



Allium Türlerinin Islahında Haploidi Tekniğinden Yararlanma

Faika YARALI^{1*}

Ruhsar YANMAZ²

¹ Kilis 7 Aralık Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Kilis

² Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

***Sorumlu Yazar:**

E-posta: faikayarali@gmail.com

Geliş Tarihi : 01 Eylül 2012

Kabul Tarihi : 12 Ekim 2012

Özet

Haploid bitkilerin elde edilmesinde erkek ve dişi gametin başlangıç materyali olduğu androgenik ve gynogenik yöntemler kullanılmaktadır. *Allium* türleri gynogenezise cevap veren gruptadır. Haploid embriyo üretiminde çiçek tomurcuğu, yumurta (ovul) ve yumurtalık (ovaryum) kültürleri ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Gynogenezis yoluyla ilk başarılı sonuçlar soğandan alınmış, soğanı pırasa ve sarımsak türlerindeki araştırmalar izlemiştir. Burada sunulan makalede dişi gametten haploid bitki elde edilmesinde kullanılan yumurta, yumurtalık ve çiçek tomurcuğu kültürlerinin yapılışı, elde edilen haploidlerin diploid hale getirilmesi ve bitkiye dönüştürülmesine kadar geçen aşamalar açıklanmış ve bu tekniğin islah programlarında kullanımına ilişkin bilgi aktarılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Allium*, islah, gynogenezis, haploidi

Utilization Of Haploidy Techniques In Breeding of *Allium* Species

Abstract

Male and female gametophytes are used in production of haploid plants. *Allium* species respond to gynogenesis. To obtain haploid embryos, from onion, flowering garlic and leeks plants, flower bud, ovule and ovary culture are used. In this paper, gynogenesis application, factors affecting the success of haploid plant production via gynogenesis are explained and availability of this method in onion breeding studies is discussed.

Key words: *Allium*, breeding, gynogenesis, haploidy

GİRİŞ

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitki adı verilmektedir [1-4]. Haploidler, her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi bulundurdıkları için islah çalışmaları sonucu geliştirilen saf hatlara daha kısa sürede ulaşılmasını sağlar. Haploid bitkiler, normal bitkilerde bulunan tüm organlara sahip oldukları halde, diploidlere oranla hücreleri daha küçük olduğu için boyları daha kısa, yaprakları ve çiçekleri küçük ve verimli değildir. Yani bitki oluştursalar da tohum veremezler [5-8]. Haploid bitkilerin bitki islah programlarında kullanılabilmesi için diploid bitkilere dönüştürülmeleri gerekir. Haploid bir bitkinin kromozom sayısı, kromozom sayısını katlayan kimyasal madde uygulamalarıyla diploid hale getirilebilir. "Dihaploidizasyon" veya "dihaploidleştirme" denilen yöntemle elde edilen bitkilere de "katlanmış haploid" adı verilir.

In vitro haploid embriyo ve bitki elde etmede başlangıç materyali olarak dişi ve erkek gametler kullanılmaktadır. Ancak başarıda bitki türünün haploidizasyona yatkınlığı önemlidir. Haploid bitkilerin elde edilmesinde türlere göre farklı teknikler kullanılmaktadır. Soğangillerde yapılan araştırmalar çiçek tomurcuğu, yumurta ve yumurtalık kültüründen olumlu sonuçlar alındığını göstermektedir [5, 7, 9-23].

Allium türlerinde gynogenezis yoluyla ilk haploid bitkiler 1989 yılında Muren ve 1990 yılında ise Champion ve Aloni ile Keller tarafından soğanda elde edilmiştir [15, 16, 20, 24, 25]. Daha sonra pırasa ve sarımsakta da yapılan araştırmalarla başarılı sonuçlar elde edilmiştir [12, 37].

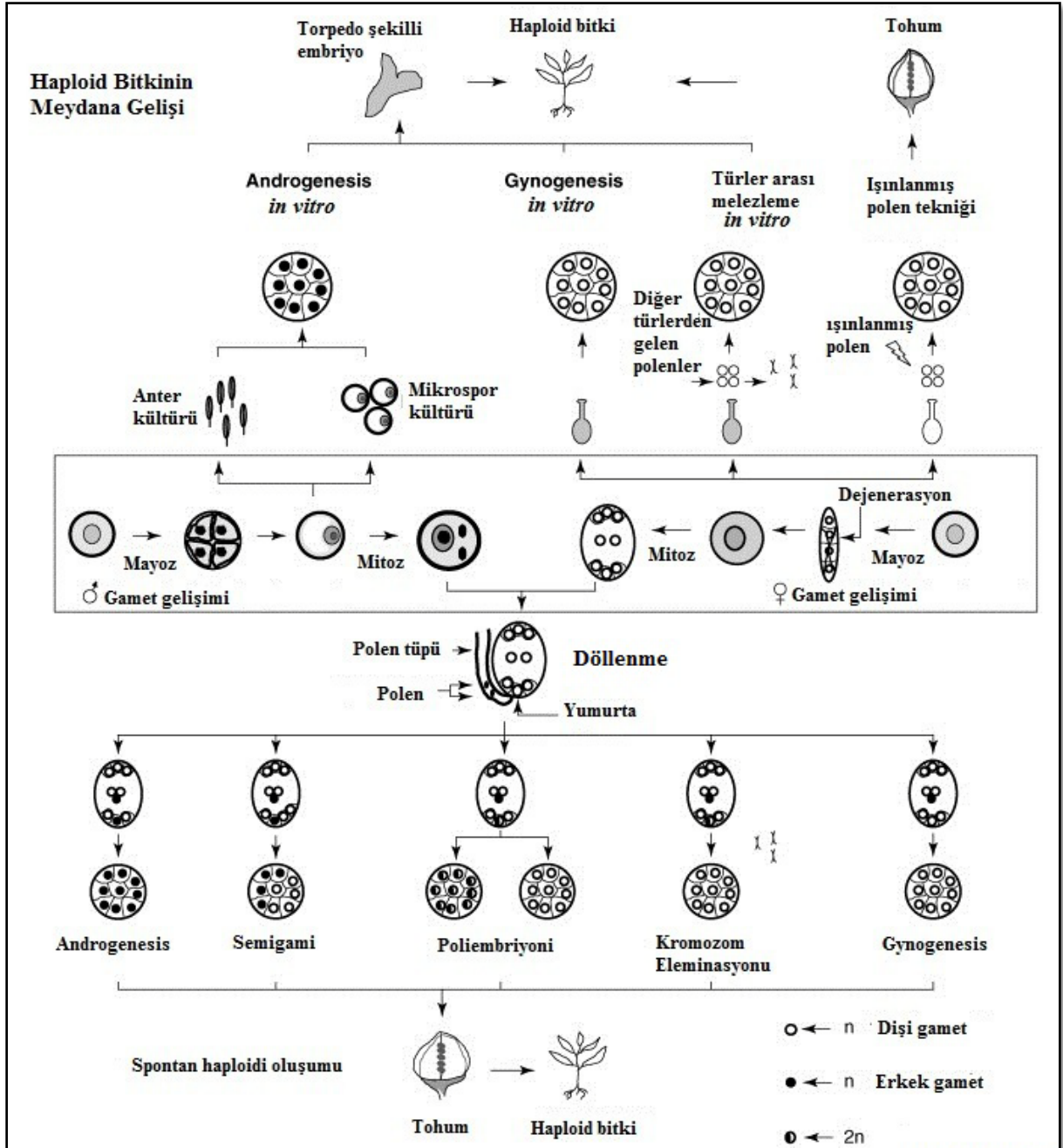
Burada sunulan çalışmada dişi gametten haploidi uyartımı olarak adlandırılan yumurta (ovul), yumurtalık (ovaryum) veya çiçek tomurcuğu kültürlerinden nasıl yararlanılabileceği üzerinde açıklamalar yapılmıştır.

Dişi gametten haploidi uyartımı (Gynogenesis)

Haploid bitkiler *in situ* kaynaklı olabilirse de doğal koşullarda haploidlere ulaşma olasılığı çok düşüktür. Haploidler erkek veya dişi organların haploidiye karşı uyartımları ile *in vitro* koşullarda elde edilebilmektedir (Şekil 1). *In vitro* veya *in situ* uyartılı parthenogeneziste (androgenesis ve gynogenesis) normal döllenme meydana gelmemektedir. Döllenme olmaksızın, erkek eşey hücresinin uyartımı sonucunda veya yumurta hücresi veya antipodal hücrelerden birinin zigot gibi davranarak bölünmesi ile haploid embriyo meydana gelmektedir. Embriyo yumurta hücresinden döllenme olmaksızın meydana gelirse buna

gynogenesis adı verilmektedir [8, 26, 27]. Ancak gynogenik gelişmeyi tetikleyen moleküler mekanizmanın ne olduğu konusundaki bilgilerin yetersizliği nedeniyle gynogenesis olayının hücresel düzeyde nasıl meydana geldiği tam olarak bilinmemektedir [4, 28, 29].

Dişi gametten haploid bitki üretimi *Allium* türlerinden başka arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.), çeltik (*Oryza sativa* L.), kavun (*Cucumis melo* L.), kabak (*Cucurbita pepo* L.), hıyar (*Cucumis sativus* L.), mısır (*Zea mays* L.), şekerpancarı (*Beta vulgaris* L.), ve ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) de başarıyla kullanılmaktadır [30, 31, Çizelge 1].



Şekil 1. *In situ* ve *in vitro*'da haploid bitkilerin meydana gelişi [30]

Çizelge 1. Gynogenez yoluyla farklı türlerde haploid embriyo/bitki oluşma oranları.

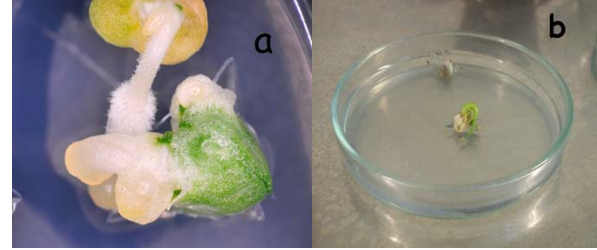
Familya	Tür	Haploid embriyo/bitki meydana gelme oranı (%)	Kaynak
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i> L.	0.01- 22.6	5, 13, 15, 16, 19, 23, 24, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 39
	<i>Allium porrum</i> L.	0.00	33, 37
	<i>Allium galanthum</i> X <i>Allium cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i>	2.05	36
	<i>Allium cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i>	0.03	7
	<i>Allium schoenoprasum</i> L.	1.89	37
	<i>Allium fistulosum</i> L.	0.00	
	<i>Allium ursinum</i> L.	1.95	
<i>Allium angulosum</i> L.	0.00		
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> L.	2.10- 18.3	8 27 28 40
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.	16.14-18.4	
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	2.87-11.5	
	<i>Cucumis melo</i> L.	3.00	
Compositaeae (Asteraceae)	<i>Gerbera jamesonii</i> L.	4-7	
	<i>Helianthus annuus</i> L.	4.8	
Moraceae	<i>Morus alba</i> L.	9.6-16	
Graminaea (Poaceae)	<i>Oryza sativa</i> L.	1.3	
	<i>Panicum miliacem</i> L.	1.4	
	<i>Zea mays</i> L.	8.3	
	<i>Triticum aestivum</i> L.	1.95-6.67	
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	0.2- 1.4	
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	0.00	41

Dişi gametten *in vitro* haploid bitki etmek amacıyla çiçek tomurcuğu, yumurtalık (ovaryum) ve yumurta hücrelerinden yararlanılmaktadır. *Allium* türlerinde yapılan çalışmalarda; yumurta (ovul) kültürü yoluyla haploid bitki elde etmede yumurta izolasyonunun çok fazla zaman alması ve embriyo meydana gelme frekansının düşüklüğü nedeniyle yumurtalık ve çiçek tomurcuğu kültürleri tercih edilmektedir [37].

Yumurta (ovul), yumurtalık (ovaryum), çiçek tomurcuğu kültürü

Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın soğanlarda çiçek tomurcuğunun çiçeklerin açılmasından (antezis) önce bitkiden alınması gerekir [13, 32, 37, 42, 43]. Steril ortamda tomurcuk veya tomurcuk içinde yer alan yumurtalık veya yumurta hücreleri, besin ortamına dikilir. Gelişen bitki

kısımları, alt kültür ve büyüme ortamlarına aktarılır (Şekil 2, Şekil 3).



Şekil 2. a, b: Yumurtalık kültürü yoluyla elde edilen gynogenetik bitkilerinin gelişimi. a: Yumurtalıklardan embriyo gelişimi. b: Embriyonun bitkiye dönüşümü (Fotoğraf: Faika YARALI).



Eksplantların ana bitkiden alınması, sterilizasyonu ve induksiyon ortamına dikilmesi



Alt kültür ortamı

İklim odası

Büyüme (EM) ortamında gelişen gynogenetik bitkicikler

Şekil 3. Yumurta, yumurtalık, çiçek tomurcuğu kültürlerinin yapılışı (Fotoğraflar: Faika YARALI).

Ploidi seviyesini belirleme

Yumurtalık kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin haploid olup olmadıklarının ortaya konulması gerekir. Bu amaçla 4 farklı yöntem kullanılmaktadır.

Fenotipik gözlem

Haploid bitkilerde bitki organları tam olarak oluşur, ancak diploidlere göre daha küçüktür [3, 5, 6]. Elde edilen bitkiler yaprak ayası, bitki boyu, yönünden kıyaslanır.

Kromozom sayımı

Bitkilerin sağlıklı ve güçlü gelişen taze kök uçlarından alınan örneklerde kromozom sayımı yapılır. En güvenilir yöntemlerden biridir [5].

Flow sitometri

Yöntemin esas özelliği belirlenecek hücrelerin tek tek floresan detektörden geçerken emdikleri ışığın analizine dayanmaktadır. Hızlı bir yöntem olması ve miksoplod (diploid ve poliploid hücrelerin karışımı) hücrelerin saptanabilmesi nedeni ile flow sitometri günümüzde kromozom sayımlarının yapılması için en fazla tercih edilen yöntem haline gelmiştir [3].

Stoma özelliklerinin incelenmesi

Bitkilerde stoma iriliği ve birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında ilişki bulunmaktadır. Haploid bitkilerin stoma hücreleri diploid olanlardan daha küçüktür. Yapraktaki stoma sayısı ve iriliği incelenerek bitkinin haploid olup olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak ploidi seviyesi ortaya konulamamaktadır [3, 27, 44].

Kromozom katlama (Dihaploidizasyon)

Haploid bitkilerden n sayıda olan kromozom sayısını 2n haline çevirebilmek için kimyasal madde olarak çoğunlukla kolhisin kullanılmaktadır. Bunun yanında oryzalin, amiprofos-methyl (APM) ve trifluralin de etkilidir [43, 45-47]. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar. Kromozom katlaması için kolhisin kültür ortamına katılabileceği gibi, haploid bitkilerin aksiller (yan) tomurcuklarına uygulanabilmekte; *in vitro* bitkiler veya bunların çelikleri belli bir süre kolhisin çözeltisi içinde

bekletilebilmekte veya tepe tomurcukları kolhisin çözeltisi içerisine *in vivo* koşullarda daldırılmaktadır [3].

Bitkilerin dış koşullara alıştırılması:

Katlama işleminden sonra 3-4 gerçek yaprağa sahip olan dihaploid bitkiler saksılara dikilip kontrollü koşullardaki (20⁰ C, 13 saat aydınlık 11 saat karanlık ve nem kontrollü) iklim odalarına alınır. Bir hafta sonra bitkilerin üzerlerindeki plastik örtülere delikler açılarak bitkilerin ortam koşullarına alıştırılması sağlanır. 2 hafta sonra plastik örtüler tamamen kaldırılır ve 4-5 hafta sonra 15 cm çapındaki saksılara aktarılan bitkiler sera şartlarında gelişmeye bırakılırlar [32, 43].

Dışı gamet yoluyla haploidinin uyarılmasında (Gynogenezis) başarıyı etkileyen faktörler

Yapılan araştırmalar haplod bitki elde etme çalışmalarında aşağıdaki faktörlerin başarıyı etkilediğini ortaya koymuştur.

Tür ve genotip

Haploidi çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Tüm koşullar yerine getirilse de türün haploidiye eğilimi yoksa başarı şansı hemen hemen hiç yoktur. [11, 13-15, 29, 37-39, 43, 48, 49]. Bugüne kadar yapılan araştırma sonuçları soğanlarda gynogenik embriyo oluşma oranının 0.00 ile 22.6 arasında değiştiğini göstermektedir (Çizelge 1). Genel bir kural olarak aynı tür içinde saf hatların, sentetik ve hibrit çeşitlerin embriyo verimi ve embriyolardan bitki rejenerasyonu daha fazla olmaktadır [13, 18, 29, 32].

Kültür ortamının bileşimi

Aynı cinsle giren türler ve bu türlerdeki çeşitler arasında bile farklı kültür ortamı isteyenler bulunmaktadır [14]. *Allium* türlerinde genel olarak yumurta, yumurtalık ve çiçek tomurcuğu kültürleri için B1, B5, BDS, MS besin ortamları kullanılmaktadır [11, 34, 36, 37, 43, 48-52].

Ortama katılan besin elementinin yanında büyüme ve gelişmeyi uyararak amacıyla ortama katılan şeker, büyüme düzenleyici madde miktarı ve ortam pH'sı da önemlidir. Çizelge 2'de *Allium* türlerinde kullanılan besin ortamları ve bileşimlerine ilişkin araştırma sonuçlarına dayalı veriler görülmektedir.

Çizelge 2. *Allium* türlerinde haploid embriyo elde etmek amacıyla kullanılan yöntemlere göre kültür ortamları ve iççekleri.

Tür	Yöntem	Besin Ortamı	Büyüme Düzenleyici Maddeler	Şeker Dozu (%)	Kaynak
<i>Allium cepa</i> L.	Çiçek Tomurcuğu/ Yumurtalık	BDS	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 6-BA	10	11, 15, 20, 23, 25, 32, 34, 42
		B1	1 mg/l NAA; 2 mg/l 2İP	10	
		B5	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 6-BA	10	
<i>A. schoenoprasum</i> L., <i>A. fistulosum</i> L., <i>A. ursunium</i> L., <i>A. porrum</i> L., <i>A. angulosum</i> L., <i>Allium cepa</i> L., <i>A. cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i>	Çiçek Tomurcuğu	B5	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 6-BA	10	37
		MS	1 mg/l NAA; 2 mg/l 2İP		
<i>A. cepa</i> – <i>A. cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i>	Çiçek Tomurcuğu	B5	1-2 mg/l 2,4-D; 1-2 mg/l BA 2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 6-BA	7.5	7, 13, 36
<i>Allium cepa</i> L.	Çiçek Tomurcuğu	B5	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l BA	10	16
		BDS	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l BA	10	
		MS	2 mg/l 2İP; 1 mg/l NAA	10	
		MS	Hormonsuz	3	
<i>Allium cepa</i> L.	Yumurta -Yumurtalık- Çiçek Tomurcuğu	BDS	2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 6-BA	10	50
			1 mg/l NAA; 2 mg/l 6-BA		

Şeker

Kültür ortamının karbonhidrat içeriği ve tipi haploid embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerinde etkilidir. Genellikle karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz kullanılır.

Büyümeyi düzenleyici maddeler

Gynogenik haploid embriyoların elde edilmesinde ortamın oksin-sitokinin dengesi önemlidir. Oksin olarak 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ve NAA (naftalinasetik asit) ve bunların 1-2 mg/l'lik dozları daha iyi sonuç vermektedir. Sitokinin olarak ise 6-BA (6-benzylaminopurine) ve 2iP (2-izopentiladenin)'in 1-2 mg/l dozlarının kullanımı yaygındır [7, 13, 20, 23, 32, 34, 43, 50].

pH

Doku kültürü çalışmalarında kültür ortamının pH'sı kültür ortamında bulunan tuzların çözünürlüğü, enzim ve katalizör aktivitesi, ortamdaki besin maddeleri ve büyümeyi düzenleyici maddelerin explant tarafından alınması üzerinde etkilidir. *Allium* türlerinde yapılan çalışmalarda besin ortamının pH değerinin 5.8-6.0 arasında olması gerektiği belirtilmektedir [7, 15, 21, 31, 32, 53].

Ana bitkinin yetiştirme koşulları

Ana bitkinin yetiştirme koşulları gynogenezis üzerinde etkili olan önemli faktörlerden biridir. Bu konudaki araştırma sayısı oldukça az olmasına rağmen ana bitkilerin olabildiğince kontrollü koşullarda yetiştirilmesine özen gösterilmelidir. Haploidi çalışmalarında ana bitkilerin yetiştiriciliğinde kontrollü seralar kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda hücre bölünmesi daha hızlı olduğu için haploidi oranı düşmektedir. Buna karşılık soğanlarda düşük sıcaklık ve yüksek ışıklandırma süresi de gynogenezis üzerinde olumlu etkiye sahiptir [28].

Tomurcuk büyüklüğü

Yumurta, yumurtalık veya çiçek tomurcuğu kültürlerinden başarı elde edebilmesi için gereken en önemli noktalardan birisi, yumurta veya yumurtalığın alındığı çiçek tomurcuğunun büyüklüğü, yani yumurtalığın fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir [14, 28]. Soğangiller familyasına giren türlerde çiçeklerdeki dişi ve erkek gametler aynı zamanda olgunlaşmamaktadır. Çiçek tomurcuklarının alınma dönemi olarak çiçeklerin açılmasından (antezis) önceki dönem uygundur [7, 13, 36, 37]. Ancak tomurcuk iriliği tomurcukların geliştiği dönemdeki iklim faktörlerine bağlı olduğundan her zaman çiçeklenmeden önceki dönemde alınan tomurcuklardan olumlu sonuç alınmayabilmektedir. Genel bir kural olarak 2.5- 4.5 mm çapındaki tomurcuklardan iyi sonuç alınmaktadır [20, 43]. Tomurcuk iriliği çeşitlere göre değişim gösterdiği için uygulamada üzerinde çalışılan çeşide özgü uygun tomurcuk büyüklüğünün belirlenmesinde fayda vardır.

Tomurcuklara yapılan ön uygulamalar

Ana bitkiye veya tomurcuklara düşük veya yüksek sıcaklık şokları, kültür ortamının besin içeriğinin azaltılmasıyla yapılan açlık şokları embriyogenezisi etkileyen faktörlerdendir [28, 29].

Haploidi Tekniğinin Soğan Islahı Programında Kullanılması

Haploid bitkiler ana bitkinin özelliklerini taşırlar. Bu nedenle ıslah çalışmalarında kullanılacak saf hatlara kısa sürede ulaşmayı sağlamak açısından yararları vardır.

Haploidler, saf hatların elde edilmesinin yanında, geriye melezleme ve hibrit çeşit geliştirme çalışmalarında da kullanılabilirler. Normal koşullarda soğangil familyasına giren türlerde 2 yılda 1 generasyon ilerlenebilir. Soğanlarda yabancı tozlanmanın hakim olması da saf hatlara kısa sürede ulaşılmasını engeller. Bu durumda haploid bitki geliştirme teknikleri ıslah programlarının içine monte edildiğinde 10 senede yapılabilecek bir saf hat elde etme aşaması, 5 yıla indirilebilir.

Bir ıslah programında haplodizasyon tekniğini kullanabilmek için, öncelikle üzerinde çalışılan çeşitlerin haploidiye eğilimleri belirlenmelidir. Eğilim varsa ıslah programına 1-2 saflaştırma çalışmasının arkasından girmesi gerekir. Daha önce de belirtildiği gibi saflaştırılmış materyalden haploid bitki elde etme olasılığı artmaktadır.

Çizelge 3'de bir soğan ıslah programında haploidinin hangi aşamalarda devreye girebileceği görülmektedir.

Çizelge 3. Soğan ıslah programlarında saf hatların elde edilmesinde haploidi tekniğinin kullanılması

1. Yıl	Tohum ekimi ve başların elde edilmesi.
2. Yıl	Başların dikimi, çiçeklenme döneminde <i>in vitro</i> haploid bitkilerin elde edilmesi, ploidi düzeyini belirleme ve dihaploidleri elde etme
3. Yıl	Dihaploidlerin dikimi ve başların elde edilmesi, başlarda seleksiyon
4. Yıl	Seçilen dihaploid başların dikimi ve dihaploidlerden tohum alma*
5. Yıl	Dihaploid saf hatların veya melezleme programına alınmış ana ve baba hatların tohum ekimi ve başların elde edilmesi
6. Yıl	Melezlemede kullanılacak ana ve baba hatların başlarının dikimi, çiçeklenme döneminde melezleme ve melez tohumların elde edilmesi.
7. Yıl	Melez tohumların ekilmesi ve hibrit bireylerin değerlendirilmesi

* Dördüncü yılda melezleme yapılabileceği düşünülebilir. Ancak dihaploid ebeveynlerin kaybedilmemesi için öncelikle dihaploid tohum üretiminin gerçekleştirilmesi ıslah programının sürdürülebilmesi açısından önemlidir.

Çizelgeden de görülebileceği gibi ıslah programının süresi kısaltılarak seleksiyonun ilk yılından sonra dihaploidler yoluyla saf hatlara ilk dört yıl içinde ulaşılabilir.

SONUÇ

Allium türlerinin çiçek ve dölleme biyolojileri nedeniyle ıslah çalışmaları uzun zaman almaktadır. Ancak günümüzde ıslah çalışmalarından daha kısa sürede sonuç almak amacıyla geliştirilen haploid bitki elde etme teknikleri sayesinde saf hat ve çeşitlere daha kısa sürede ulaşmak mümkün olabilmektedir. *Allium* türlerinde yapılan araştırmalarda ön plana çıkan gynogenezis teknikleri ile yumurta, yumurtalık veya çiçek tomurcuğunun *in vitro* koşullarda kültüre alınması ile haploid bitkiler başarılı bir şekilde elde edilmekte ve ıslah çalışmaları için gerekli saf hatlara daha sürede ulaşılabilir [5, 7, 11-20, 22, 28]. Ülkemizde gynogenik yöntemlerin *Allium* türlerindeki kullanımı henüz yöntem oturtma aşamasındadır. Tekniğin farklı laboratuvarlar koşullarındaki işleyiş şeması geliştirildiğinde ıslah çalışmalarının da yeniden boyutlandırılması sağlanmış olacaktır. Ülkemizde soğan üreticisi ülkeler içinde önemli bir yere sahipken, ıslah çalışmalarının uzun süreli olması nedeniyle ıslah çalışmalarının sayısı sınırlıdır. Ancak biyoteknolojik yöntemlerin devreye girmesiyle farklı bir boyut kazanacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Şehirli S, Özgen M. 1998. Bitki Islahı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yay. No: 1059, 261 s.
- [2] Pierik RLM. 1989. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Library of Congress Cataloging in Publication Data. Published by Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- [3] Ellialtıoğlu Ş, Sarı N, Abak K. 2001. Bitki Bioteknolojisi. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s, Konya.
- [4] Palmer CED, Keller WA. 2005. Overview of Haploidy. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in Crop Improvement II (Ed. By Palmer CE, Keller WA and Kasha KH), Vol:56, pp:3-7.
- [5] Keller J. 1990. Culture of Unpollinated Ovules, Ovaries and Flower Buds in Some Species of The Genus *Allium* and Haploid Induction Via Gynogenesis in Onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*. 47: 241-247.
- [6] Sulistyarningsih E, Tashiro Y, Shigyo M, Isshiki S. 1997. Morphological and Cytological Characteristics of Haploid Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* No: 82, pp: 7-15.
- [7] Sulistyarningsih E, Aoyagi Y, Tashiro Y. 2006. Flower Bud Culture of Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) With Cytogenetic Analysis of Resulting Gynogenic Plants and Somaclones. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86: 249-255.
- [8] Yılmaz ÖE. 2005. Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, s:57, Kahramanmaraş.
- [9] Tuncer B. 2006. Mikrospor Kültürünün Bitki Islahında Kullanımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Seminer, Ankara.
- [10] Atanassov A, Zagorska N, Boyadjiev P, Djilianov D. 1995. *In vitro* Production Of Haploid Plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 400-408.
- [11] Jakse M, Bohanec B, Ihan A. 1996. Effect of Media Components on The Gynogenic Regeneration of Onion (*Allium cepa* L.) Cultivars and Analysis of Regenerants. *Plant Cell Reports*. Vol: 15(2): 934-938.
- [12] Keller ERJ, Korzun L. 1996. Haploidy in Onion (*Allium cepa* L.) and Other *Allium* Species. *in vitro* Haploid Production in Higher Plants. Chapter. Edit: Jain SM, Sopory SK and Veilleuks RE, Kluwer Academic Publisher, Volume 3, p: 51-75. Netherlands.
- [13] Geoffriau E, Kahane R, Rancillac M. 1997. Variation of Gynogenesis Ability in Onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 94: 37-44.
- [14] Mukhambetzhonov SK. 1997. Culture of Nonfertilized Female Gametophytes *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48: 111-119.
- [15] Bohanec B, Jakse M. 1999. Variations in Gynogenic Response Among Long-day Onion (*Allium cepa* L.) Accessions. *Plant Cell Reports*, 18: 737-742.
- [16] Puddephat IJ, Robinson HT, Smith BM, Lynn J. 1999. Influence of Stock Plant Pretreatment on Gynogenic Embryo Induction From Flower Buds of Onion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 57: 145-148.
- [17] Hassandokht MR, Kashi A, Champion B, Bozorgipour R. 2000. Study of Haploid Production in Iranian Onions (*Allium cepa* L.) Via *in vitro* Gynogenesis. *Seed and Plant*, 16(3): 300-312.
- [18] Jakse M, Bohanec B, Harvey MJ. 2002. Genotypic and Environmental Effects on Gynogenic Haploid Induction in Onion. Meeting Abstract. Publisher: Faculty of Agriculture, Ain Shams University.
- [19] Szulc SV, Pedzinski M, Matuszak W, Majchrzak M, Rubik E. 2002. Gynogenesis Ability in Onion Breeding at Spojnia Ltd., Nochow. Number: 488, Pages: 323-331
- [20] Musial K, Bohanec B, Jakse M, Przwara L. 2005. The Development of Onion (*Allium cepa* L.) Embryo Sacs *in Vitro* and Gynogenesis Induction in Relation to Flower Size. *in vitro* Cell. Dev. Biol-Plant, 41: 446-452.
- [21] Javornik B, Bohanec B, Champion B. 1998. Second Cycle Gynogenesis in Onion (*Allium cepa* L.) and Genetic Analysis of The Plants. *Plant Breeding*, 117(3): 275-278.
- [22] Geoffriau E, Kahane R, Tanguy JM. 2006. Polyamines Are Involved in The Gynogenesis Process in Onion. *Physiologia Plantarum*, 127: 119-129.
- [23] Forodi BR, Hassandokht M, Kashi A, Sepahvand N. 2009. Influence of Spermidine on Haploid Plant Production in Iranian Onion (*Allium cepa* L.) Populations Through *in vitro* Culture. *Horticulture Environment and Biotechnology*, Vol: 50(5): 461-466.
- [24] Bohanec B, Jakse M, Javornik B. 2001. Present Status of Haploid Induction in Onion: Analysis of Procedure and Its Limitations. *Acta Horticulturae (ISHS)* 555:91-98: II International Symposium on Edible Alliaceae.
- [25] Musial K, Bohanec B, Przywara L. 2001. Embryological Study on Gynogenesis in Onion (*Allium cepa* L.). *Sex Plant Report*, 13: 335-341.
- [26] Bicknell RA, Koltunow AM. 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums, *The Plant Cell*, vol: 16, pp: 228-245.
- [27] Kurtar ES. 1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embryo Uyarımı ve Bitki Oluşturma Üzerinde Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- [28] Bohanec B. 2009. Doubled Haploids via Gynogenesis. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Ed.: Touraev vd., Springer Science Business Media B.V., Page: 35-46.
- [29] Chen JF, Cui L, Malik AA, Mbira KG. 2011. *In vitro* Haploid and Dihaploid Production Via Unfertilized Ovule Culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Volume: 104, Pages: 311-319.
- [30] Forster BP, Bors EH, Kasha KJ, Touraev A. 2007. The Resurgence of Haploids in Higher Plants. *Trends in Plant Science*, vol: 12(8): 368-375.
- [31] Champion B, Alloni C. 1990. Induction of Haploid Plants In Onion (*Allium cepa* L.) by *In Vitro* Culture of Unpollinated Ovules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 1-6.
- [32] Alan AR, Mutschler MA, Brants A, Cobb E, Earle ED. 2003. Production of Gynogenic Plants From Hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn, *Plant Science* Volume 165(6): 1201-1211.
- [33] Özzambak E. 1992. Pırasada Ovaryum ve Polen Kültürü. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitk. Kong., Bild., 13-16 Ekim 1992, İzmir. Cilt 11: 223-236.
- [34] Martinez LE, Agüero CB, Galmarini CR. 1997. Obtention of Haploid Plants by Ovaries and Ovules Culture in Onion (*Allium cepa* L.). I. International Symposium on Edible Alliaceae. *Acta Hort. (ISHS)* 433: 447-454.
- [35] Martinez LE, Agüero CB, Lopez ME, Galmarini CR. 2000. Improvement of *In Vitro* Gynogenesis Induction in Onion (*Allium cepa* L.) Using Polyamines. *Plant Science* 156(2): 221-226.
- [36] Sulistyarningsih E, Yamashita K, Tashiro Y. 2002. Haploid Induction From F1 Hybrids Between CMS Shallot

With *Allium galanthum* Cytoplasm and Common Onion by Unpollinated Flower Culture. *Euphytica* 125: 139-144.

[37] Judkeviciene D, Stanys V, Bobinas E. 2005. Gynogenesis Peculiarities of *Allium L.* Vegetables Grown in Lithuania. *Bologija*. No:3, P: 6-9.

[38] Cho KS, Hong SY, Yun BY, Kwon YS, Huh EJ. 2006. Production and Analysis of Doubled Haploid Lines in Long-Day Onion (*Allium cepa*) Through *In Vitro* Gynogenesis. *Hort Environ. Biotechnol.* 47(3): 110-116.

[39] Souri NA, Hassandokht MR, Peyvast GHA. 2007. Effect of Different Sugars on *in vitro* Haploid Plants Production of Iranian Onion Landraces (*Allium cepa L.*). *Iranian Journal of Agricultural Science*, 38(3): 459-465.

[40] Sauton A. 1988. Effect of Season and Genotype on Gynogenetic Haploid Production in Muskmelon, *Cucumis melo L.* *Scienta Horticulturae*, Vol. 35(1): 71-75.

[41] Bal U, Abak K. 2003. Attempts of Haploidy Induction in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Via Gynogenesis II: *In vitro* Non-fertilized Ovary Culture. *Pakistan Journal of Biological Sci.* 6 (8): 750-755.

[42] Muren R. 1989. Haploid Plant Induction From Unpollinated Ovaries in Onion. *HortScience* 24(5): 833-834.

[43] Alan AR, Brants A, Cobb E, Goldschmied A, Mutschler MA, Earle ED. 2004. Fecund Gynogenic Lines From Onion (*Allium cepa L.*) Breeding Materials. *Plant Science*, Volume: 167(5): 1055-1066.

[44] Zhang S, Xie Z, Yuan YU, Zhang Y, Cheng LI. 2005. Study of Colchicines to Induce Polyploid on Onion in Tissue Culture. *Biotechnology* 04. The Key Laboratory of Crop Biology of Shandong, Tai'an 271018, ISSN: 1004-311X, China.

[45] Jakse M, Harvey MJ, Bohanec B. 2003. Chromosome Doubling Procedures of Onion (*Allium cepa L.*) Gynogenic Embryos. *Plant Cell Reports*, Volume: 21(9): 905-910.

[46] Campion B, Perri E, Azzimonti MT, Vicini E, Schiavi, M. 1995. Spontaneous and Induced Chromosome Doubling in Gynogenic Lines of Onion (*Allium cepa L.*). *Plant Breeding*, Volume: 114 Issue 3, Pages: 243 - 246.

[47] Grzebelus E. and Adamus, A. 2004. Effect of Anti-Mitotic Agents on Development and Genome Doubling of Gynogenic Onion (*Allium cepa L.*) Embryos. *Plant Science* 167: 569-574.

[48] Jakse M, Bohanec B. 1994. Effect of media Composition on Gynogenesis of Onion Cultivars. *Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture*, Javornik, B.Bohanec, B.Kreft, I. (eds.).- Ljubljana (Slovenia), Nov 1994. P: 35-41.

[49] Michalik B, Adamusa A, Nowak E. 2003. Gynogenesis in Polish Onion Cultivars: Gametic Embryogenesis. *Plant Science*, vol: 165(6): 1201-1211.

[50] Campion B, Azzimonti MT, Vicini E, Schiavi M, Falavigna A. 1992. Advances in Haploid Plant Induction in Onion (*Allium cepa L.*) *In Vitro* Gynogenesis. *Plant Science*, vol: 86(1): 97-104.

[51] Ponce M, Martinez L, Galmarini C. 2006. Influence of CCC, Putresine and Gellan Gum Concentration on Gynogenic Embryo Induction in *Allium cepa*. *Biologia Plantarum*, 50(3): 425-428.

[52] Umehara M, Sueyoshi T, Shimmomura K, Nakahara T. 2006. Production of Interspecific Hybrids Between *Allium fistulosum L.* And *A. macrostemon Bunge* Through Ovary Culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 87: 297-304.

[53] George EF, Hall MA, Klerk GJ. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II. Organic Additions, Osmotic and pH Effects and Support Systems. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Chapter 4. P: 115-173.