adet sürgün rejenerasyonu gözlenirken yalnızca 2,4-D ve 0.1 mg/l 2,4D + 0.5 mg/l TDZ içeren besin ortamları sürgün rejenerasyonunu indüklemek için yeterli olmamıştır (Çizelge 4.2).

Hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında kallus oluşumu gözlenmemesine rağmen *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarından %20, köklerden ise %100 oranında sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bununla birlikte eksplant başına düşen sürgün sayısı hipokotillerde ortalama 1, köklerde ise 10 olmuştur (Çizelge 4.1).

*A.gunnisoniana* kök eksplantları, aseptik şartlar altında yetiştirilmiş 4 haftalık fidelerden alınmıştır. Kök eksplantlarında organogenesis hiç bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamlarında meydana gelmiştir. Bu eksplantlarda kültürün 4. haftasından itibaren köklerin yüzeyinde koyu yeşil renkte nodüller yapılar gelişmiş, ardından bu yapılar adventif sürgünlere dönüşmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.1. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarından 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ortamındaki kallus rejenerasyonu (10 günlük)



Şekil 4.2. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarından 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ortamındaki adventif sürgün rejenerasyonu (30 günlük)



Şekil 4.3. *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantından sürgün rejenerasyonu (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında bir aylık kültür)



Şekil 4.4. *A. gunnisoniana* kök eksplantından sürgün rejenerasyonu (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında bir aylık kültür)

*A. drummondii* ile yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında yine 2, 4 ve 8 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve NAA olmaksızın hazırlanan MS besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.3). Eksplantlar kültürün 10. gününden itibaren yüksek oranda kallus oluşturmaya başlamıştır. Kültür ortamlarından 0.1 mg/l NAA içeren besin ortamı ile 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA + 8 mg/l BAP içeren ortamlardaki tüm eksplantlarda kallus oluşmuştur. Bununla birlikte 2, 4 ve 8 mg/l BAP ile hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamı kallus oluşturmamıştır. Kültürün 4. haftasından itibaren 0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren ortamlarda yüksek oranda (%100) adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Bununla birlikte 0.1 mg/l NAA içeren besin ortamlarında eksplant başına 2.5 adet, 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP, ve 0.1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren ortamlarında ise eksplant başına 1 tane sürgün rejenerasyonu olmuştur. Kültür ortamlarından 0.1 mg/l NAA + 8 mg/l BAP ile sadece 2, 4 ve 8 mg/l BAP içeren ortamlar ve hiçbir bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamlarında adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar jojoba, bakla, yerfıstığı, *Acacia magnum*, kimyon, bezelye ve *Brassica napus L.* gibi çeşitli bitkilerle yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında olduğu gibi *A. gunnisoniana* ve *A. drummondii* hipokotil eksplantlarının da sürgün teşviki için oksin ve sitokininlere ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (Ozcan vd. 1992; Turgut vd. 1998; Victor vd. 1999; Hamama vd. 2001; Tawfik ve Noga, 2001; Xie ve Hong, 2001).

**Çizelge 4.3.** Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının *A. drummondii* hipokotil eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri

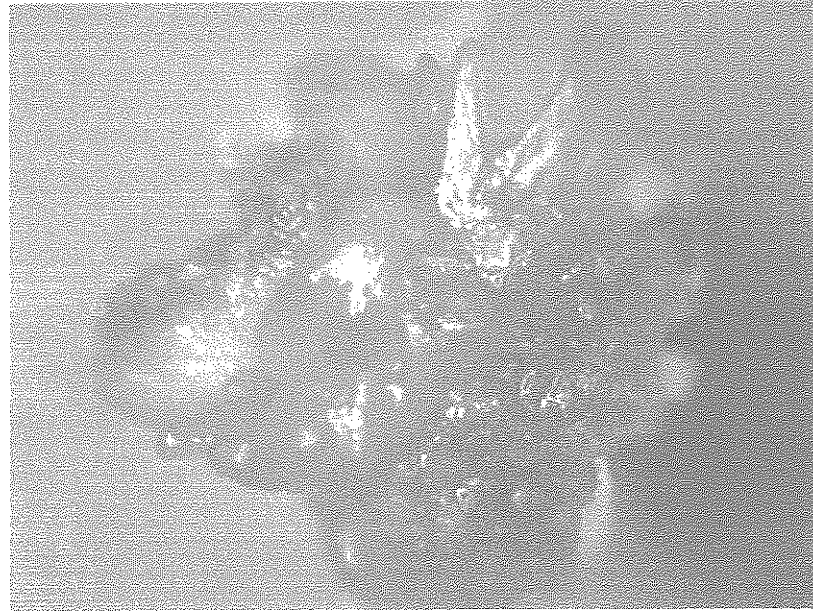
Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Kallus <sup>1</sup> (%)	Sürgün <sup>1</sup> (%)	Eksplant Düşen Sayısı <sup>2</sup>	Başına Sürgün
0	0	0	0 ± 0	
2 BAP	0	0	0 ± 0	
4 BAP	0	0	0 ± 0	
8 BAP	0	0	0 ± 0	
0.1 NAA	100	100	2.5 ± 0.4	
0.1 NAA + 2 BAP	100	100	1 ± 0.1	
0.1 NAA + 4 BAP	100	100	1 ± 0.2	
0.1 NAA + 8 BAP	100	0	0 ± 0	

<sup>1</sup> Kallus ya da sürgün oluşturmuş eksplantların yüzdesi. <sup>2</sup> ± Standart hata Gözlemler kültürün 6-8. haftasında yapılmıştır. Her uygulama başına 100 eksplant kullanılmış ve her deneme 3 kez tekrarlanmıştır.

*A. holboellii* ile yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında 2, 4 ve 8 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve NAA olmaksızın hazırlanan MS besin ortamları ve ayrıca 0.5, 1 ve 2 mg/l TDZ ile 0.1 mg/l NAA ve NAA olmaksızın hazırlanan besin ortamları test edilmiştir. İlk çalışmalar kotiledon, kök ve gerçek yaprakların organogenesis için uygun olmadıklarını göstermiştir. Hipokotil eksplantlar ise kültürün ilk günlerinde hacimce genişlemiş ve 10. gününden itibaren kallus oluşturmuştur. Hiçbir bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamı ve sadece TDZ içeren besin ortamları dışındaki tüm uygulamalarda %100 oranında kallus elde edilmiştir. Eksplantların kesim uçlarında gelişmeye başlayan koyu yeşil renkteki kompakt kallus zamanla tüm eksplantı kaplamıştır. Buna rağmen kültürlerde hiçbir zaman adventif sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Kallus, kültürün 2. ayından itibaren rengini ve kompakt yapısını kaybetmiştir. Köklerle yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında da benzer şekilde yüksek oranda kallus elde edilmiş olmasına rağmen sürgün gelişimi gözlenmemiştir. *A. holboellii* ile yapılan bir başka *in vitro* rejenerasyon çalışmasında ise olgunlaşmamış zigotik embriyolardan kesilen kotiledonlar kullanılmıştır. Olgunlaşmamış embriyoları içeren baklalar %10'luk sodyum hipoklorit içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve steril destile su ile 3 kere yıkanmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar stereo mikroskop altında baklalardan ayrılmış ve kotiledonlar kesilerek bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu çalışmada 5, 10 ve 20 mg/l NAA ile 0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren MS besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.4). Kültürün ilk haftasında hacimce genişleyen eksplantlarda, kallus oluşumu kültürün ancak 7. gününden itibaren başlamış ve kültürün 10. gününde yüksek orana ulaşmıştır. Kültür ortamlarından 0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren ortamlardaki tüm eksplantlar kallus oluşturmuştur (Şekil 4.5). Buna karşın 5, 10 ve 20 mg/l NAA içeren ortamlar ile bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlardaki eksplantlarda kallus gelişimi gözlenmemiştir. Kültürün 2. haftasından itibaren 0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA + 4 mg/l BAP içeren ortamlardaki eksplantlarda embriyogenik kallus gözlenmiştir (Şekil 4.6). Bu besin ortamlarındaki embriyogenik kalluslardan somatik embriyolar kültürün 3. haftasından itibaren sırasıyla



Şekil 4.5. *A. holboellii* olgunlaşmamış kotiledon eksplantından kallus oluşumu (0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ortamında 10 günlük kültür)



Şekil 4.6. *A. holboellii* olgunlaşmamış kotiledon eksplantından kültürün 2. haftasından sonra oluşmaya başlayan embriyogenik kallus

%38 ve %10 oranında ortaya çıkmıştır (Şekil 4.7). Eksplantlar üzerinde 3 ya da 5'li gruplar halinde, yeşil renkli somatik embriyoların farklı gelişme evrelerinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). Ardından embriyolar tek tek izole edilerek tam bitkicik elde etmek amacıyla bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamına aktarılmıştır. Embriyolar burada kök ve kotiledon vermiştir (Şekil 4.9).

Bu sonuçlar, hipokotil ve kök eksplantlarından rejenerasyon elde edilemeyen *A. holboellii*'de *Arabidopsis thaliana*, bezelye, mercimek ve maş fasulyesi gibi çeşitli bitkilerle yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında olduğu gibi olgunlaşmamış kotiledonlardan somatik embriyo elde edilebileceğini göstermiştir (Patton ve Meinke, 1988; Özcan vd 1992; Wu vd 1992; Barghchi vd 1994; Luo ve Koop 1997; Gaj 2001, Polanca ve Ruiz 2001, Tivarekar ve Eapen 2001).

Kültürün 4. haftasından sonra bütün adventif sürgünler köklendirme ortamına aktarılmıştır. Adventif sürgünlerde kök başlangıcı kültürün 2-4. haftasında %1 sükröz ile 0.1 mg/l NAA veya NAA olmaksızın hazırlanan ½ MS besin ortamlarında başarılmıştır (Şekil 4.10). Buna karşın normal MS besin ortamı ve çeşitli oksin grubu bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan besin ortamlarında adventif sürgünler kök geliştirmemiş ve bir süre sonra beyazlamıştır. Ayrıca benzer birçok çalışmada sürgünlerin köklendirilmesi için düşük konsantrasyonda MS kullanıldığı bildirilmiştir (Luo vd 1999, Özcan vd 1992, Tivarekar ve Eapen 2001, Xie ve Hong 2001).

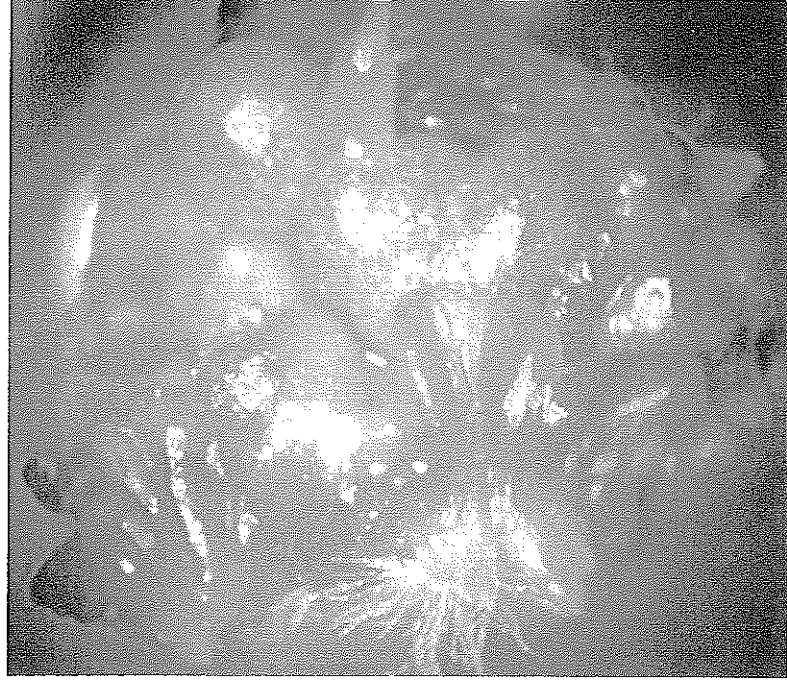
**Çizelge 4.4** Değişik BAP ve NAA konsantrasyonlarının *A. holboellii* olgunlaşmamış kotiledon eksplantları rejenerasyonu üzerine etkileri

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Kallus <sup>1</sup> (%)	Somatik Embriyo <sup>1</sup> (%)
0	0	0
5 BAP	0	0
10 BAP	0	0
20 BAP	0	0
0.25 NAA+1 BAP	100	38
0.25 NAA +2 BAP	100	10
0.5 NAA + 4 BAP	100	10

<sup>1</sup> Kallus ya da somatik embriyo oluşturmuş eksplantların yüzdesi.

Gözlemler kültürün 6-8. haftasında yapılmıştır. Her uygulama başına 100 eksplant kullanılmış ve her deneme 3 kez tekrarlanmıştır.





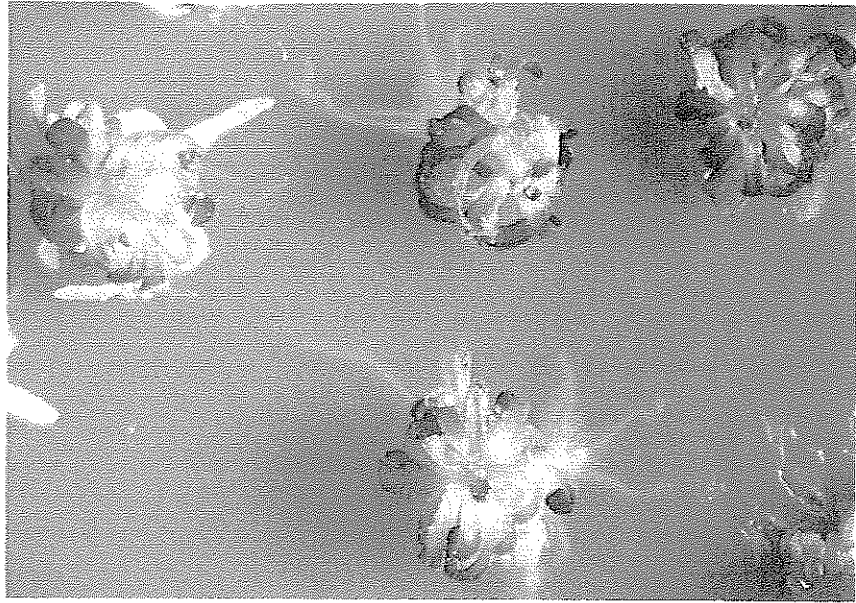
Şekil 4.7. *A. holboellii* ait olgunlaşmamış kotiledon eksplantından 3 haftalık kültürlerinden 0.25 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ortamındaki somatik embriyo rejenerasyonu



Şekil 4.8. *A. holboellii* olgunlaşmamış kotiledon eksplantından gelişen farklı büyüme evrelerindeki somatik embriyolar



Şekil 4.9. *A. holboellii* olgunlaşmamış kotiledon eksplantından rejenerasyon ve hiç bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında kök ve kotiledon oluşturmuş somatik embriyo



Şekil 4.10. *A. gunnisoniana* adventif sürgünlerinde kültürün 5-6. haftasından itibaren köklendirme ortamlarında oluşmaya başlayan kökler

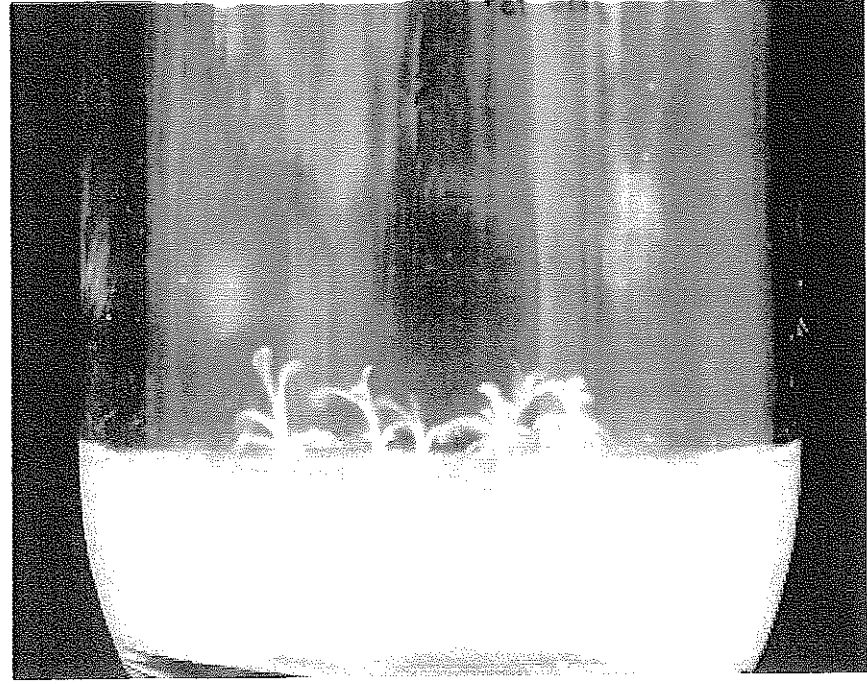
## 4.2. *Arabis gunnisoniana*'nın Genetik Transformasyonu

*Arabis* türlerinin kanamisine karşı duyarlılığını saptamak için *A. gunnisoniana* türüne ait tohum ve hipokotil eksplantlar kullanılmıştır. *A. gunnisoniana* tohumları %10'luk sodyum hipoklorit ile 10 dakika steril edildikten sonra, içerisinde 20, 40 ve 60 mg/l kanamisin olan ve kanamisin içermeyen MS ortamlarında çimlendirmeye alınmıştır. Tohumlar kanamisin içermeyen ortamlarda %100 oranında çimlenmiş ve gerçek yapraklar çıkartmıştır. Diğer ortamlarda ise çimlenme 20 mg/l kanamisinde %80, 40 mg/l ve 60 mg/l kanamisinde ise %100 oranında engellenmiştir. Kanamisin içeren bu ortamlarda çimlenme olsa bile gerçek yapraklar çıkmamış, albino bitkiler oluşmuş ve bu bitkilerin boyları ise uzamamıştır. Kültürün 2. haftasından itibaren ise tüm bitkiler ortamdaki kanamisin miktarına bağlı kalmaksızın ölmüştür. Diğer denemede ise aseptik şartlar altında yetiştirilmiş 7 günlük fidelerden kesilmiş hipokotil eksplantları, içerisinde 40 ve 60 mg/l kanamisin olan ve kanamisin içermeyen rejenerasyon ortamlarında (0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP) kültüre alınmıştır. Kültürün 4. haftasından itibaren kanamisin içermeyen kontrol ortamlarında hem kallus hem de adventif sürgün rejenerasyonu gözlenirken kanamisin içeren ortamlarda eksplantlar beyazlayarak ölmüştür. Böylelikle, 50 mg/l kanamisin miktarının transgenik bitkilerin seçiminde kullanılmasına karar verilmiştir. Buna ek olarak transformasyon çalışmalarında bakterilerin ortamdaki elimine edilmesi için 400 mg/l Augmentin kullanılmıştır. Augmentin antibiyotikliğinin eksplantların rejenerasyon kapasitesi üzerine olumsuz etkide bulunmadığı daha önce bildirilmiştir (Barghchi vd. 1994).

*A. gunnisoniana* hipokotil eksplantları *Agrobacterium tumefaciens* suşu GV3101 pBJ40 ile transforme edilmiştir. Denemede steril şartlarda çimlendirilmiş, 7 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlar kullanılmıştır. Ko-kültivasyondan 2-4 hafta sonra, 50 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamlarındaki hipokotil eksplantlarda kallus meydana gelmiştir. Sulandırılmamış bakteri kültürleri ile 3-5 saniye süre enfekte edilmiş eksplantların %62.5'i kallus oluşturmuştur. Bununla birlikte, 1/10 oranında sulandırılmış bakteri solüsyonu ile 10 ve 15 dakika sürelerle enfekte edilen eksplantların sırasıyla %50'si ve %56'sı, 1/50 oranında sulandırılmış bakteri solüsyonu ile 10 ve 15 dakika sürelerle enfekte edilen eksplantların ise sırasıyla %41 ve %57'si yeşil renkte

kallus vermiştir. Adventif sürgünler kültürün 6. haftasından sonra gelişmiştir. Bununla birlikte, bakteri solüsyonu ile enfekte edilmemiş kontrol ortamlarında eksplantlar beyazlayarak canlılıklarını yitirmişlerdir. Adventif sürgünler ardından, selektif antibiyotikler içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.11). Kök geliştiren sürgünler toprağa dikilmiş ve bitki büyüme odalarında yetiştirilmiştir (Şekil 4.12). Kanamisine karşı dirençli kalluslardan rejenere olan sürgünlerin %40'ının transgenik olduğu PCR ile onaylanmıştır. Buna karşın kanamisine karşı dirençli bitkilerden biri band oluşturmamıştır (Şekil 4.13, hat5). *NPTII* genine ait primerler kullanılarak yapılan PCR'da tüm sürgünlerin 550 bp'lik bandı taşıdıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Bununla birlikte *NPTII* primerlerinin *Agrobacterium* kontaminasyonundan bağımsız olarak ürün verdiğini ispatlamak için farklı bir PCR reaksiyonu yürütülmüştür. *aadA* primerleri ile yapılan PCR reaksiyonu sonucu transgenik bitkilerin hiçbirinde 790 bp'lik ürün ile karşılaşılması (Şekil 4.14). Spektinomycin direnç geni (*aadA*) T-DNA sınırları dışında yer alır ve bitkiye aktarılmaz. *aadA* geni primerleri PCR reaksiyonlarında *Agrobacterium* kontaminasyonu olup olmadığını göstermek için kontrol olarak kullanılmıştır. Bu sonuç, bize kanamisine dirençli transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonunun olmadığını göstermiştir.

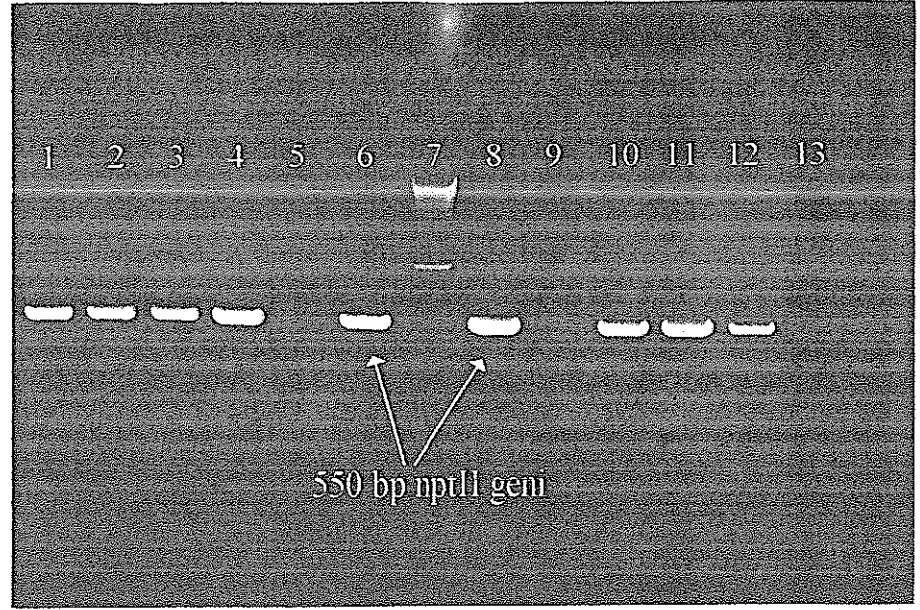
Elde edilen sonuçlar, karanfil, arpa, tütün, çeltik, *Rubus* türleri, patates ve bazı *Brassica* türleri gibi çeşitli bitkilerde yapılan transformasyon çalışmalarında olduğu gibi *A. gunnisoniana* hipokotil eksplantlarının *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir (De Block vd. 1984; Raineri vd. 1990; Hassan vd. 1993; Bachem vd. 1994; Turgut vd. 1998). Ayrıca, hipokotil eksplantlarından elde edilen kanamisine dirençli bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu olmadığı bulunmuştur (Estopa vd. 2001; Kuginuki ve Tzukaaki 2001; Mathews vd. 2001, Blake vd. 1991).



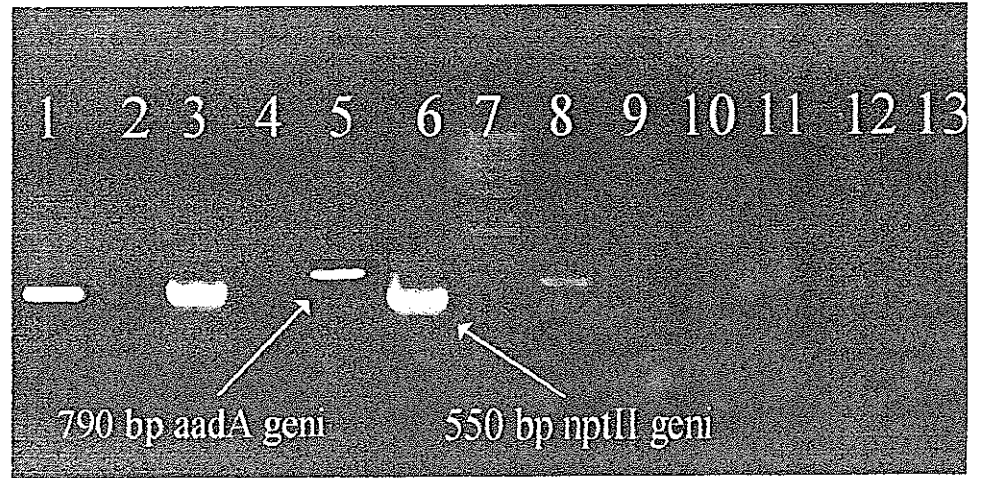
Şekil 4.11. *Agrobacterium tumefaciens* suşu GV 3101 BJ40 ile enfekte edilmiş hipokotil eksplantlarından elde edilmiş kanamisin dirençli sürgünler



Şekil 4.12. Kanamisin içeren seçici besin ortamlarında gelişen ve köklendikten sonra toprağa aktarılan transgenik sürgünler



Şekil 4.13. Transforme edilmiş *A. gunnisoniana* bitkilerinin *NPTII* geni primerleri ile PCR analizleri. Hat1-6 ve 10-12: Transgenik sürgünler, Hat7: Gibco 1 Kb marker, Hat8: *NPTII* genine ait 550 bp'lik fragmenti göstermek için (+) kontrol olarak plazmit DNA'sı, Hat9 transforme edilmemiş *A. gunnisoniana* DNA'sı, Hat13 su



Şekil 4.14. Transforme edilmiş *A. gunnisoniana* bitkilerinin spektinomisin direnç geni (*aadA*) primerleri ile PCR analizleri. Hat 1-3: npt II geni primerleri ile transgenik oldukları gösterilen sürgünler, Hat 2 ve 4 aynı transgenik sürgünlerde *aadA* primeleri ile yapılan PCR, Hat 5 plazmid DNA'sı ile kontamine edilmiş bitki DNA'sı, Hat 6: *NPT II* primerleri ve plazmit DNA'sı, Hat 7: Gibco 1 Kb marker, Hat 8: *aadA* geni primerleri ile plazmit DNA'sı, Hat 10: Transforme edilmemiş bitki DNA'sı ve *NPT II* geni primerleri, Hat 11: Transforme edilmemiş bitki DNA'sı ve *aadA* geni primerleri. Hat 9 and 12: Boş. Hat13: Su

### 4.3. *Arabis gunnisoniana*'da Embriyo Kesesi Gelişimi Üzerine Sitolojik Araştırmalar

*Arabis gunnisoniana*'da embriyo kesesi gelişimi sera koşullarında yetiştirilmiş 4-6 aylık bitkilerden alınan çiçek tomurcukları ile incelenmiştir (Şekil 4.15). Çalışmada kullanılan *Arabis* bitkileri, içerisinde torf ve ince kum karışımı olan saksılarda tohumlardan geliştirilmiştir. Bitkiler Kuzey Amerika orjinli olduklarından 20 °C'de serada yetiştirilmiştir. Ayrıca çiçeklenmeyi teşvik etmek için uzun gün koşulları altında bırakılmışlardır. Bu şartlar altında çiçeklenme ancak 4 ya da 6 ay gibi bir sürede başlayabilmiş ve en az 3 ay boyunca devam etmiştir.

FAA içerisinde fikse edilmiş tomurcuklardan çıkarılan pistiller öncelikle bir seri etanol ile dehidrate edilmiş, ardından metil salisilat ve etanol içeren çözeltilerde temizlenmiştir. Ovüller Nomarsky optik kullanılarak incelenmiştir.

*Arabis gunnisoniana* embriyo kesesi gelişimi değişik büyüme evrelerindeki pistillerde ovül-temizleme tekniği kullanılarak incelenmiştir (Young vd. 1979, Naumova vd. 1997). Farklı bitkilerden alınan uzunluğu 0.5-1 mm boyundaki pistillerde ovüllerin plasentadan henüz farklılaştığı ve megaspor ana hücresi, iç ve dış integümentler ve nusellusdan meydana geldiği gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu erken evrede dahi ovülün bir polaritesi vardır. Buna göre ovülün plasenta ile birleştiği yere kalazal (ya da proksimal) uç, diğer tarafta kalan kısmına ise mikropilar (ya da distal) uç denir. Nusellus bu tanımlamaya göre distal uçta yer alır ve megaspor ana hücresine köken olacak hücreleri içerir. Megaspor ana hücresi nusellusun epidermal tabakası altında bulunur ve diğer hücelere göre daha büyük bir nükleusa (2n) sahip, geniş bir hücre olması ile kolaylıkla ayırt edilebilir Diğer uçta yer alan kalaza ise henüz farklılaşmakta olan integümentlere ev sahipliği yapar. (Şekil 4.16). Ortalama uzunluğu 1.5 mm'ye ulaşan pistillerin 2. gelişme evresinde oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu evrede iç ve dış integümentler nusellusu tamamen sarmış, megaspor ana hücresi ise apomayotik bölünmeye uğramıştır. Megaspor ana hücresi apomayoz sonrası seksüel üreyen bitkilerin aksine tetrad (n) yerine diplosporik dyad (2n) oluşturmuştur (Şekil 4.17). Uzunluğu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde ise mikropilar uçta yer alan dyadın dejenere olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18). Kalazal uçta olanı ise hacimce genişleyip,

mitoz bölünmeler geçirerek, önce 2 (Şekil 4.19), 4 (Şekil 4.20) ve son olarak da 8 hücreli embriyo kesesi oluşturmuştur (Şekil 4.21). Embriyo kesesi gelişimi uzunluğu 5 mm'ye ulaşan pistillerde sonlanmıştır. Bu evrede embriyo ve endosperm belirginleşmiştir (Şekil 4.22).

*Arabis holboellii* ovüllerinde yapılan incelemeler sonucunda *Taraxacum* tipi diplospori gözlemlendiği bildirilmiştir (Böcher 1951, Naumova 2001). *Taraxacum* tipi diplosporide megaspor ana hücresi mayoz bölünmeye girer fakat, normalde oluşan kromozom eşleşmesi meydana gelmez. İlk bölünme tamamlandığında bir restitütasyon nukleusu oluşurken, ikinci bölünme normal bir şekilde ilerler. Dolayısıyla mayoz sonrası, kromozom sayısı indirgenmemiş iki tane hücre (dyad) meydana gelir. Bu hücrelerden biri dejenere olurken diğeri mitozla 8 nukleuslu embriyo kesesini meydana getirir. Buna karşılık seksüel üreyen bitkilerde ise mayoz 4 tane hücre (tetrad) ile sonlanır ve bu hücrelerden sadece biri embriyo kesesini geliştirir (Schneitz 1995). Bu nedenle seksüel ve apomiktik üreme arasındaki en büyük sitolojik fark tetradların yerine dyad'ın oluşmasıdır (Böcher 1951).

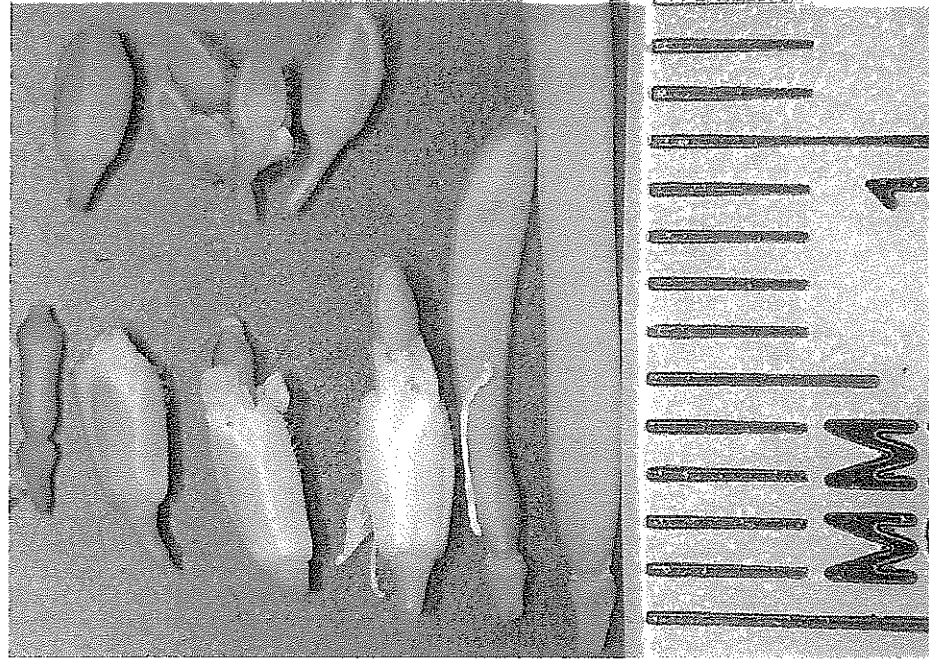
Sonuç olarak *Arabis gunnisoniana*'nın *Taraxacum* tipi diplosporik apomiksi ile ürediği anlaşılmıştır. Bu sonuçlar daha önce yayınlanan çalışmalar ile uyum içerisindedir (Böcher 1951, Naumova vd 2001). *Arabis gunnisoniana* ile yapılan araştırmalarda embriyo kesesi incelenmemesine rağmen, izoenzim analizleri ve melezlemeler apomiksinin varlığına işaret edilmiştir (Roy 1995). Bu çalışmada embriyo kesesi gelişim evreleri sitolojik olarak incelenmemiş olmasına rağmen, *Arabis gunnisoniana*'ın pseudogamik apomiktik bir tür olduğu belirtilmiştir. Pseudogami, endosperm gelişimi için polene ihtiyaç duyan apomiktik bitkiler için kullanılan bir terimdir. Buna karşılık, *Arabis holboellii* embriyo kesesi gelişimi oldukça detaylı bir şekilde incelenmiştir (Böcher 1951, Naumova vd 2001). Bu araştırmalara göre, *Arabis holboellii* ovüllerinde megaspor ana hücresi (2n) tek bir bölünme ile iki tane megaspor benzeri hücreden ibaret diplosporik bir dyad (2n) oluşturmuştur. Bu hücrelerden mikropil uçda olanı dejenere olurken, kalazal uçdaki genişleyip ard arda 3 mitoz geçirerek 8 nukleuslu *Taraxacum*-tipi embriyo kesesi oluşturmuştur (Naumova vd 2001).



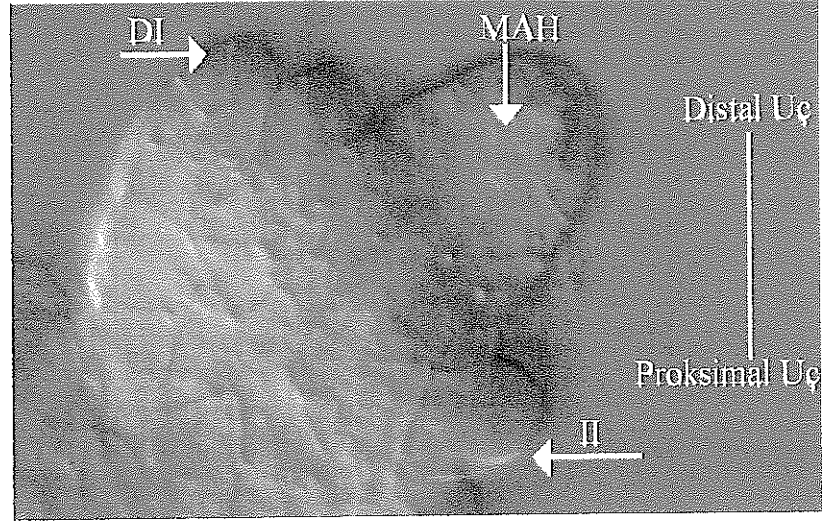
Çizelge 4.5: *A. gunnisoniana* ovüllerinde embriyo kesesi gelişimi

Pistil Uzunluğu (mm)	Ovül Gelişim Evresi (İncelenen Ovül Sayısı)
0.5-1	Megaspor Hücresi Farklılaşması (340)
1-1.5	Apomayoz (300)
1.5-2	Megasporlarından biri dejenere olan Dyad (600)

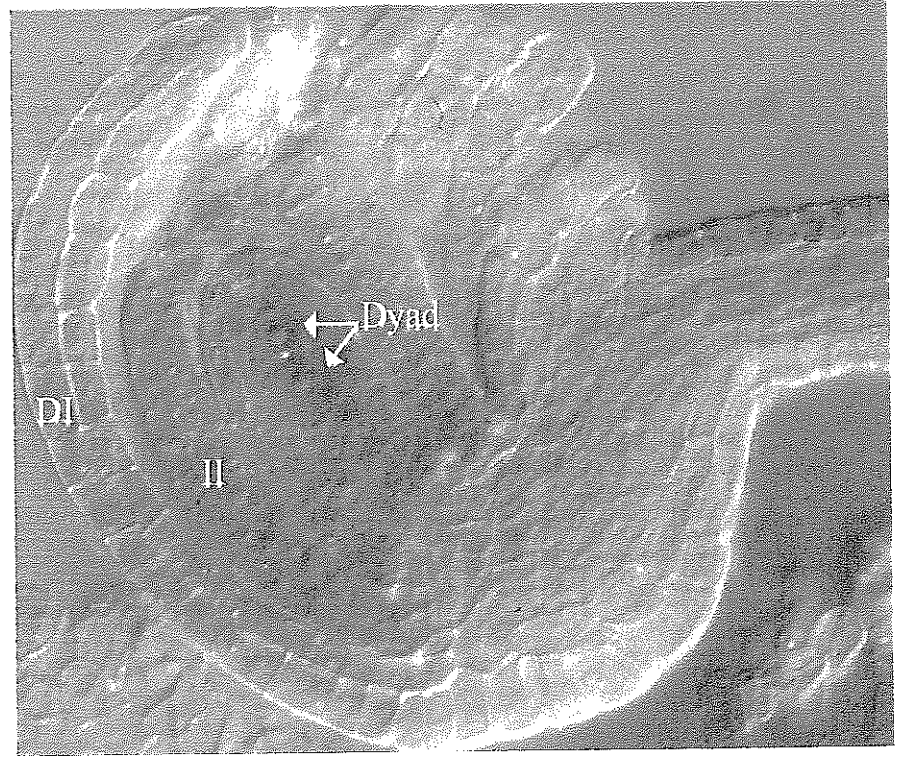
Denemede toplam 3 farklı bitkiden alınan ovüller analiz edilmiştir.



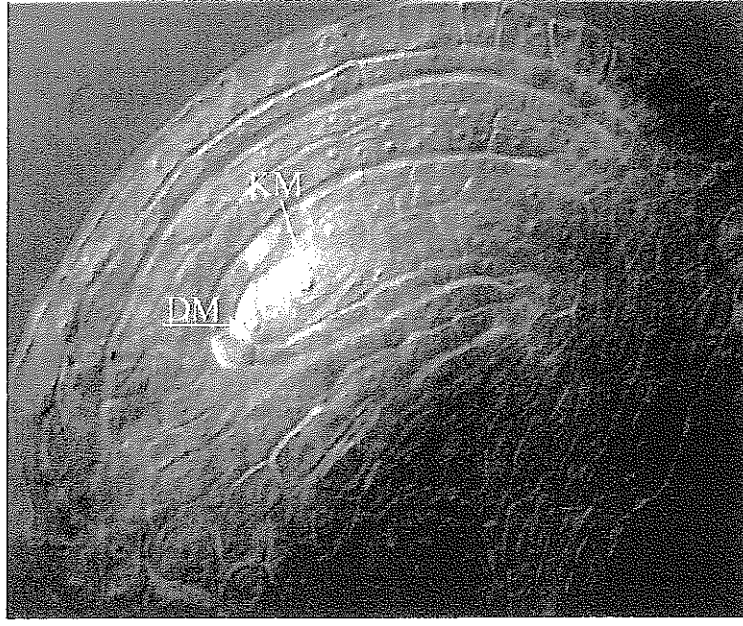
Şekil 4.15. Sera koşullarında yetiştirilmiş *Arabis gunnisoniana* bitkilerinden alınan çiçek tomurcukları



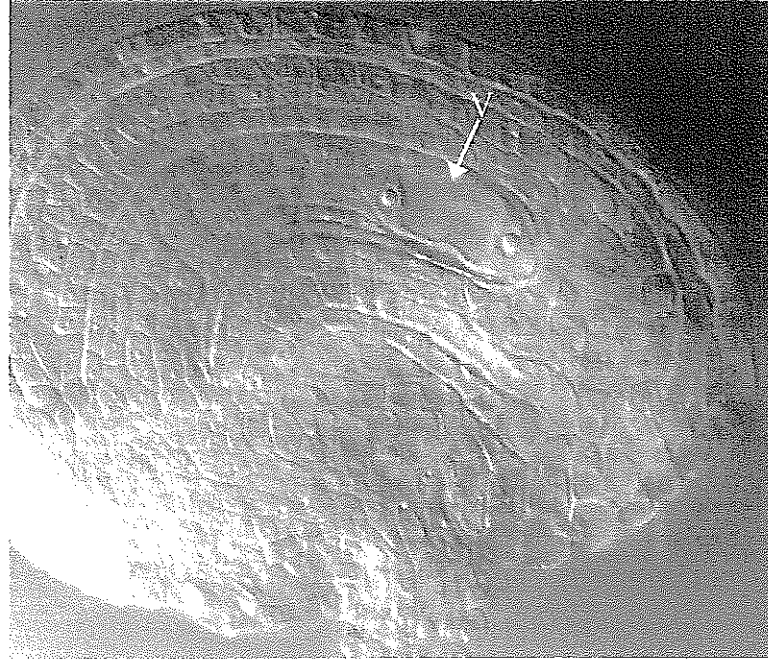
Şekil 4.16. *A. gunnisoniana*'da ortalama boyu 0.5-1 mm olan pistillerde erken ovül gelişimi. DI: Dış İntegument; II: İç İntegument; MAH: Megaspore Ana Hüresi



Şekil 4.17. *A. gunnisoniana*'da ortalama boyu 1.5 mm olan pistillerde mayoz bölünme sonrası dyad oluşumu. DI: Dış İntegument; II: İç İntegument



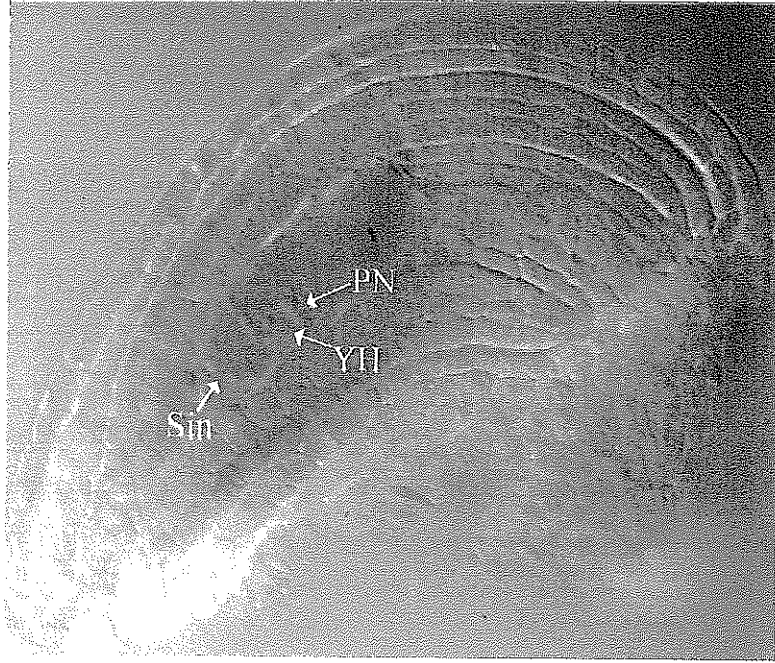
Şekil 4. 18. *A. gunnisoniana*'da ortalama boyu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde Dejenere olan Mikropilar Megaspor: DM ile genişleyen Kalazal Megaspor: KM.



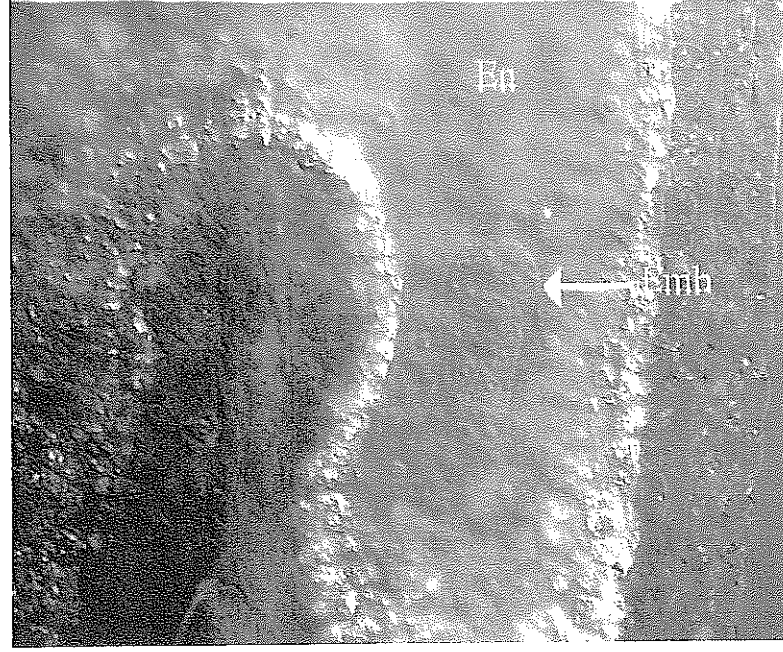
Şekil 4. 19. *A. gunnisoniana*'da kalazal megasporun mitoz bölünme geçirmesi ile meydana gelmiş, büyük bir vakoul (V) içeren iki nukleuslu embriyo kesesi



Şekil 4. 20. *A. gunnisoniana*'da dört nukleuslu embriyo kesesi



Şekil 4. 21. *A. gunnisoniana*'da sekiz nukleuslu tam olarak gelişmiş embriyo kesesi.  
PN: Polar nukleus, Sin: Sinerjitler; YH: Yumurta hücresi



Şekil 4. 22. *A. gunnisoniana*'da ortalama boyu 5 mm'ye ulaşan pistiller, Embriyo (Emb) ve Endosperm (En) gelişimi

#### 4.4. Megasporosit Hücre Duvarlarında Kalloz Birikimi

Kallos  $\beta$ -1, 3-glikozidik bağları ile birbirine eklenmiş glukoz moleküllerinden oluşan, suda çözünmez bir polisakarittir. Yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarlarında yer alır. Özellikle yaralanmış ya da bir patojen tarafından enfekte edilmiş hücrelerde, somatik embriyogenesis öncesi embriyogenik hücrelerde, polen tüpünde ve çoğu angiospermde erkek ve dişi meiosislerin hücre duvarında sentezlenir (Peel vd 1997a). Bununla birlikte, bazı apomiktik türlerde megaspor ana hücresi duvarında kallos birikimi olmadığı bildirilmiştir (Carman vd 1991, Leblanc vd 1995, Peel vd 1997a). Buna karşın, kallos birikimindeki eksikliğin apomiksi ile genetik düzeyde bir ilişkisi olup olmadığı kesin değildir (Tucker vd 2001).

*Arabis* türleri megaspor ana hücresi etrafında kallos dokusu birikimi anilin mavisi ile hazırlanan örneklerde incelenmiştir. Önceden FAA içerisinde fikse edilmiş pistillerden ovüller disekte edilmiş, ardından 15 dakika süre ile anilin mavisi içerisinde

boyanmıştır. Bu işlem yapılırken pistil boyu ve megaspor ana hücresi gelişimi arasındaki ilişkiye dikkat edilmiştir. Boyu 0.5 mm olan *Arabis gunnisoniana* pistillerinde ovül dokuları henüz farklılaşmaya başladığı için, megaspor ana hücresi etrafında ya hiç ya da çok az kalloz birikimi vardır (Şekil 4.23). Boyu 1 mm olan pistiller içerisindeki ovüllerin bazıları hiç kalloz biriktirmeyen bazıları anormal birikimler olmuştur. Normalde tüm hücreyi yoğun bir şekilde kaplaması gerekirken, kalloz bu ovüllerde daha çok mikropilar uca yakın megaspor etrafında veya dyad'larda ortada bir çizgi halinde birikmiştir (Şekil 4.24). Buna karşın seksüel üreyen bitkilerde olduğu gibi yoğun bir birikim ile karşılaşılmasıdır. Boyu 1.3 mm olan pistillerde ise kalloz birikimi ile nadiren karşılaşmıştır (Şekil 4.25). Buna karşın, bir ovülde tüm hücreyi kaplayan yoğun bir birikimi gözlenmiştir. Bu ovül seksüel olabileceği gibi diplosporik de olabilir. Boyu 1.8-2 mm olan pistillerde ise kalloz birikimi gözlenmemiştir.

*Arabis holboellii* pistillerine ait ovüllerde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Boyu 0.5-1 mm arasındaki pistillere ait bazı ovüllerde, megaspor ana hücreleri etrafında kalloz gözlenirken bazıları gözlenmemiştir (Şekil 4.26). Kalloz bu ovüllerde daha çok mikropilar uçta birikmiştir. Boyu 1-1.5 mm olan pistillerde ise kalloz yine ya hiç birikmemiş ya da mikropilar uçta gözlenmiştir. Buna karşın bazı ovüllerde yoğun bir birikim ile karşılaşılmasıdır (Şekil 4.27). Beklenildiği üzere seksüel *Arabidopsis thaliana*'ya ait ovaryumlarda kalloz birikimi tetradlar etrafında ve hatta daha ileriki aşamalarda dahi gözlenmiştir (Şekil 4.28). Kalloz seksüel üreyen bitkilerde ilk olarak mikropilar uca yakın megaspor etrafında birikmeye başlar ve bu birikim megasporogenesis boyunca devam eder. Buna karşın, megaspor seleksiyonu sonrası geriye kalan megasporun etrafında kalloz görülmez (Carman vd 1991). Diplosporik *Tripsacum* ve *Poa nemoralis* gibi diğer diplosporik türlerle yapılan araştırmalarda megaspor gelişimi esnasında kalloz birikimi ile karşılaşılmasıdır (Peel vd 1997a). Buna karşın, *Elymus rectisetus* ovüllerinde kallusun nadiren de olsa gözlendiği fakat bu birikimin yoğun olmadığı ve genelde mikropilar uca yakın mikrospor etrafında olduğu bildirilmiştir (Peel vd 1997b). Ayrıca, kallozun *Pennisetum ciliare* ve *Poa pratensis* L. gibi aposporik türlerde ya hiç gözlenmediği ya da mikropilar uçta, az yoğunlukta bulunduğu bildirilmiştir (Peel vd 1997a).



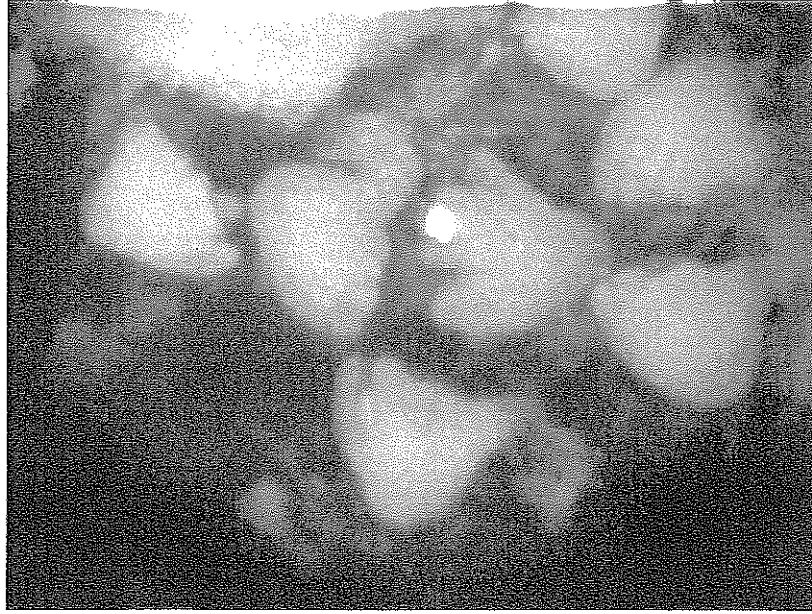
Şekil 4.23: Boyu 0.5 mm olan *Arabis gunnisoniana* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kallos birikimi



Şekil 4.24. Boyu 1 mm olan *Arabis gunnisoniana* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kallos birikimi



Şekil 4.25. Boyu 1.3 mm olan *Arabis gunnisoniana* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kalloz birikimi

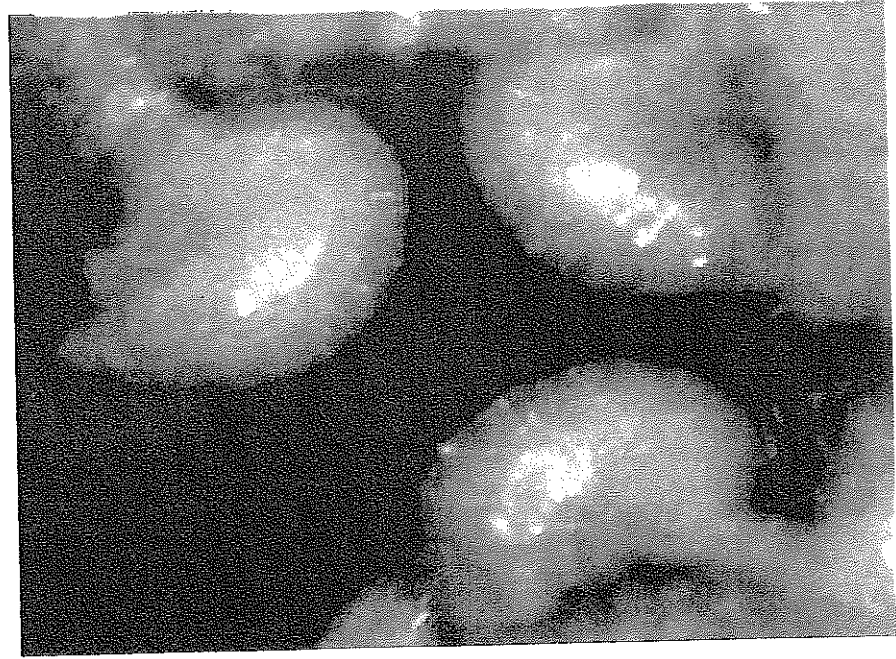


Şekil 4.26. Boyu 0.5-1 mm olan *Arabis holboellii* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kalloz birikimi





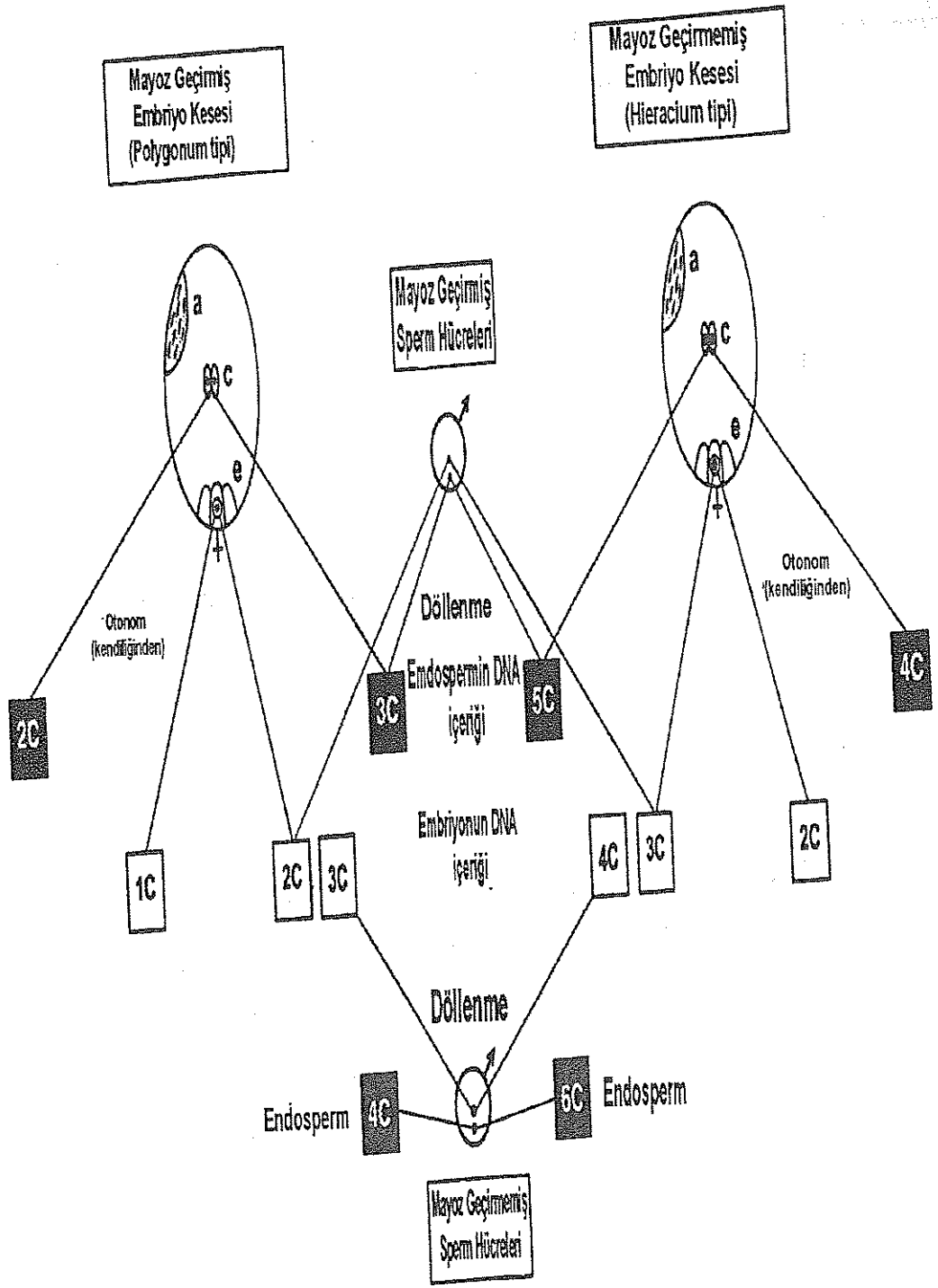
Şekil 4.27. Boyu 1-1.5 mm olan *Arabis holboellii* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kalloz birikimi



Şekil 4.28. Boyu 2 mm olan *Arabidopsis thaliana* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında kalloz birikimi

#### 4.5. Arabis Tohumlarının Flow Sitometri Analizi

Flow sitometri, hücre ve mikropartikülleri saymak ve ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Süspansiyon halindeki hücreler ince bir akım halinde bir kuvetten geçirilir. Bu esnada bir ışık (laser) kaynağı ya da elektriksel alan kullanılarak her partikül için bir sinyal tespit edilir. Flow sitometri son 15 yıl içerisinde bitki hücrelerinde nuklear DNA miktarını belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır. Nuklear DNA bitki hücrelerinden ya dokuların mekanik olarak parçalanması ya da protoplastların lizisi ile elde edilir. Bitki nuklear DNA'sı floresan boyalar (DAPI gibi) kullanılarak analiz edilmektedir. Flow sitometri, temel araştırmalardaki kullanımına ek olarak, günümüzde özellikle bitki ıslahında çeşitli alanlarda çok yararlı hale gelmiştir; Ploidi seviyesini belirlemede, aneuploid bitkilerin seçiminde ve anter, mikrospor veya ovaryum kültürlerinden elde edilen haploid ve dihaploid bitkilerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Pfosser vd 1995). Ayrıca, DNA miktarlarına göre türler arası hibritleri ve genom büyüklüğü belirlemede kullanılmaktadır. Buna ek olarak, apomiktik bitkilerin analiz edilmesinde oldukça faydalıdır. Olgunlaşmış kuru tohumlar kullanılarak endosperm ve embriyo dokularının ploidi seviyelerini belirlemek mümkündür. Bu sayede, incelenen tohumların üreme şekilleri anlaşılabilir (Matzk vd 2000). Embriyo ya da endospermin ploidi seviyesi embriyo kesesinin mayoz bölünme geçirip geçirmemesine bağlı olarak değişir. Diploid (2C) seksüel bir bitki diploid 2C (1 maternal:1paternal) embriyo ve triploid 3C (2m:1p) endosperm oluşturur. Triploid (3C) embriyolar kromozom sayısı indirgenmemiş erkek (2p) ya da dişi gametlerden (2m), tetraploid 4C (2m:2p) ya da pentaploid 5C (4m:1p) endospermle birlikte oluşur (Şekil 4.29). Bu nedenle, embriyo ve endosperm nukleus DNA miktarları arasındaki ilişki gözönüne alınarak üreme şekilleri belirlenebilir. Apomiktik bitkilerde mayoz bölünme tam olmadığı için embriyo kesesinde diploid (2C) yumurta ve tetraploid (4C) polar hücreler vardır. Embriyo ve endosperm gelişimi için döllenmeye ihtiyaç duymayan otonom apomiktlerde embriyo diploid 2C (2m:0p) endosperm ise tetraploid 4C (2m:2p) seviyededir. Endosperm oluşumu için döllenmeye ihtiyaç duyan pseudogamik apomiktlerde ise embriyo yine diploid 2C (2m:0p) iken endosperm sperm hücresinin mayoz geçirip geçirmemesine bağlı olarak pentaploid 5C (4m:1p, sperm hücresi mayoz geçirmiş) veya hexaploid (4m:2p, sperm hücresi mayoz geçirmemiş) seviyededir (Şekil 4.29).



Şekil. 4. 29. Seksüel veya Apomiktik üreyen bitkilerde erkek veya dişi gametlerin mayoz geçirmelerine bağlı olarak meydana gelen embriyo ve endosperm hücreleri nükleus içeriği (Matzk vd 2000)

*Arabis* türlerinde gözlenen üreme şekillerini ortaya çıkarmak için ayrıca bu türlere ait olgunlaşmış kuru tohumlar flow sitometri ile analiz edilmiştir. Her türe ait 1-50 tane tohum örneği DAPI (42,6-diamidino-2-phenylindole) ile hazırlanmış tampon içerisinde mekanik olarak parçalanmış, ardından da filtrelerden (30 µm) geçirilip buz üzerinde depolanmıştır. Hücreler içerisindeki DNA miktarları (C değerleri) PLOIDY ANALYZER Partec ile analiz edilmiştir (Matzk vd 2000).

*Arabis drummondii* ile yapılan analiz sonucunda bu türe ait embriyo keselerinin seksüel olarak oluştuğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Histogramlarda seksüel türlere özgü 2C (1m:1p) embriyo piki yanısıra 3C (2m:1p) endosperm piki gözlenmiştir (Şekil 4.30). Buna ek olarak, hem embriyo hem de endospermde endopoliploidizasyonla karşılaşmıştır (Çizelge 4.6).

*A. gunnisoniana* ve *A. holboellii* tohumları ise gerek embriyo ve endosperm içerdiği DNA miktarları açısından gerekse ploidi seviyeleri açısından 2 farklı histogram vermiştir (Şekil 4. 31-32). Buna karşın, embriyo kesesi hepsinde apomiktik olarak meydana gelmiştir. Embriyo partenokarpik, endosperm ise kendiliğinden veya mayoz geçirmiş veya geçirmemiş bir erkek gamet tarafından döllenerek oluşmuştur (Çizelge 4.6). Şekil 4.31'deki histogramda 2C (2m:0p) embriyo, 4C (4m:0p) ve 6C (4m:2p) endosperm pikleri tespit edilmiştir. Buna göre embriyo kesesi ve embriyo apomiktik olarak meydana gelmişken, endosperm ya kendiliğinden (4C; otonom) ya da merkezi hücrelerin mayoz geçirmemiş bir erkek gamet tarafından döllenmesi sonucu (6C; pseudogami) oluşmuştur (Çizelge 4.6). Şekil 4.32'deki histogramda ise 2C (2m:0p) embriyo ve 5C (4m:1p) endosperm pikleri tespit edilmiştir. Buna göre, embriyo kesesi ve embriyo yine apomiktik olarak meydana gelirken, endosperm merkezi hücrelerin (4m) mayoz geçirmiş bir erkek gamet (1p) tarafından döllenmesi sonucu oluşmuştur (Çizelge 4.6). Bu sonuçlara göre *A. gunnisoniana* ve *A. holboellii* hem pseudogamik hem de otonom apomiktirdir.

*Arabis* türlerinin üreme sistemleri daha önce birçok kez araştırılmış, özellikle *A. holboellii*'de *Taraxacum* tip diplospori ayrıntıları ile açıklanmıştır (Böcher 1951, Roy 1995, Naumova vd 2001). Ayrıca, *A. holboellii* tohumlarının flow sitometrik analizleri

bu türde hem pseudogamik hem de otonom apomiksi olduğunu göstermiştir (Matzk vd 2000). Buna karşın, *A. gunnisoniana* embriyo kesesi gelişimi ve tohumlarının flow sitometrik analizi bu güne kadar incelenmemiştir. Bu çalışmada, daha önceden Roy (1995) tarafından pseudogamik olduğu bildirilen *A. gunnisoniana*'da endospermin kendiliğinden de oluşabileceği bulunmuştur. Ayrıca *A. holboellii* için bildirilen mayotik embriyo kesesi ve diğer üreme şekilleri ile karşılaşılmamıştır (Naumova vd. 2001, Matzk vd 2001). Bunun nedeni çalışmada her türe ait sadece 1 populasyonun incelenmesi olabilir. Sonuç olarak *A. holboellii*'nin ve *A. gunnisoniana*'nın *Taraxacum*-tip diplospori ile hem pseudogamik hem de otonom, *A. drummondii*'nin ise seksüel süreçlerle ürediği ortaya çıkarılmıştır (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6** *Arabis* tohumlarının Flow sitometrik analizi

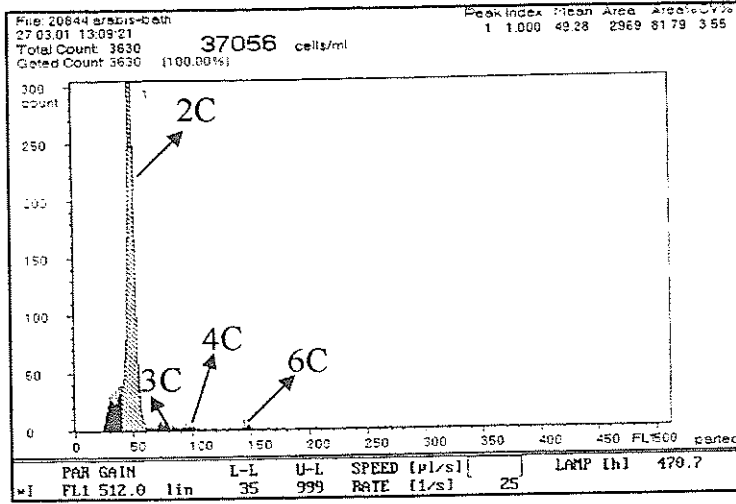
Histogram C Değeri Türler (Embriyo:Endosperm)	Gametler		Embriyo	Endosperm	Tohum Gelişimi
	Dişi	Erkek			
<i>A. drummondii</i> (2C:3C) <sup>a</sup>	Mayotik	Mayotik	Zigotik	Döllenmiş	Seksüel
<i>A. gunnisoniana</i> (2C:4C) <sup>d</sup> (2C:5C) <sup>c</sup> (2C:6C) <sup>b</sup>	Apomiktik Apomiktik Apomiktik	- Seksüel Apomiktik	Partenogenetik Partenogenetik Partenogenetik	Partenogenetik Döllenmiş Döllenmiş	Otonom Pseudogamik Pseudogamik
<i>A. holboellii</i> (2C:4C) <sup>d</sup> (2C:6C) <sup>b</sup>	Apomiktik Apomiktik	- Apomiktik	Partenogenetik Partenogenetik	Partenogenetik Döllenmiş	Otonom Pseudogamik

<sup>a</sup>Mayotik embriyo kesesi: Yumurta hücresi ve merkezi hücreler döllenerek sırası ile embriyo (1m:1p) ve endospermi (2m:1p) oluşturmuştur. Erkek gamet mayoz geçirmiş. Bitki seksüel.

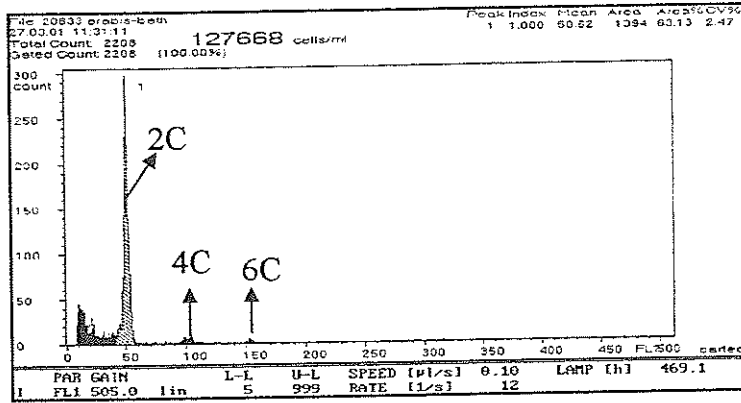
<sup>b</sup>Apomiktik embriyo kesesi: Yumurta hücresi döllenme olmaksızın partenogenez ile embriyo (2m:0p), merkezi hücreler ise döllenerek endosperm (4m:2p) oluşturmuştur. Erkek gamet mayoz geçirmemiş, apomiktik. Bitki pseudogamik apomiktik.

<sup>c</sup>Apomiktik embriyo kesesi: Yumurta hücresi döllenme olmaksızın embriyoyu (2m:0p), merkezi hücreler ise döllenerek endospermi (4m:1p) oluşturmuştur. Erkek gamet mayoz geçirmiş. Bitki pseudogamik apomiktik.

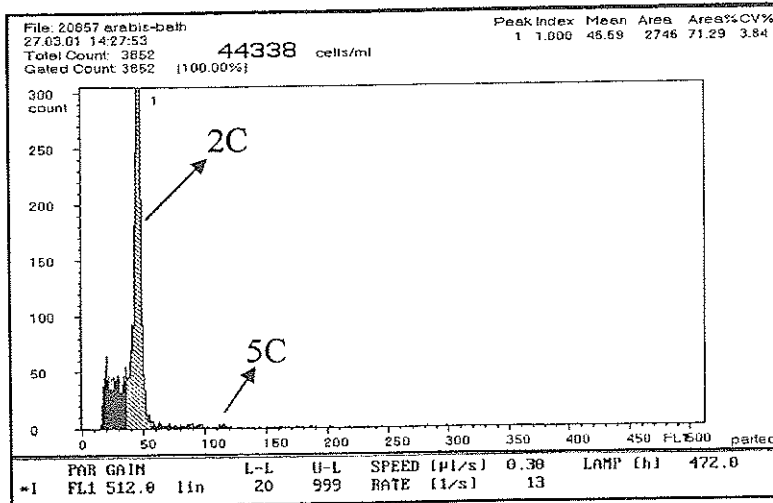
<sup>d</sup>Apomiktik embriyo kesesi: Yumurta hücresi ve merkezi hücreler döllenme olmaksızın kendiliğinden sırası ile embriyoyu (2m:0p) ve endospermi (4m:0p) oluşturmuştur. Erkek gamet katılımı olmamıştır. Bitki otonom apomiktik.



Şekil 4. 30. *Arabis drummondii* tohumlarının flow sitometri analizi



Şekil 4. 31. *Arabis gunnisoniana* ve *A. holboellii* tohumlarının flow sitometri analizi



Şekil 4. 32. *A. gunnisoniana*'ya ait bir adet tohumun flow sitometri analizi

kanamisin içermeyen MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürün 2. haftasından sonra tüm ortamlarda bitkiler kanamisin miktarına bağlı olmaksızın ölmüştür. Sonuç olarak 50 mg/l kanamisin miktarının transgenik bitkilerin seçilmesinde kullanılmasına karar verilmiştir. Transformasyon çalışmalarında *in vitro*'da steril şartlarda çimlendirilmiş *A. gunnisoniana* bitkilerinden alınan hipokotil eksplantları pBJ40 taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* suşu ile ko-kültive edilmiştir. Ko-kültivasyonu takiben 2-4 hafta sonra seleksiyon ortamlarındaki hipokotillerde kallus meydana gelmiş adventif sürgünlerse kültürün 6. haftasından sonra gelişmiştir. Kanamisine dirençli sürgünlerin %40'ında *NPTII* geninin varlığı PCR ile onaylanmıştır.

Çalışmada kullanılan *Arabis* türlerinin üreme biyolojileri embriyo kesesi gelişimi ve flow sitometri analizleri ile incelenmiştir. Embriyo kesesi gelişiminde ovül-temizleme tekniği kullanılmıştır. Buna göre, *A. gunnisoniana* ve *A. holboellii*'de apomiktik üreme *Taraxacum* tip diplosporik dyad gelişimi ile meydana gelmektedir. Uzunluğu 0.5-1 mm boyundaki pistillerde ovüller plasentadan henüz farklılaşmaktadır. Bu evrede ovüller megaspor ana hücresi, iç ve dış integümentler ve nusellusdan meydana gelir. Ortalama uzunluğu 1.5 mm'ye ulaşan pistillerde ise iç ve dış integümentler nusellusu tamamen sarar, megaspor ana hücresi apomayotik bölünmeye uğrar. Megaspor ana hücresi apomayoz sonrası seksüel üreyen bitkilerin aksine tetrad (n) yerine diplosporik dyad (2n) oluşturur. Uzunluğu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde ise mikropilar uçda yer alan dyad dejenere olur. Kalazal uçda olanı ise hacimce genişleyip, mitoz bölünmeler geçirerek, önce 2, 4 ve son olarak da 8 hücreli embriyo kesesi oluşturur. Embriyo kesesi gelişimi uzunluğu 5 mm'ye ulaşan pistillerde sonlanmıştır. Bu evrede embriyo ve endosperm belirginleşmiştir.

*Arabis gunnisoniana* pistillerinde megaspor ana hücresi etrafında ya hiç ya da çok az kaloz birikimi vardır. Buna karşın seksüel üreyen bitkilerde yoğun bir birikimin olması apomiktik üremenin varlığını işaret edebilir.

*A. gunnisoniana* ve *A. holboellii*'ye ait olgunlaşmış tohumların flow sitometri analizleri ise gerek embriyo ve endospermin içerdiği DNA miktarları açısından gerekse ploidi seviyeleri açısından 2 farklı histogram vermiştir. Buna göre embriyo kesesi ve

embriyo apomiktik olarak meydana gelirken, endosperm ya kendiliğinden (otonom) ya da merkezi hücrelerin mayoz geçirmiş veya geçirmemiş bir erkek gamet tarafından döllenmesi (pseudogami) ile oluşmuştur. *A. drummondii* ise seksüel üreyen bitkilere özgün histogramlar vermiştir. Bu sonuçlar, aynı zamanda flow sitometrinin apomiksi çalışmalarında verimli bir şekilde kullanılabilineceğini göstermiştir.

Tüm bu bilgiler *Arabidopsis* türlerinin apomiksini tarıma faydalı hale getirilmesinde model bitki olarak kullanılabilineceğini göstermiştir.



## 6. KAYNAKLAR

- ALBERTINI, E., PORCEDDU, A., FERRANTI, F., REALE, L., BARCACIA, G., ROMANO, B. and FALCINELLI, M. 2001. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. *Sexual Plant Reproduction*, 14: 213-217.
- ALVES, E.R., CARNEIRO, V.T.C. and ARAUJO, A.C.G. 2001. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiara brizantha* (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 14: 207-212.
- AWADALLA, P. and CHARLESWORTH, D. 1999. Recombination and selection at Brassica self-incompatibility loci. *Genetics*, 152: 413-425.
- BACHEM, C.W.B., SPECKMANN, G.J., LINDE, VERHEGGEN F.T.M., HUNT, M.D., STEFFENS, J.C. and ZABEAU, M. 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Biotechnology*, 12: 1101-1105.
- BANTIN, J., MATZK, F. and DRESSELHAUS, T. 2001. *Tripsacum dactyloides* (Poaceae): a natural model system to study parthenogenesis. *Sexual Plant Reproduction* 14: 219-226.
- BARCACCIA, G., MAZZUCATO, A., ALBERTINI, E., ZETHOF, J., GERATS, A., PEZZOTTI, M. and FALCINELLI, M. 1998. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 74-82.
- BARCACCIA, G., MAZZUCATO, A., BELARDINELLI, A., PEZZOTTI, M., LUCRETTI, S. and FALCINELLI, M. 1997. Inheritance of parental genomes in progenies of *Poa pratensis* L. from sexual and apomictic genotypes as assessed by RAPD markers and flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 516-524.
- BARGHCHI, M., TURGUT, K., SCOTT, R. and DRAPER, J. 1994. High-frequency transformation from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana* ecotypes "C24" and "Landsberg erecta". 1994. *Plant Growth Regulation*, 14: 61-67.
- BEVAN, M.W., FLAVELL, R.F. and CHILTON, M.D. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 184-187.
- BICKNELL, R., PODIVINSKY, E., CATANACH, A., ERASMUSON, S. and LAMBIE, S., 2001. Strategies for isolating mutants in *Hieracium* with dysfunctional apomixis. *Sexual Plant Reproduction*, 14: 227-232.

- BICKNELL, R.A. 1997. Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum*. *Sexual Plant Reproduction*, 10: 168-172.
- BICKNELL, R.A., BORST, N.K. and KOLTUNOW, A.M. 2000. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity*, 84: 228-237.
- BLAKE, N. K., DITTERLINE, R.L. and STOUT, R.G. 1991. Polymerase chain reaction used for monitoring multiple gene integration in *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Science*, 31: 1686-1688.
- BLAKEY, C.A., GOLDMAN, S.L. and DEWALD, C.L. 2001. Apomixis in *Tripsacum*: Comparative mapping of a multigene phenomenon. *Genome*, 44: 222-230.
- BÖCHER, T.W. 1951. Cytological and embryological studies in the amphipomictic *Arabis holboellii* complex. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter VI, 7: 1-57.
- BONILLA, J.R. and QUARIN, C.L. 1997. Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Science*, 127: 97-104.
- BURSON, B.L. 1997. Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. *Crop Science*, 37: 1347-1351.
- CALZADA, J.P.V., CRANE, C.F. and STELLY, D.M. 1996. Apomixis: The asexual revolution. *Science*, 274: 1322-1323.
- CARMAN, J.G., CRANE, C.F. and RIERA-LIZARAZU, O. 1991. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australian *Elymus* species. *Crop Science*, 31: 1527-1532.
- COURTNEY-GUTTERSON, N., NAPOLI, C., LEMIEUX, C., MORGAN, A., FIROOZABADY, E. and ROBINSON, K.E.P. 1994. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology*, 12: 268-271.
- CRANE, C.F. and CARMAN, J.G. 1987. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany*, 74 (4): 477-496.
- DE BLOCK, M., HERRERA-ESTRELLA, MANTAGU, M.V., SCHELL, J. and ZAMBRYSKI, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *The EMBO Journal*, 8: 1681-1689.
- DREWS, G.N., LEE, D. and CHRISTENSEN, C.A. 1998. Genetic analysis of female gametophyte development and function. *The Plant Cell*, 10: 5-17.

- DUJARDIN, M. and HANNA, W.W. 1989. Developing apomictic pearl millet-characterization of a BC<sub>3</sub> plant. *Journal of Genetics & Breeding*, 43: 145-151.
- ESTOPA, M., MARFA, V., MELE, E. and MESSEGUER, J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 211-220.
- GAJ, M.D. 2001. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 39-46.
- GRIMANELLI, D., LEBLANC, O., PEROTTI, E. and GROSSNIKLAUS, U. 2001. Development genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17 (10): 597-604.
- GRIMANELLI, D., LEBLANC, O., ESPINOSA, E., PEROTTI, E., LEON, D.G. and SAVIDAN, Y. 1998a. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity*, 80: 33-39.
- GRIMANELLI, D., LEBLANC, O., ESPINOSA, E., PEROTTI, E., LEON, D.G. and SAVIDAN, Y. 1998b. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-*Tripsacum* hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity*, 80: 40-47.
- GROSSNIKLAUS, U. and DIJK, P.J.V. 2001. How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell* 13 (7): 1491-1497.
- GROSSNIKLAUS, U., KOLTUNOW, A., and CAMPAGNE, M.V.L. 1998. A bright future for apomixis. *Trends in Plant Science*, 3 (11): 415-416.
- GUSTINE, D.L., SHERWOOD, R.T. and HUFF, D.R. 1997. Apospory-linked molecular markers in Buffelgrass. *Crop Science*, 37: 947-951.
- HAMAMA, L., BAAZIZ M. and LETOUZE, R. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 109-113.
- HASSAN, M.H., SWARTZ, H.J., INAMINE, G. and MULLINEAUX, P. 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several *Rubus* genotypes and recovery of transformed plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 9-17.
- HONG, W. and DEBERGH, P. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 21-8.

- KHALAFALLA, M.M. and HATTORI, K. 1999. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Growth Regulation*, 27: 145-148.
- KOCH, M., BISHOP, J. and MITCHELL-OLDS, T. 1999. Molecular systematics and evaluation of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology*, 1: 529-537.
- KOJIMA, A. and NAGATO, Y. 1997. Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction* 10, 8-12
- KOLTUNOW, A.M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and Embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, 5: 1425-1437.
- KOLTUNOW, A.M., BICKNELL, R.A. and CHAUDHURY, A.M. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*, 108: 1345-1352.
- KOLTUNOW, A.M., JOHNSON, S.D. and BICKNELL, R.A. 1998. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sexual Plant Reproduction*, 11: 213-230.
- KOLTUNOW, A.M., JOHNSON, S.D. and BICKNELL, R.A. 2000. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. *Sexual Plant Reproduction*, 12: 253-266.
- KUGINUKI, Y. and TZUKAACKI, H. 2001. Regeneration ability and *Agrobacterium*-mediated transformation of different cultivars in *Brassica oleracea* L. and *B. rapa* L. (syn. *B. campestris* L.). *Journal of Japanese Society of Horticulture Science* 70: 682-690.
- KUNIK, T., SALOMON, R., ZAMIR, D., NAVO, N., ZEIDAN, M., MICHELSON, I., GAFNI, Y. and CZOSNEK, H. 1994. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology* 12 (5): 500-504.
- LEBLANC, O., PEEL, M.D., CARMAN, G.C. and SAVIDAN, Y. 1995. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany*, 82 (1): 57-63.
- LEBLANC, O., GRIMANELLI, D., ISLAMI-FARIDI, N., BERTHAUD, J. and SAVIDAN, Y. 1996. Reproductive behavior in maize-*Tripsacum* polyhaploid plants: implications for the transfer apomixis into maize. *Heredity*, 87: 108-111.

- LEBLANC, O. and MAZZUCATO, A. 2001. Screening procedures to identify and quantify Apomixis. In: Y. SAVIDAN, J.G. CARMAN and T. DRESSELHAUS (Editors), *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, CIMMYT/IRD/EU, pp. 122, Mexico
- LUO, J.P., JIA, J.F., GU, Y.H. and LIU, J. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Science*, 143: 93-99.
- LUO, Y. and KOOP, H.U. 1997. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta*, 202: 387-396.
- MARTINEAU, B., SUMMERFELT, K.R., ADAMS, D.F. and DEVERNA, J. 1995. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. *Biotechnology* 13: 250-254.
- MATTHEWS, P.R., WANG, M.B., WATERHOUSE, P.M., THORNTON, S., FIEG, S.J., GUBLER, F. and JACOBSEN, J.V. 2001. Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding* 7: 195-202.
- MATZK, F., MEISTER, A. and SCHUBERT, I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*, 21: 97-108.
- MATZK, F., MEISTER, A., BRUTOVSKA, R. and SCHUBERT, I. 2001. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *The Plant Journal*, 26: 275-282.
- MUNDHARA, R. and RASHID A. 2001. Regeneration of shoot-buds on hypocotyl of *Linum* seedlings: a stress-related response. *Plant Science*, 161: 19-25.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- NAUMOVA, T.N. 1997. Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects. *Euphytica*, 96: 93-99.
- NAUMOVA, T.N., HAYWARD, M.D. and WAGENVOORT, M. 1999. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sexual Plant Reproduction* 12: 43-52.
- NAUMOVA, T.N., LAAK, J., OSADTCHIY, J., MATZK, F., KRAVTCHENKO, A., BERGERVOET, J., RAMULU, K.S. and BOUTILIER, K. 2001. Reproductive development in apomictic populations of *Arabidopsis holboellii* (Brassicaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 14: 195-200.

- NOGLER, G.A. 1982. How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Botanica Helvetica*, 92, 13-22.
- NOGLER, G.A. 1984. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94, 411-422.
- NOYES, R.D. and RIESEBERG, L.H. 2000. Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics*, 155: 379-390.
- ÖZCAN, S., BARGHCHI, M., FIREK, S. and DRAPER, J. 1992. High frequency adventitious shoot regeneration from immature cotyledons of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 11: 44-47.
- OZIAS-AKINS, P., LUBBERS, E.L., HANNA, W.W. and McNAY, J.W. 1993. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 632-638.
- OZIAS-AKINS, P., ROCHE, D. and HANNA, W.W. 1998. Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have allelic forms in sexual genotypes. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 95: 5127-5132.
- PATTON, A.D. and MEINKE, D.W. 1988. High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 7: 233-237.
- PEEL, M.D., CARMAN, J.G. and LEBLANC, O. 1997a. Megasporocyte callose in apomict Buffelgrass, Kentucky Bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and Weeping Lovegrass. *Crop Science*, 37: 724-732.
- PEEL, M.D., CARMAN, J.G., LIU, Z.W. and WANG, R.C. 1997b. Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve & Connor, *Crop Science*. 37: 717-723.
- PESSINO, S.C., EVANS, C., ORTIZ, J.P.A., ARMSTEAD, I., DO VELLA, C.B. and HAYWARD, M.D. 1998. A genetic map of the apospory region in *Brachiaria* hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.
- PFOSSER, M., AMON, A., LELLEY, T. and HEBERLEBORSE, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow-cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*. 21 (4): 387-393.
- POLANCO, M.C. and RUIZ, M.L. 2001. Factors that affect plant regeneration from

*in vitro* culture of immature seeds in four lentil cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 133-139.

- RAINERI, D.M., BOTTINO P., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology*, 8: 33-37.
- ROCHE, D., CONG, P., CHEN, Z., HANNA, W.W., GUSTINE, D.L., SHERWOOD, R.T. and OZIAS-AKINS, P. 1999. An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *The Plant Journal*, 19 (2): 203-208.
- ROCHE, D., ZHENBANG, C., HANNA, W.W. and OZIAS-AKINS, P. 2001. Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* X *P. squamulatum*). *Sexual Plant Reproduction*, 13: 217-223.
- ROY, B.A. 1995. The breeding systems of six species of *Arabis* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 82 (7): 869-877.
- SCHNEITZ, K., HULSKAMP, M. and PRUITT, R.E. 1995. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal*, 7 (5): 731-749.
- SHERWOOD, R.T., BERG, C.C. and YOUNG, B.A. 1994. Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science*, 34: 1490-1494.
- SRISKANDARAJAH, S., FRELLO, S. and SEREK, M. 2001. Induction of adventitious shoots *in vitro* in *Campanula carpatica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 295-298.
- TAS, I.C.Q. and VAN DIJK, P.J. 1999. Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). I. The inheritance of apomixis. *Heredity*, 83: 707-714.
- TAWFIK, A.A. and NOGA, G. 2001. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 141-147.
- TAYLOR, N.J., EDWARDS, M., KIERNAN, R.J., DAVEY, C.D.M., BLAKESLEY, D. and HENSHAW, G.G. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*. 14 (6): 726-730

- TIVAREKAR, S. and EAPEN, S. 2001. High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mungbean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 227-230.
- TUCKER, M.R., PAECH, N.A., WILLEMSE, T.M. and KOLTUNOW, A.M.G., 2001. Dynamics of callose deposition and  $\beta$ -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic Hieracium. *Planta*. 212: 487-498.
- TURGUT, K., BARGHCHI and SCOTT, R. 1998. Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding*, 117: 503-504.
- VAN DIJK, P., TAS, I.C.Q., FALQUE, M. and BAKX-SCOTMAN, T. 1999. Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity*, 83: 715-721.
- VICTOR, J.M.R., MURCH, S.J., KRISHNA, R. and SAXENA, P.K. 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. *Plant Growth Regulation*, 28: 9-15.
- VIELLA-CALZADA, J.P., NUCCIO, M.L., BUDIMAN, M.A., THOMAS, T.L., BURSON, L.B., HUSSEY, M.A. and WING, R.A. 1996. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Molecular Biology*, 32: 1085-1092.
- WELCH, D.M. and MESELSON, M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211-1215
- WU, Y., HABERLAND, G., ZHOU, C. and KOOP, H. U. 1992. Somatic embryogenesis, formation of morphogenetic callus and normal development in zygotic embryos in *Arabidopsis thaliana* in vitro. *Protoplasma*, 169: 89-96.
- XIE, D. and HONG, Y. 2001. In vitro regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 167-173.
- YOUNG, B.A., SHERWOOD, R.T. and BASHAW, E.C. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 57: 1668-1672.



## 7. ÖZGEÇMİŞ

Kemal Melik TAŞKIN, 1972 yılında Kadırlı'de doğdu. Lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 1989 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 1993 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Kasım 1994 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam etti ve Ağustos 1997 yılında aynı yerde yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Şubat 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı ve Haziran 2003 yılında aynı yerde doktora öğrenimini tamamladı. 1998 yılından beri Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ