TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Leucojum aestivum L.' DA SİTOLOJİK ve SİTOEMBRİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Nuran EKİCİ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Danışman: Doç. Dr. Feruzan DANE

EDİRNE-2006

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Leucojum aestivum L.' DA SİTOLOJİK ve SİTOEMBRİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Nuran EKİCİ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Danışman: Doç. Dr. Feruzan DANE

2006
EDİRNE

ÖZET

Tezin cinsi : Doktora
Tezin adı : *Leucojum aestivum* L.' da sitolojik ve sitoembriyolojik çalışmalar
Üniversite : Trakya Üniversitesi
Enstitü : Fen Bilimleri
Anabilim dalı : Biyoloji
Programı : Hücre Biyolojisi

Bu araştırmada Edirne – Tavuk Ormanı'nda doğal olarak yetişen *Leucojum aestivum* L. sitolojik ve sitoembriyolojik yönden ışık, floresans ve transmisyon elektron mikroskopi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. *L. aestivum*'un kromozom sayısı 2n=22'dir. Anterler tetrasporangiattır. Anter çeperi epidermis, endotesyum, ara tabaka ile salgı tapetumundan oluşur. Tapetum hücrelerinde, normal mitoz bölünme, sekonder nukleus bölünmeleri ve nukleus birleşmeleri saptanmıştır. Mikrosporogenez ve polen mitozu genellikle düzenlidir. Olgun polen taneleri 2 hücrelidir. Polen sterilitesi %1.7 ve polen tanelerinin *in vitro* ortamdaki çimlenme oranı %73'tür. Olgun anter çeper hücrelerinin polisakkarit içeriği daha zengindir. RNA içeriği ise anter çeper hücreleri ve mikrosporların gelişim evrelerine göre farklılık göstermektedir. TEM ile yapılan incelemelerde mikrosporogenezin ve polen mitozunun erken evrelerinde PAH'inde ve mikrosporlarda organel içeriği yönünden polar bir dağılım görülmüştür. Profaz I evresinde PAH'leri arasında sitoplazmik kanallar gözlenmiştir. Tetrad evresinde tapetumda aktif sekresyon yapılır ve tapetum dejenere olmaya başlar. *L. aestivum*'un ovulleri anatrop, bitegmik ve krassinusellat tiptedir. Mikropil iç integümentten oluşur. Arkespor hücresi doğrudan megaspor ana hücresini verir. Embriyo kesesi gelişimi bisporik *Allium* tipindedir. Sinergid hücrelerinde filiform aparatus bulunur. Polar nukleuslar fertilizasyondan önce birleşerek sekonder nukleusu antipodlara yakın bölgede oluştururlar. *L. aestivum*' da megasporogenez evresindeki megasporangiyumda, polisakkaritler kalaza ve nusellus dokusu hücrelerinde, megagametogenez ve olgun megagametofit evresinde ise dış integüment ile kalaza hücrelerinde görülmüştür. Megasporogenez evresinde nusellus dokusu, megagametogenez evresinde iç integüment ve kalaza hücreleri, olgun embriyo kesesi evresinde ise kalaza hücrelerinin RNA içeriği bakımından diğer hücrelere göre daha zengin olduğu saptanmıştır.

2006, 145 sayfa

Anahtar kelimeler: *Leucojum aestivum*, Amaryllidaceae, mikrosporogenez, mikrogametogenez, megasporogenez, megagametogenez

SUMMARY

Type of thesis : PhD
Name of thesis: Cytological and cytoembryological studies in *Leucojum aestivum* L.
University : Trakya University
Institute : Science
Department : Biology
Program : Cell Biology

In this study, *Leucojum aestivum* L. which grows naturally in Edirne – Tavuk Forest has been investigated by using light, fluorescence and transmission electron microscopy methods in cytological and cytoembryological respects. Its chromosome number is 2n=22. Anthers are tetrasporangiate. Anther wall formed with an epidermis, endothecium, middle layer and glandular tapetum. Normal mitosis, secondary nucleus divisions and fusions were determined in tapetum cells. Microsporogenesis and pollen mitosis are generally regular. Mature pollen grains are 2-celled. Pollen sterility is 1.7% and germination ratio of pollen grains *in vitro* is 73%. Mature anther wall cells' polysaccharide content is more than immature ones. RNA content shows difference according to anther wall cells and microspores' developmental stages. During early stages of microsporogenesis and pollen mitosis, organelle contents of microspore mother cells (MMC) and microspores were shown polarity when they examined in TEM. Cytoplasmic channels were observed between MMC in prophase I. Active secretion is done in tapetum and tapetum begins to degenerate in tetrad stage. *L. aestivum*'s ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate type. Inner integument forms micropyle. Archesporial cell developed directly into a megasporocyte. Embryo sac development is bisporic *Allium* type. Filiform apparatus is observed in synergids. Polar nuclei fuse before fertilization to form secondary nucleus near the antipodals. Polysaccharides have been seen in chalazal and nucellar cells of megasporangium at megasporogenesis and in outer integument and chalazal cells at megagametogenesis and mature megagametophyte stages. Nucellar cells at megasporogenesis, inner integument and chalazal cells at megagametogenesis and chalazal cells at mature embryo sac phase contain more RNA than other cells.

2006, 145 Pages
Key words: *Leucojum aestivum,* Amaryllidaceae, microsporogenesis, microgametogenesis, megasporogenesis, megagametogenesis.

ÖNSÖZ

Bitkilerde embriyolojik olayların sitolojik açıdan incelenmesi 17. yüzyılda mikroskobun keşfi ile başlamış ve döllenme olayları ancak 19. yüzyılın ortalarında açıklanabilmiştir. Son yıllarda ise bitki embriyolojisi ile ilgili çalışmalarda ışık mikroskobunun yanında elektron mikroskobu ve floresans mikroskobu kullanılarak çok daha detaylı ve değerli bilgilere ulaşılmıştır. Bu tip çalışmalar oldukça güç ve zahmetli olduğu gibi çalışmalardan elde edilen bilgiler de oldukça değerlidir. Embriyolojik özelliklerden, bitki taksonomisinde faydalanılmaktadır. Birçok familya ile ilgili embriyolojik çalışma yapılmamış, yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçların ise yeterli olmadığı görülmüştür.

Amaryllidaceae familyasının birçok embriyolojik özellikleri çalışma materyallerinin elde edilmesindeki güçlükler nedeniyle az sayıdaki türden elde edilmiştir. Günümüzde ise bu embriyolojik özelliklerin birçoğu tartışmalıdır. Amaryllidaceae familyasındaki taksonların gerçek kategorilerini bulmak için bu taksonlar üzerinde yapılan morfolojik, anatomik, sitolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki çalışmalar halen devam etmektedir. *Leucojum aestivum* L.'un bazı sitolojik ve sitoembriyolojik özelliklerinin saptanmasıyla Amaryllidaceae familyasının taksonomik problemlerinin çözümüne katkı sağlayacağımıza inanmaktayız. Ayrıca bu çalışmanın bitki embriyolojisinde üzerinde çok çalışılmamış olan anter çeperinin fonksiyonları ve polarite üzerindeki çalışmalara da katkı sağlayacağını ümit ederiz.

Bu tez konusunun seçiminde ve tezin hazırlanışında bana yardımcı olan, çok değerli fikirlerini benimle paylaşarak bilimsel çalışmalarımdaki ilgi alanımı sitoembriyolojiye yönelten ve bu konuda çalışmak için beni teşvik eden, doktora eğitimim boyunca değerli görüş, eleştiri ve düşüncelerinden yararlandığım Genel Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Feruzan DANE'ye, doktora ders ve tez aşamamda büyük desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, değerli eleştirileriyle çalışmalarımı yönlendiren ve Bölüm Başkanlığı sırasında Biyoloji Bölümü'nün araştırma laboratuvarlarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan, çalışmalarım sırasında Botanik Anabilim Dalı Başkanı olan

değerli hocam Prof. Dr. Göksel OLGUN'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Ayrıca tez önerimin ve çalışmalarımın değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Kimya Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halide AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Elektron mikroskobu çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam rahmetli Prof. Dr. Müberra UYGUN'a, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet KANTER'e, değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Yeşim UZ'a, Yrd. Doç. Dr. Gülnur KIZILAY'a, Araş. Gör. Meryem AKPOLAT'a, Tıbbi Laborant Zeliha POYRAZ'a, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi hocam Sayın Doç. Dr. Gülara HÜSEYİNOVA'ya, Genel Biyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Fulya Dilek GÖKALP MURANLI'ya, floresans mikroskobu çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Çetin ALGÜNEŞ'e, Doç. Dr. Gökay BOZKURT'a, Yrd. Doç. Dr. Funda PALA'ya, laboratuvar ve fotomikroskop ile ilgili çalışmalarımda bana destek olan Botanik Anabilim Dalı Öğretim üyesi, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Çiler MERİÇ ve Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA'ya, makro fotoğraf çekimlerimde bana yardımcı olan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Zuhal OKYAR ve Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN'a teşekkür ederim. Ayrıca sevgi, destek ve emekleri için aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu doktora tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri TÜBAP-723 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET……... I
SUMMARY……... II
ÖNSÖZ……..…..… III
İÇİNDEKİLER……...……...… V
SİMGELER……...…….. VII
1. GİRİŞ……...… 1
2. KURAMSAL TEMELLER……... 6
2.1. Amaryllidaceae Familyasının Genel Özellikleri……..…….. 6
2.2. *Leucojum* Cinsinin Genel Özellikleri…….……. 6
2.3. *Leucojum aestivum* L.'un Taksonomideki Yeri……..……... 8
2.4. *Leucojum aestivum* L.'un Morfolojik Özellikleri…….…….. 9
2.5. *Leucojum aestivum* L.'un Anatomik Özellikleri…….……. 10
2.6. *Leucojum aestivum* L.'un Karyolojik Özellikleri…….…… 11
2.7. *Leucojum aestivum* L.'un Yöresel Olarak Kullanılan İsimleri…….…… 12
2.8. *Lecojum aestivum* L.'un Dünya Üzerindeki Yayılışı……...… 12
2.9. *Lecojum aestivum* L.'un Türkiye'deki Yayılışı…….……...… 12
2.10. *Leucojum aestivum* L.'un Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri……...….... 14
3. MATERYAL ve METOD…… 18
3.1. Deney Materyallerinin Eldesi…….…….……...… 18
3.2. Işık Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler…….…….... 19
3.2.1. Kök Ucu Hücrelerinde Karyotip Analizi…….…….. 19
3.2.2. Andrekeumun İncelenmesi…….……... 20
3.2.3. Anter Çeperi ve Mikrosporogenezin Çeşitli Evrelerinin İncelenmesi…….…..…… 20
3.2.4. Tapetum Hücrelerindeki Bölünme Tiplerinin İncelenmesi…….…...… 21
3.2.5. Mikrosporogenezin ve Polen Mitozunun İncelenmesi…….…..… 22
3.2.6. Polen Canlılığının İncelenmesi…….…….…… 22
3.2.7. Mikrogametofit Gelişiminin İncelenmesi…….…….…… 23
3.2.8. Ginekeumun İncelenmesi…….…..…… 24
3.2.9. Megasporangiyum Gelişiminin İncelenmesi…….…… 24
3.2.10. Megasporogenez ve Megagametogenezin İncelenmesi…….…….…… 24
3.2.11. Temizleme Tekniği ile Embriyo Keselerinin İncelenmesi…….…… 25

3.3. Floresans Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler……..…… 26
3.3.1. Polen Canlılığı ve Mikrogametofitin İncelenmesi…….……..… 26
3.4. Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler…….……...… 26
3.4.1. Farklı Gelişim Evrelerinde Anter Çeperi ve Mikrosporların İnce Yapısının İncelenmesi……..… 26
3.5. Preperasyonda Kullanılan Bazı Boya ve Çözeltilerin Hazırlanışı…….…… 27
4. BULGULAR…….…. 33
4.1. *Leucojum aestivum* L.'un Karyolojik Özellikleri……..… 33
4.2. *Leucojum aestivum* L.'un Embriyolojik Özellikleri…… 34
4.2.1. Andrekeum…….……...… 34
4.2.1.1. Anter Çeperi……... 34
4.2.1.2. Anter Çeperinin Mikrosporogenezin Çeşitli Evrelerinde Histokimyasal Özellikleri…….....… 37
4.2.1.3. Tapetum Hücrelerindeki Bölünme Tipleri…….…… 44
4.2.1.3.1. Normal Mitoz Bölünme…….……...… 44
4.2.1.3.2. Sekonder Nukleus Bölünmeleri ve Birleşmeleri…….....… 45
4.2.1.3.3. Tapetum Hücrelerinde Görülen Anormallikler…….…..… 47
4.2.1.4. Mikrosporogenez…….…...… 48
4.2.1.5. Polen Mitozu……..… 55
4.2.1.6. Polen Canlılığı…….……...… 58
4.2.1.7. Mikrogametofit Gelişimi…….……... 59
4.2.1.8. Farklı Gelişim Evrelerinde Anter Çeperinin ve Sporogen Dokunun İnce Yapısı..... 65
4.2.2. Ginekeum……..… 80
4.2.2.1. Megasporangiyum Gelişimi……...… 81
4.2.2.2. Megasporogenez…….…… 81
4.2.2.3.Megagametogenez…….…..… 83
4.2.2.4. Olgun Embriyo Kesesi…….…….. 83
5. TARTIŞMA ve SONUÇ…….... 115
6. KAYNAKLAR…….…… 132
7. ÖZGEÇMİŞ…….…… 143

SİMGELER

A:	Antipod
am:	Aktif megaspor
at:	Ara tabaka
D:	Diktiyozom
di:	Dış integüment
Di:	Diad
ek:	Embriyo kesesi
ekz:	Ekzin
end:	Endotesyum
ep:	Epidermis
ER:	Endoplazmik retikulum
euk:	Eukromatin
F:	Filiform aparatus
f:	Funikulus
fk:	Fibrilsi kalınlaşma
fp:	Fertil polen
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
gh:	Generatif hücre
gn:	Generatif nukleus
H:	Hipostase
HÇ:	Hücre çeperi
htk:	Heterokromatin
id:	İletim demeti
ii:	İç integüment
int:	İntin
K:	Kalaza
ka:	Kalloz
kat:	Kalloz tıpa
kd:	Konnektif doku
km:	Körelen megaspor
ku:	Kutikula
L:	Lipid

M:	Mikropil
MAH:	Megaspor ana hücresi
MH:	Merkezi hücre
Mkt:	Mikrotübül
ms:	Mikrospor
Mt:	Mitokondri
N:	Nukleus
ne:	Nusellar epidermis
Ni:	Nişasta
NP:	Nukleus poru
Nu:	Nukleolus
nus:	Nusellus
ol:	Orta lamel
oç:	Ovaryum çeperi
ov:	Ovul
P:	Plastid
p:	Polen
PAH:	Polen ana hücresi
PN:	Polar nukleus
rb:	Ribozom
S:	Sinergid
sd:	Sporogen doku
sh:	Sperm hücresi
Sl:	Salgı
sn:	Sperm nukleusu
SN:	Sekonder nukleus
sp:	Steril polen
ta:	Tapetum
t:	Tetrad
Ub:	Ubish granülü
V:	Vakuol
vh:	Vegetatif hücre
vn:	Vegetatif nukleus
vs:	Vesikül
YH:	Yumurta hücresi

1. GİRİŞ

Son kayıtlara göre Amaryllidaceae familyasının dünyada 60 cinsi ve 800 türü vardır (Watson ve Dallwitz, 2005). *Leucojum* L. cinsi Türkiye'de tek tür olan *Leucojum aestivum* subsp. *pulchellum* ile temsil edilmektedir. Bu tür Türkiye'de 8 ilde ve bu illerin az sayıdaki lokalitelerinde yayılış göstermektedir (Davis, 1984). Çalışma materyalimiz Trakya Bölgesi'nde sadece Edirne-Tavuk Ormanı'nda bulunan populasyonu kapsamaktadır.

Bitki taksonomisinde son 15-20 yıl öncesine kadar sadece morfolojik, embriyolojik, biyokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yeni yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan en günceli moleküler genetikte kullanılan DNA dizi analizi yöntemidir. 1999 yılında Meerow vd. tarafından yapılan bir çalışmada Amaryllidaceae (48 cins) ve Asparagalean (29 cins) familyalarından (Agapanthaceae, Hyacinthaceae, Themidaceae, Anthericaceae, Behniaceae, Alliaceae, Convallariaceae, Laxmanniaceae ve Hemerocallidaceae) bazı bitkilerin morfolojik özelliklerinin yanında plastid DNA'larındaki rbcL & trnL-F dizileri karşılaştırılarak akrabalık derecesi araştırılmıştır. Meerow vd.'nin (1999) yaptığı bu çalışmada Amaryllidaceae ve Agapanthaceae'nin kardeş familyalar olduğu, Alliaceae familyasının da Amaryllidaceae/Agapantus kladıyla akraba olduğu açıklanmıştır. Amaryllidaceae familyasının Avrupa-Asya elementleri ile Amerikan cinslerinin monofiletik kardeş kladlar olduğu ve *Leucojum* L. ile *Galanthus* L.'un kardeş cinsler olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla saptanmıştır.

Ito vd. (2005) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, Amaryllidaceae familyasına ait 31 cinsin 44 türünde ve Asparagales'ten 10 familya ile dışarıdan 3 farklı cins *Acorus* L., *Gagea* Salisb. (Liliaceae) ve *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae)'da kloroplast genomunda yer alan ve rbcL genine göre evrimleşme hızı daha yüksek olan matK geninin dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla Amaryllidaceae familyasının Asparagales içindeki yeri ve akrabalık ilişkisi tam açıklanamamıştır. Fakat hem Meerow vd. (1999) hem Ito vd.'nin (2005) yaptığı

çalışmaların ortak sonucuna göre Amaryllidaceae familyasının orijini Afrika kıtasıdır ve günümüzde yetiştiği alanlara Afrika kıtasından yayılmıştır. Amaryllidaceae familyasının taksonomik problemlerinin çözümünde moleküler yöntemler kullanılmasına rağmen olumlu sonuçlara halen ulaşılamamıştır (Meerow vd. 1999, Ito vd. 2005).

Amaryllidaceae familyasının cinslerinde morfolojik ve anatomik özellikler arasında farklılıklar saptanmıştır. Bu nedenle halen takson değişiklikleri yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre morfolojik ve anatomik özellikler göz önüne alınarak alt familyalar gözden geçirilmiş ve Brunsvigiaceae Horan., Cepaceae Salisb.(?), Cyrtanthaceae Salisb., Galanthaceae Salisb., Gethyllidaceae Rafin., Operantheae (Operanthaceae) Salisb., Leucojaceae Batsch & Borkhausen, Strumariaceae Salisb., Zephyranthaceae Salisb. alt familyaları Amaryllidaceae familyasına dahil edilmiş fakat Doryanthaceae ve Hypoxidaceae alt familyaları ise bu familyadan çıkarılmıştır (Watson ve Dallwitz, 2005).

Amaryllidaceae familyası ile yapılan embriyolojik çalışmalar ise genellikle bütün cinslerde eksiktir. Bunun nedeni bu familyaya ait bitkilerin erkek ve dişi gametofitlerinin erken gelişim evrelerini toprak altında geçirmesidir. Bu familyaya ait embriyolojik özellikler sınırlı sayıdaki türle yapılmış çalışmalardan elde edilmiştir ve familyanın birçok özelliği tartışmalıdır. Anter çeperlerinde genellikle salgı tapetumu görülmekle birlikte bazı türlerde ameboid tapetum da saptanmıştır. Bu familyanın cinslerinde hem *Allium* tip hem de *Polygonum* tip embriyo kesesi gözlenmiştir (Davis, 1966). Son kayıtlarda ise *Endymion* tip embriyo kesesinin (Dane, 1999a) de görüldüğü saptanmıştır. Tohum taslakları genellikle bitegmik, nadiren unitegmik veya ategmiktir. Bazı türlerde antipod hücrelerinde sekonder bölünmeler görülürken bazılarında ise görülmemiştir. Antipod hücreleri efemer veya kalıcı olabilir (Watson ve Dallwitz, 2005). Hipostase ve obturator bazı türlerde bulunduğu halde bazılarında saptanmamıştır. Bazı türlerde endospermanın nuklear tipte (Davis, 1966) bazılarında ise hellobial tipte (Dane, 1999a) olduğu gözlenmiştir.

Amaryllidaceae familyasına ait cinslerle ilgili karyolojik çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu familyaya ait cinslerin taban kromozom sayıları x=6 ile x=23 arasında değişmektedir. Taban kromozom sayıları bazı cinslerde (*Zephyranthes* x=6, *Amaryllis, Clivia, Crinum, Cyrtanthus, Griffinia*, *Habranthus*, *Hippeastrum*, *Pancratium*, *Sternbergia*'da x=11, *Vallota* ve *Haemanthus*'da x=8, *Hymenocallis*'de x=23) kararlı olduğu halde bazı cinslerde (*Galanthus*'ta x=7, 12 *Narcissus*'ta x=7, 11 ve *Nerine*'de x=11, 12) ise değişkendir. Amaryllidaceae famiyasının en kararsız taban kromozomuna sahip cinslerinin ise *Leucojum* (x=7, 8, 9, 11) ve *Lycoris* (x=6, 9, 11) olduğu saptanmıştır (Darlington ve Ammal, 1945).

L. aestivum, sistematik (Davis, 1984), morfolojik, anatomik (Kutbay vd., 1993), karyolojik (La Cour 1931, Neves 1939, Kanısanlı 1974, Corriras vd. 1984, Dalgıç ve Başak 1996, Özhatay 2002) otoekolojik (Kutbay ve Kılınç, 1993), farmakolojik (Dal Bianco vd. 1991, Kutbay vd. 1994, Şener 1994, Şener vd. 2003) ve biyokimyasal (Eichhorn vd. 1998, Gussev vd. 2003) yönden araştırılmıştır. Çakıcı vd. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada *Pancratium maritimum* L., *Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* ve *L. aestivum*'un soğanlarından elde edilen etanolik ekstraktların ağrı kesici olarak etkileri incelenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar bu bitkinin farmakolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Amaryllidaceae familyasının bazı türlerinden elde edilen bir çeşit alkoloid olan galanthaminin *L. aestivum*'da varlığı araştırılmış ve bu maddenin ara metabolitlerinin özellikle ovaryum duvarı, çiçek sapı ve tepalde yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır (Eichhorn vd., 1998). Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç hammaddelerinden biri olan galanthamin özellikle Alzheimer sendromunun tedavisinde pozitif etki göstermektedir (Dal Bianco vd., 1991). Galanthamin elde edilmesi zor ve ekonomik olmadığı için yapılan çalışmalar bu maddenin biyosentez yollarının araştırılması yönünde olmuştur (Eichhorn vd. 1998, Gussev vd. 2003). 2001 yılında yapılan bir başka çalışmada ise Shen ve arkadaşları, pentoz fosfat yolunun ara metabolitlerinden biri olan selidonik asidin biyosentezini bu bitkinin hücre süspansiyon kültürlerinde araştırmışlardır.

Ülkemizde de *L. aestivum* ile morfolojik, anatomik (Kutbay vd., 1993), otoekolojik çalışmalar (Kutbay ve Kılınç, 1993) ile galanthamin üzerinde yoğunlaşan biyokimyasal ve medikal araştırmalar yapılmıştır (Kutbay vd. 1994, Şener 1994, Şener vd. 2003). İçerdiği alkoloidler ile ekonomik yönden önemli olan *L. aestivum*'u koruma altına almak amacıyla, 9 Ekim 1991 tarihli ve 21016 sayılı Resmi Gazete'de bir kararname yayınlanmış ve bu bitkinin toplanması yasaklanmıştır (Kutbay vd.,1994).

L. aestivum ile ilgili embriyolojik çalışmalar oldukça azdır. Tomurcuklar toprak altında yapraksı bir kın içinde gelişmektedir. Pedisel ancak çiçeklenme evresinde görülmektedir. Pedinkul yapraksı bir kın şeklindedir. Erken evreleri içeren tomurcuklar soğanın içinde gömülüdür. Bize göre, araştırmacıların bu evreleri içeren materyali almalarındaki güçlükler nedeniyle bu konuda çalışılamamıştır. Sadece açmış çiçeklerde endosperma incelenmiş ve nuklear tip olduğu saptanmıştır (Davis, 1966). Yine endosperma hücrelerinde floresans mikroskobu ile iğ ipliklerini oluşturan tübülinler antikorlarla işaretlenerek incelenmiştir (Franke vd., 1977).

İnce yapı çalışmaları genellikle dişi gametofit üzerinde yoğunlaşmıştır. *Zea mays*'da (Diboll ve Larson, 1966), *Petunia hybrida* klon W 166k'da (Van Went, 1970), *Oenothera erythrosepala*'da (Jalouzot, 1979), *Penstemon gentianoides* Poir.'de (Olgun, 1981), bazı çiçekli bitkilerde (Kapil ve Bhatnagar, 1981), *Crepis tectorum, Epilobium hirsutum* L.*, Peperomia blanda*'da (Bannikova vd., 1987), *Plumbago zeylanica* (*Plumbaginaceae*)'da (Huang vd., 1990), *Passiflora caerulea* L. (*Passifloraceae*)'da (Garcia vd., 2003) embriyo kesesinin ince yapısı incelenmiştir. *Plumbago capensis* Thunb.'de yumurta hücresinde filiform apparatusun (Cass, 1972), *Plumbago zeylanica*'da yumurta hücresinin (Cass ve Karas, 1974), *Gossypium hirsutum* L.'da ise erken endosperma gelişimi ile sinergid hücrelerinin (Jensen vd., 1977) ince yapısı araştırılmıştır. *Capsella bursa pastoris* (L.) Medik.'de yumurta, zigot ve genç embriyo (Schulz ve Jensen, 1968), suspensor ve bazal hücrenin (Schulz ve Jensen, 1969), *Paeonia tenuifolia* L.'da integümentlerin (Olgun ve Dane 1993, 1994, Dane ve Olgun, 1998**)** ince yapısı incelenmiştir. Ayrıca *Arabidopsis thaliana* L.'da megasporogenez (Bajon vd., 1999) ve *Zea mays*'da (Huang ve Sheridan, 1994) dişi gametofit gelişimi sırasında embriyo kesesinde görülen polarite ultrastrüktürel düzeyde araştırılmıştır.

Erkek gametofit üzerindeki histokimyasal ve ince yapı düzeyindeki çalışmalar daha çok tapetum tabakası ile mikrospor ilişkisi üzerinde yoğunlaşmasına rağmen oldukça azdır. Bu konuda *Helleborus feotidus* L. (Echlin ve Godwin, 1968), *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (Gramineae) (Christensen vd., 1972), *Solanum nigrum* Linn. (Bhandari ve Sharma, 1987), *Malvaceae* (Kudlicka ve Rodkiewicz, 1990), *Carica papaya* (Sheel ve Bhandari, 1990) üzerinde yapılmış çalışmalara rastlanmıştır.

Süs bitkisi olarak bahçe düzenlenmesinde kullanılan, tıbbi ve farmakolojik açıdan oldukça değerli bir bitki olduğu anlaşılan ve Türkiye'deki habitatları çarpık kentleşmenin yanısıra çevre kirliliğinden dolayı yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan *L. aestivum* bitkisinin embriyolojik özelliklerinin bilinmesi hem filogeni açısından hem de makromoleküler düzeyde hücre farklılaşmasına ışık tutması açışından oldukça önemlidir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilecek verilerle, Amaryllidaceae familyasının taksonomik özelliklerine katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Amaryllidaceae Familyasının Genel Özellikleri

Amaryllidaceae familyası, çok yıllık otsu bitkilerden oluşmaktadır. Tropikal bölgelerde özellikle Güney Amerika ve Afrika ile Akdeniz kıyılarında yayılış göstermektedir (Meerow, 2005). Daha çok soğanlı veya rizomlu bitkilerdir. Soğan ve rizom arasında geçiş formlarına sahip olan türleri de vardır (Davis, 1984). Yaprakları genellikle kış mevsiminde dökülür. Yaprakları yassı veya şeritsi, bazen etli veya sert ve liflidir. Çiçekler tek veya infloresans durumdadır. İnfloresans da kimoz, umbella veya başcık şeklinde, brakteler tek tek olduğu gibi involokrum şeklinde de olabilir. İnvolokral braktelerin sayısı 2, 8 veya daha fazla olabilir. Ayrıca serbest ve bitişik de olabilirler. Tepaller 3+3 olarak iki sıralı dizilmiş, 6 parçalı petaloid tiptedir. Renkleri yeşil, beyaz, krem, sarı, kırmızı, pembe, mor veya kahverengidir. Andrekeum 3, 6, 9 veya 18 stamenlidir. Genellikle 3+3 dizilişini gösterir. Staminod yoktur. Anterler genellikle versatil, nadiren bazifiks bazı türlerde ise dorsifikstir. Anterler, por ile ya da yarılarak açılır. Bazı türlerde nektaryumlar tepallerde bulunduğu halde bazı türlerde ginekeumda septumlarda bulunur. Ovaryum alt durumlu, sinkarp, 3 karpelli, 3 gözlü, ovul çok sayıdadır. Meyve lokulusit kapsül veya bakkadır (Dahlgren vd. 1985, Watson ve Dallwitz 2005).

2.2. *Leucojum* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Soğanlı, yapraksız gövdeli, çok yıllık bitkilerdir. Bütün yapraklar bazal ve lineardır. Çiçek durumu umbellat tiptir. Çiçekleri beyaz renkli, kampanulat tipte ve nodludur. Hipantial tüp ve korona bulunmaz. Periant segmentleri serbesttir, hepsi birbirine benzer ya da benzemeyebilir. Filamentler anterlerden daha kısadır. Anterler apikulat değildir. Kapsül subglobozdur. Tohumlar çok sayıdadır, strofiol bazen bulunur (Davis, 1984).

Amaryllidaceae familyasına ait *Leucojum* cinsinin türlerinin taksonomisi üzerinde uzun yıllar çalışılmıştır. 1945 yılında yayınlanmış olan Darlington ve Ammal'ın kromozom atlasında *Leucojum* cinsinin 7 türü kayıtlıdır. Bunlar, *Leucojum autumnale*, *L. trichophyllum, L. roseum, L. hymale, L. aestivum, L. pulchellum, L. vernum*'dur. Polunin'e (1987) göre Balkan yarımadasında *L. aestivum* ve *L. vernum* olmak üzere iki tür kayıtlıdır. Türkiye florasında (Davis, 1984) ise bu cins *L. aestivum* ile temsil edilmektedir.

Son yıllarda İngiltere'de Crellin (2005) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre *Leucojum* cinsi dünyada sadece iki türle temsil edilmektedir. Bunlar *L. aestivum* ve *L. vernum*'dur. *L. aestivum* Tablo 2.1'de görülen bazı morfolojik özellikleri ve çiçeklenme zamanı dikkate alınarak subsp. *aestivum* ve subsp. *pulchellum* olmak üzere iki alt türe ayrılmıştır. *L. vernum* ise var. *vagneri* ve var. *carpathicum* olmak üzere iki varyeteye ayrılmıştır. Diğer türler bu iki türün variyete ve alttürlerine dahil edilmiştir. Son gruplandırma şekli aşağıda verilmiştir (Crellin, 2005). Türkiye'de ve Trakya'da yayılış gösteren tür *L. aestivum* subsp. *pulchellum*'dur.

Eski isimleri	Yeni isimleri
Leucojum pulchellum	*Leucojum aestivum* subsp. *pulchellum*
Leucojum hernandezii	*Leucojum aestivum* subsp. *pulchellum*
Leucojum vagneri	*Leucojum vernum* var. *vagneri*
Leucojum carpathicum	*Leucojum vernum* var. *carpathicum*

Tablo 2.1. *L. aestivum*'un alttürlerinin ayırt edici özellikleri (Crellin, 2005).

	L. aestivum* L. subsp. *aestivum	***L. aestivum* L. subsp. *pulchellum***
Çiçek büyüklüğü	Büyük	Küçük
Çiçek sapı	Pürtüklü	Düz
Brakte (pulsu yaprak)	Geniş	Dar
Çiçeklenme zamanı	Ocak-Nisan	Mart-Mayıs
Meyve	Armut şeklinde	Küçük, oblong

2.3. *Leucojum aestivum* L. Syst. Nat. ed. 10, 2: 975 (1759). Ic: Bot. Mag. 30: t. 1210 (1809); Polunin, Fls. Europe t. 172 no. 1662 (1969). Taksonomideki Yeri

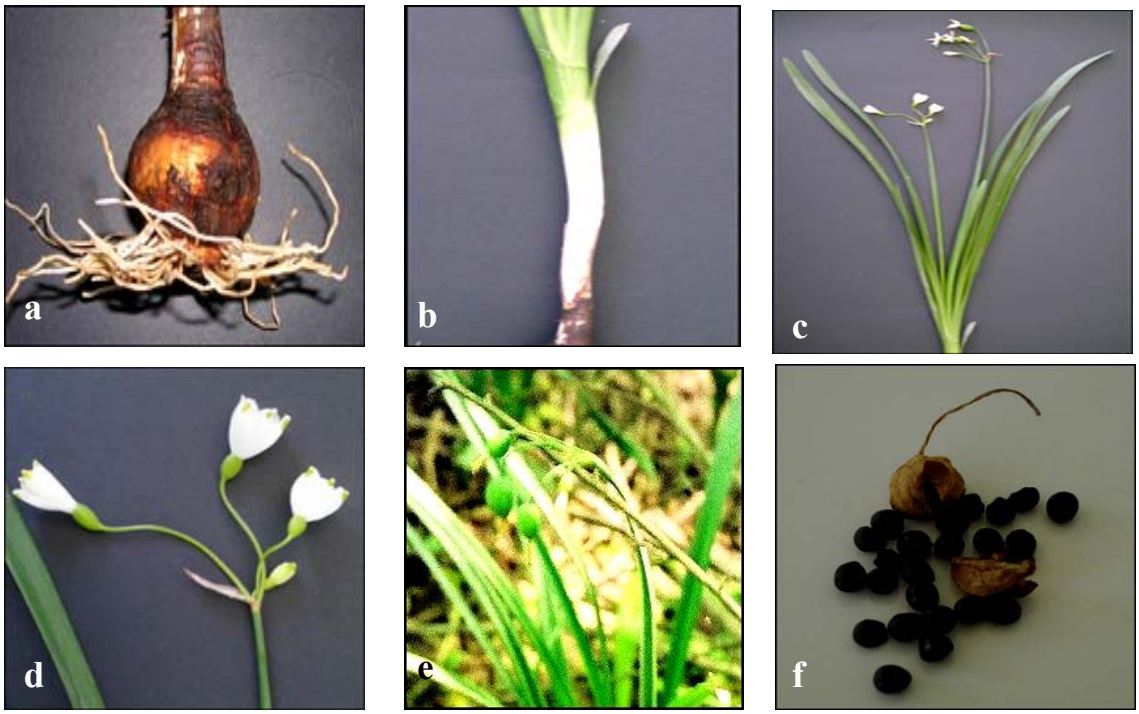
Filum: Tracheophyta
Bölüm: Spermatophyta
Alt bölüm: Angiospermae
Sınıf: Monocotyledoneae
Alt sınıf: Liliidae
Üst takım: Lilianae
Takım: Liliales
Familya: Amaryllidaceae
Cins: *Leucojum* Linnaeus
Tür: *Leucojum aestivum* L.
Alt tür: *L. aestivum* L. subsp. *pulchellum*



Şekil 2.1. *Leucojum aestivum* L.

2.4. *Leucojum aestivum* L.'un Morfolojik Özellikleri

Leucojum aestivum L. bazal ve linear yapraklı, nodlu, beyaz çiçeklere sahip, çok yıllık soğanlı bitkilerdir (Şekil 2.1). *L. aestivum*'un soğan çapı 18-45 mm arasındadır (Şekil 2.2a). Pedinkul kalın, içi boş bir yapıdır, iki kanadı vardır ve uzunluğu 25-60 cm arasındadır. Yapraklara eşit yada yapraklardan uzun olabilir (Şekil 2.2b). Yaprak sayısı 4 ile 6 arasında değişir. Yapraklar soğandan yukarı, dışa doğru büyür ve aşağı doğru kıvrılırlar. Yaprak uzunluğu 22-62 cm, genişliği ise 7-25mm arasındadır (Şekil 2.2c). Çiçek durumu umbellattır. Umbelladaki çiçek sayısı 2-5'tir. Çiçekler kampanulat ve eğik durumdadır. Her çiçeğin 6 adet tepali vardır ve hepsi birbirine benzer. Her tepalin ucunda yeşil renkli bir benek bulunur. Pedisel boyu 9-65 mm arasındadır, en uzunu brakteye eşit yada daha uzun olabilir (Şekil 2.2d). Spata uzunluğu 22-51mm, genişliği ise 3-8mm olup, valvlıdır. Meyvaları, içinde 2-8 adet tohum içeren lokulusid kapsül tipindedir (Şekil 2.2e). Tohumları siyah renkli ve çapları 5-8mm'dir (Şekil 2.2f) (Davis 1984, Kutbay vd. 1993).



Şekil 2.2. *Leucojum aestivum*'un kısımları: a, kök; b, gövde; c, yaprak; d, çiçek; e, meyva; f, tohum

L. aestivum soğanlarının yetiştirilmesi kolay ve zahmetsizdir. Güneş ışığını doğrudan alan ya da gölge yerlerde, çalı ve ağaçların altında yetiştirilebilir. *L. aestivum* nemli ortamda, suyu çeken, kil oranı yüksek, organik madde bakımından zengin toprakları sever (Kutbay ve Kılınç, 1993). Baharda çiçeklenme ve büyüme döneminde yetiştiği topraklar yeterince yağış alırsa, yaz kuraklığını tolere edebilir. Genellikle bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilirler (Christman, 2003).

2.5. *Leucojum aestivum* L.'un Anatomik Özellikleri

Leucojum aestivum' un anatomik özellikleri Kutbay vd. tarafından 1993 yılında bildirilmiştir.

Kökte epidermis, tek sıralı izodiyametrik hücrelerden meydana gelir. Epidermisin kalınlığı 10µm civarındadır. Korteks kısmındaki hücreler, genellikle eşit büyüklükte parankimatik ve silindir şeklindedir. Merkezi silindir, genellikle iki metaksilem içermektedir. Metaksilemin çapı 50µm'dur. Ksilem kollarının sayısı 4-5 arasında değişmektedir. Endodermis ve perisikl, çok belirgin şekilde ayrılmamakla birlikte merkezi silindirin dışında korteks hücrelerinden farklı iki tabaka vardır.

Gövdede dışta kalın bir kutikula tabakasına sahip ve silindir şeklindeki hücrelerden oluşmuş 25µm kalınlığında bir epidermis vardır. Korteks hücreleri, oval şekillidir ve çok sayıda nişasta tanesi içermektedir. Bu taneler genelde 15-25µm çapındadır. Skapus 30µm kalınlığında ve tek tabakalı bir epidermise sahiptir. Korteks hücreleri, çokgen şekillidir. Epidermisin altında ve korteksin orta kısımlarında hava boşlukları vardır. Yine korteks içinde iki sıra halinde dizilmiş iletim demetleri bulunmaktadır. Bunlardan epidermise doğru olanlar küçük (110µm uzunluğunda), merkeze doğru olanlar ise büyüktür (190µm). Merkez kısmı ise boştur.

Yaprağın alt ve üst epidermisinin kalınlıkları 25-30µm'dur. Yaprağın tüm kalınlığı ise 0.55mm'dir. Hem alt, hem üst epidermis kutikula içerir. Mezofilde palizat parankiması ve sünger parankiması ayrımı yoktur. Yaprak unifasiyaldir. İletim demetleri, mezofilin ortasında yer almaktadır. İletim demetlerinin ksilem kısmı geniş,

floem kısmı dardır. Mezofilde skapusta olduğu gibi hava boşlukları vardır. Yaprağın hem üst hem de alt yüzeyinde stoma bulunur. Yaprak amfistomatik tiptedir.

Meyva kapsül şeklindedir. Enine kesitte en dışta 30-40µm arasında değişen kalınlığa sahip bir epidermis vardır. Korteks kısmı parankimatik karakterli ve değişik büyüklükteki hücrelerden oluşmuştur. Korteks hücrelerinden epidermisin altında yer alanlar genellikle izodiyametrik iken merkeze yakın olanlar daha geniş ve çokgen şeklindedir. İletim demetlerinden epidermise yakın olanlar küçük, merkeze bakanlar ise daha büyüktür. İletim demetlerinin her ikisinde de ksilemin miktarı floeme göre çok fazladır.

Tohumda testa oldukça kalın olup hava dolu hücrelerden oluşmuştur. Dışta 50-60µm kalınlığında bir koruyucu tabaka bulunmaktadır. İçte ise 0.37mm kalınlığındaki endosperm tabakası bulunur (Kutbay vd., 1993).

2.6. *Leucojum aestivum* L.'un Karyolojik Özellikleri

Leucojum cinslerinin taban kromozom sayısı 7, 8, 9 ve 11 arasında değişmektedir (Darlington ve Ammal, 1945). *L. aestivum*'un kromozom sayısı ilk kez La Cour tarafından 1931 yılında 2n=24 olarak bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda *L. aestivum*'a ait kromozom sayısının La Cour (1931), Kanisanlı (1974), Corriras (1984) tarafından 2n=24 olduğu, Neves (1939), Dalgıç ve Başak (1996) tarafından 2n=22 ve Özhatay (2002) tarafından 2n =22, 24 olarak bildirilmiştir.

L. aestivum'un Dalgıç ve Başak (1996) tarafından yapılan karyotipine göre, 1. ve 2. kromozom çifti metasentrik, 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. kromozom çifti akrosentrik, 11. kromozom çifti ise submetasentriktir.

2.7. *Leucojum aestivum* L.'un Yöresel Olarak Kullanılan İsimleri

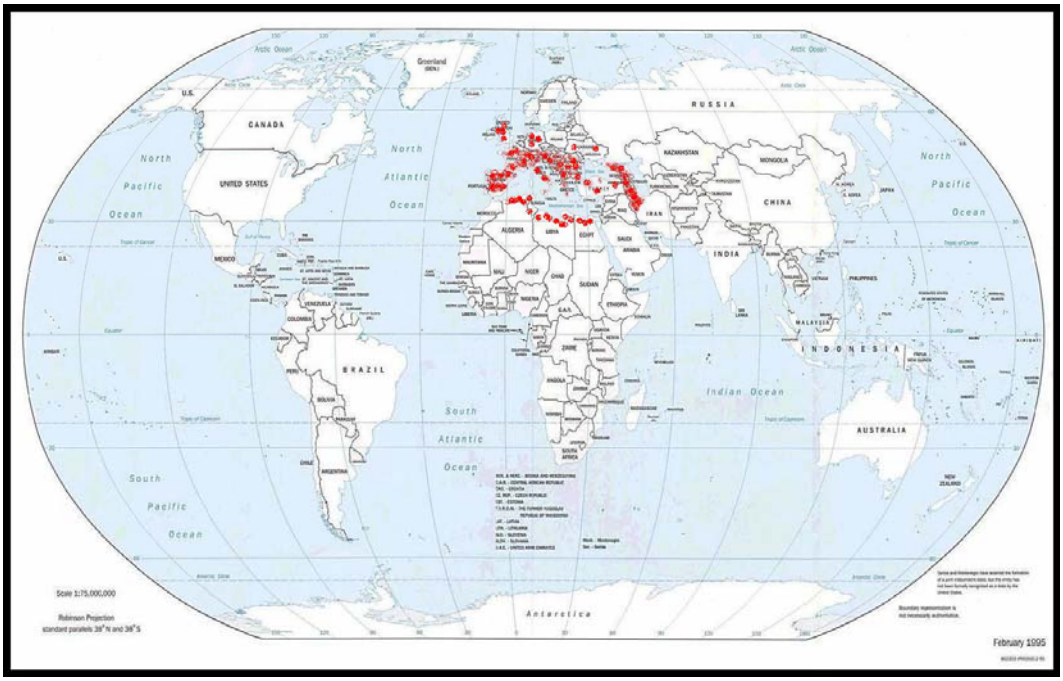
Leucojum ismi Yunanca' da beyaz menekşe anlamına gelir. *Leucojum aestivum* Türkiye'de halk arasında akçabardak, göl soğanı, çan çiçeği, sümbül, kabalak, sarıklı kökü gibi isimlerle adlandırılır (Kutbay vd., 1993). *L. aestivum* birçok ülkede yaz kardeleni olarak isimlendirilir. Bu şekilde isimlendirilmesinin nedeni kışın son zamanlarında veya baharın erken dönemlerinde nergislerle birlikte görülmeleridir. Yazın ortalarına doğru kaybolurlar. *L. aestivum* için İngiltere'de kullanılan diğer yaygın isimler; Loddon zambağı, Devon kardeleni, St Agnew çiçeği ve St George menekşesidir (Crellin, 2005).

2.8. *Lecojum aestivum* L.' un Dünya Üzerindeki Yayılışı

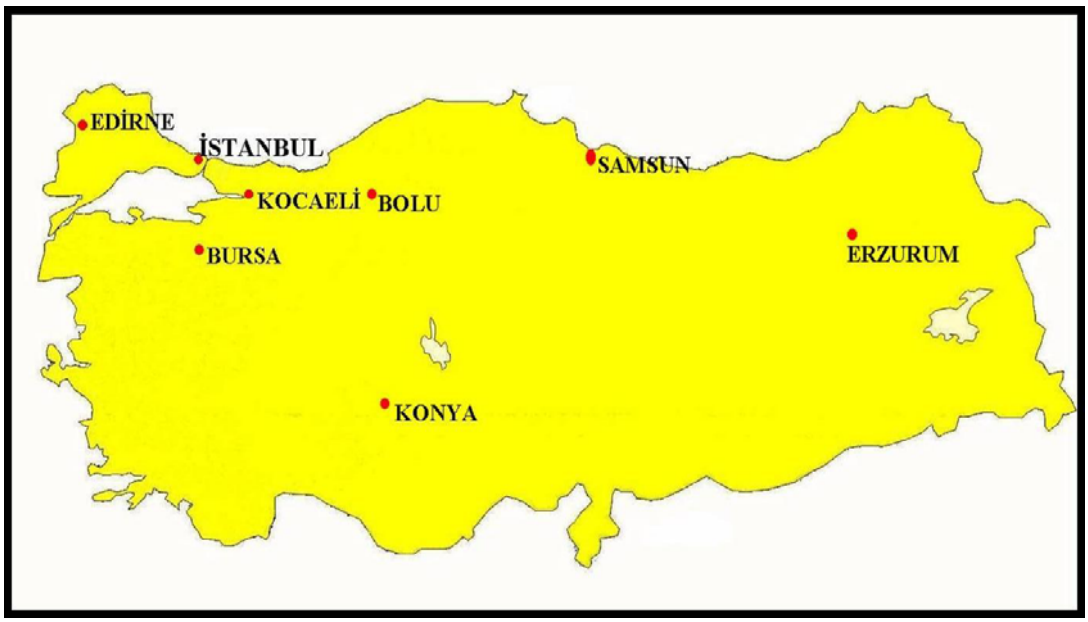
Lecojum aestivum dünyada doğal olarak Kuzey Afrika, Avrupa ve Güneybatı Asya ile Akdeniz kıyılarında yayılış gösterir (Şekil 2.3). Avrupa'da İrlanda, İngiltere, Hollanda, Belçika, Almanya, Fransa, İspanya, İsviçre, İtalya, Avusturya, Yugoslavya Arnavutluk, Macaristan, Romanya, Bulgaristan, Ukrayna, Türkiye, Asya'da İran, Rusya ve Ermenistan'da yetiştirilir (Darlington ve Ammal 1945, Crellin 2005).

2.9. *Lecojum aestivum* L.' un Türkiye'deki Yayılışı

Leucojum cinsi Türkiye'de tek tür olan *Leucojum aestivum* ile temsil edilir. Genellikle Türkiye'nin kuzeyinde yetişir. Türkiye'de A2(E) İstanbul: Terkos Köyü'nden, A2(A) Kocaeli: İzmit'ten, Bursa: Uluabat'ın 4 km güneyinden, A3 Bolu: Gerede'nin 26 km batısından, A6 Samsun: Samsun'dan, B3 Konya: Beyşehir'in 15 km güneyinden, B8 Erzurum: Erzurum'dan örnekleri toplanmıştır (Şekil 2.4) (Davis, 1984).



Şekil 2.3. *Leucojum aestivum* L.'un Dünya üzerindeki dağılımı



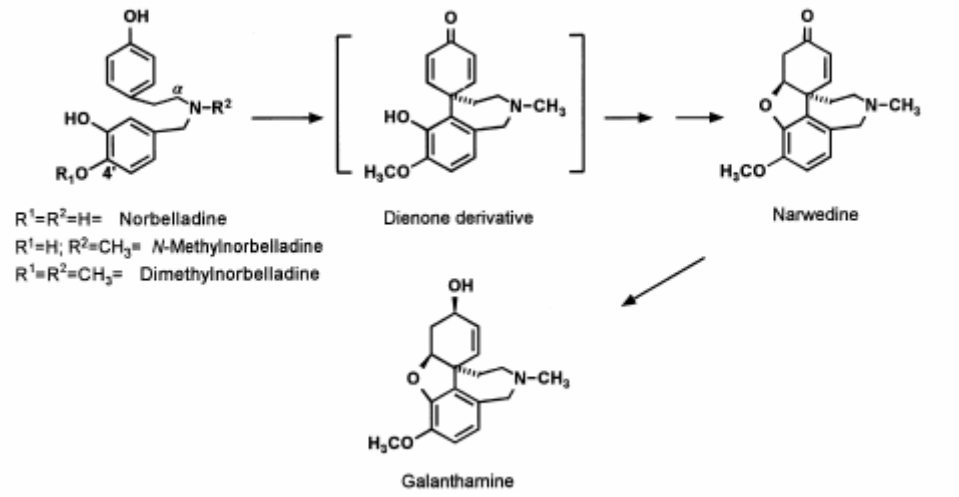
Şekil 2.4. *Leucojum aestivum* L.'un Türkiye'deki dağılımı

2.10. *Leucojum aestivum* L.' un Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

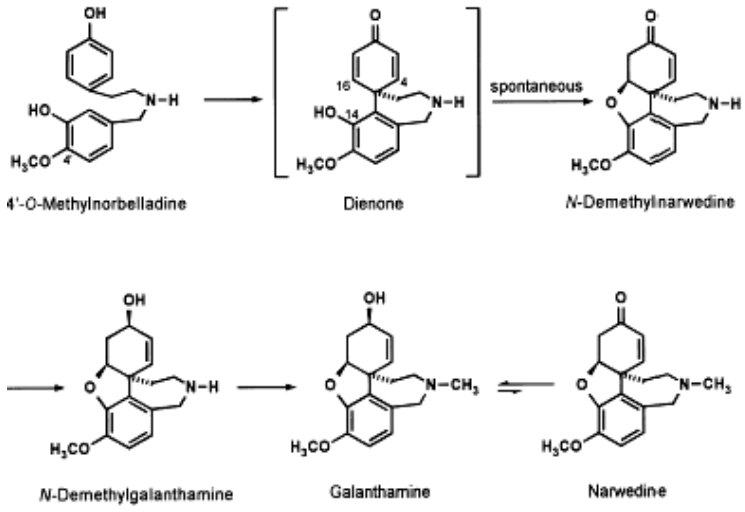
Leucojum aestivum Alzheimer hastalığının tanı ve tedavisinde kullanılan galanthamin maddesini içerdiği için büyük önem taşımaktadır. Galanthamin Amarylidaceae familyasına ait çok sayıda bitkiden elde edilen bir alkoloidtir. Galanthamin antikolinesteraz aktivitesine sahiptir. Bu özelliği ilk kez 1960 yılında Irwin ve Smith tarafından saptanmıştır (Eichhorn vd., 1998). Alzheimer hastalığının tedavisinde pozitif etkilere sahip olduğu Dal-Bianco vd. (1991) ve Heinrich (2004) tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Alzheimer hastalarında, beynin kolinerjik nöronlardan yoksun bölgelerinde asetilkolin konsantrasyonunu arttırdığı görülmüş ve bu yüzden galanthamin hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

Galanthamin, morfin kadar güçlü bir ağrı kesicidir. Doğu Avrupa'da tübakurarinin neden olduğu nöromusküler blokajı nötralize etme özelliğine bağlı olarak anestezik uygulamalarda reversal ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca galanthamin, merkezi sinir sistemini uyarıcı özelliğe de sahiptir. Bu özelliğinden dolayı göz damlalarında göz tansiyonunu düşürmek amacıyla kullanılmaktadır. Günümüzde, eczacılıkta birçok ilacın hammaddesini oluşturmaktadır. Galanthamin elde etmek zor ve pahalı bir işlemdir. Bu nedenle galanthaminin tıbbi uygulamalarda kullanılmasını daha ekonomik hale getirmek için *L. aestivum*'da galanthaminin biyosentez yolları araştırılmıştır. *L. aestivum*'da, galanthamin biyosentezinde öncü maddenin 4'-O-metilnorbelladin olduğu bulunmuştur. 4'-O-metilnorbelladinin galanthamine dönüştüğünü ilk kez 1969 yılında Fuganti göstermiştir (Eichhorn vd., 1998). Galanthamin biyosentez yolları Şekil 2.5 ve 2.6'da görülmektedir.

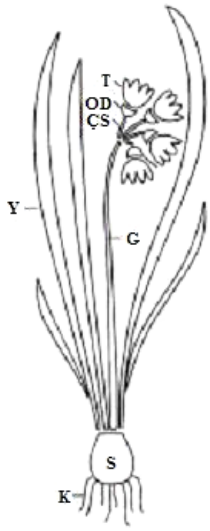
Eichhorn vd. (1998) tarafından, *L. aestivum* bitkisinde galanthaminin ve öncü maddelerinin bitkideki dağılımı incelenmiştir (Şekil 2.7). Tablo 2.2'de görüldüğü gibi kök, gövde ve soğanda bu maddelerin bulunmadığı yaprakta az miktarda öncü madde bulunduğu gözlenmiştir. Sonuçlar, çiçek sapı ve ovaryumun bu maddeler bakımından zengin olduğunu, petallerde ise az miktarda bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 2.5. İlk önerilen galanthamin biyosentez yolu (Eichhorn vd., 1998)



Şekil 2.6. Galanthamin biyosentezi için önerilen yeni yol (Eichhorn vd., 1998)



Şekil 2.7. *L. aestivum*'un kısımları (Eichhorn vd., 1998) (OD, ovaryum duvarı; ÇS, çiçek sapı; T, tepal; G, gövde; Y, yaprak; S, soğan; K, kök)

Tablo 2.2. Çiçek açmış *Leucojum aestivum*'un farklı dokularındaki 4'-O-metilnorbelladin biyotransformasyonu. *L. aestivum*'dan altı ana metabolit izole edilmiştir ve bunlar galanthamin, N-dimetilgalanthamin, N-dimetilnarwedin, narwedin, O-metillikorenin ve N-dimetil-7-dihidroksilikorenin olarak tanımlanmıştır (Eichhorn vd., 1998).

Bitki organı	Galanthamine (%)	N-Demethyl-galanthamine (%)	N-Demethyl-narwedine (%)	Narwedine (%)	O-Methyl-lycorenine (%)	N-Demethyl-7-dehydroxy lycorenine (%)
Ovaryum duvarı (OD)	27.4	22.0	3.1	1.2	32.0	6.1
Çiçek sapı (ÇS)	19.8	31.4	1.4	0.3	1.8	0.7
Tepal (T)	3.1	9.2	10.1	1.7	0	0.5
Gövde (G)	0	0	0	0	0	0
Yaprak (Y)	0	5.0	0	0	0	0
Soğan (S)	0	0	0	0	0	0
Kök (K)	0	0	0	0	0	0

Bulgaristan'da 2001-2002 yılları arasında yapılan bir diğer çalışmada da *L. aestivum*'un galanthamin içeriği araştırılmıştır. Bu çalışmada galanthamin içeriği bakımından ekonomik değeri olan yedi lokalite taranmıştır. *L. aestivum* populasyonlarından 80'den fazla yaprak örneği alınmış ve HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) yöntemi ile analiz edilmiştir. Galanthamin içeriğinin 0.06 ve 0.37 (DW; kuru ağırlık) arasında değiştiği gözlenmiştir. Galanthamin içeriğine göre *L. aestivum* populasyonları, düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 gruba ayrılmış; ve bu verilerin lokalitelerin dağılımı ile kısmen uyumlu olduğu bildirilmiştir (Gussev vd., 2003).

Ülkemizde de Amaryllidaceae alkoloidleriyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Samsun'da Kutbay vd. tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada çiçeklenme ve meyve bağlama dönemlerinde *L. aestivum*'un soğanlarındaki alkoloid miktarı belirlenmiş, ayrıca bitkinin yaygın olarak bulunduğu yerlerde populasyon sayımları da yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda meyve döneminde alkoloid miktarının arttığı belirlenmiştir. Bu safhada toprak üstü kısımları çürümeye başlamakta ve azot, fosfor, potasyum gibi temel besin elemetleri, toprakaltı kısımlara taşınmaktadır. Bu nedenle çiçeklenme döneminde topraküstü kısımlarda gerçekleşen aktif metabolik olaylar, meyve döneminde toprakaltı kısımlarda gerçekleşmektedir. Bundan dolayı meyve döneminde soğanların alkoloid içeriği fazla bulunmuştur (Kutbay vd., 1994).

Samsun ve çevresinde *L. aestivum*'a ait populasyon sayımları yapılmış ve $100m^2$'de bulunan birey sayısı hesaplanmış ve en fazla birey sayısı Balık gölleri civarında, en az ise İncesu mevkiinde tespit edilmiştir (Kutbay vd., 1994).

İçerdiği alkoloidleri ile ekonomik önemi büyük olan *L. aestivum* yeterince korunamamaktadır. Bu bitki geniş ölçüde yurt dışına ihraç edilmektedir. Kutbay vd. (1994) tarafından yapılan gözlemler sonucunda bu bitkinin özellikle Balık Gölü ve Terme'den kaçak olarak toplanıp Bulgaristan'a ihraç edildiği saptanmıştır.

Şener vd. tarafından 2003 yılında yapılan bir diğer çalışmada Amaryllidaceae familyasına ait 4 çeşit alkoloid araştırılmıştır. Bunlar; *Pancratium maritimum, Leucojum aestivum, Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* bitkilerinden izole edilen likorin, krinin, tazettin ve galanthamindir. Bu alkoloidlerin *Plasmodium falsiparum*'un büyümesini inhibe edip etmedikleri araştırılmış ve dört grup alkoloidin de farklı oranlarda antimalaryal aktivite gösterdikleri saptanmıştır. 6-hidroksihemantamin, hemantamin ve likorinin, *P. Falsiparum'*a karşı çok etkili olduğu, galanthamin ve tazettinin ise daha az etkili olduğu anlaşılmıştır (Şener vd., 2003).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Materyallerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada materyal olarak, Edirne Tavuk Ormanı'ndan (Şekil 3.1) 2004-2005 yıllarında Nisan ve Mayıs aylarında toplanan *Leucojum aestivum* L. (akçabardak) bitkisinin çeşitli boylardaki çiçekleri, tomurcukları ve kök uçları kullanıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: *L. aestivum*' un doğal ortamı; Tavuk Ormanı-Edirne (a, tomurcuk dönemi; b, çiçek dönemi)



Şekil 3.2. *L. aestivum*'un çeşitli boylardaki tomurcuk, çiçek ve meyvaları

3.2. Işık Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler

3.2.1. Kök Ucu Hücrelerinde Karyotip Analizi

Ön işlem

Somatik kromozomları incelemek ve karyotip analizi yapmak için kök uçları sabah saat 09:00-10:00 arasında alındı. Bölünmeyi metafaz evresinde durdurup, bu evredeki hücre sayısını çoğaltmak ve kromozomların belli oranda kısalıp kalınlaşmasını sağlamak amacıyla kesilen kök uçları musluk suyuna alındı ve taze hazırlanmış %1'lik alfa-monobromonaftalin (ABN) solüsyonu içine konularak buzdolabında +4^{o}C'de 24 saat bekletildi (Gray, 1964).

Fiksasyon

ABN solüsyonundan çıkarılan kök uçları, musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile suları alındı ve Carnoy (3 absolu alkol : 1 glasial asetik asit) sıvısı içeren şişelerde buz dolabında +4^{o}C'de 24 saat bekletildi. Kök uçları %96'lık alkolle yıkandıktan sonra %70 alkole alındı ve hidroliz işlemine kadar +4^{o}C'de bekletildi (Gray, 1964).

Hidroliz

Hidroliz işlemi için şişelerde %70'lik etil alkolde bulunan kök uçları, 1 N HCl içinde 60^{o}C'de 20 dakika bekletildi (Gray, 1964).

Preperat Hazırlama

Karyotip analizi için Feulgen ve aseto-orsein ile yapılan çifte boyama yöntemi uygulandı. 1N HCl'den alınan kök uçları Feulgen boyası içinde karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saat bekletildi. Köklerin 1mm'lik uç bölgelerinin boyandığı gözlendikten sonra, boyanan kısımlar kesilerek saat camı içine alındı. Üzerlerine 9

damla %2'lik aseto-orsein, 1 damla 1N HCl konularak ispirto ocağında 1-2 dakika ısıtıldı. Ezme preperasyon yöntemi ile hazırlanan preperatlar buzdolabında bekletildi. Donmuş olan preperatlardan lam ve lamel ayrılarak sırasıyla 2x %96 alkol, 1: 1 alkol: ksilol ve saf ksilolden geçirilerek entellan ile kapatıldı (Gray, 1964).

Karyogram Hazırlanması

Kromozom morfolojileri için çok sayıda hazırlanmış preperatlar incelendi ve ölçümleri yapıldı. Karyogram hazırlanırken, kromozomlar sentromer durumlarına göre incelendi ve terminolojileri Naranjo ve Poggio'ya (1986) göre yapıldı. Hazırlanan preperatlar Olympus BH-2 marka mikroskopta incelendi ve Olympus C-5060 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi ve çizimleri yapıldı.

3.2.2. Andrekeumun İncelenmesi

L. aestivum'un anter sayısı ve özellikleri Olympus stereo fotomikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.3. Anter Çeperi ve Mikrosporogenezin Çeşitli Evrelerinin İncelenmesi

Nisan ayında Carnoy (3: 1, etil alkol : asetik asit) fiksatifinde fikse edilen *L. aestivum*'a ait çeşitli boylardaki tomurcuk ve çiçekler % 96'lık etil alkolde yıkandıktan sonra %70 etil alkolde saklandı. Tomurcuklardan ayıklanan anterler boylarına göre ayrıldı. Farklı boylardeki anterlerden parafin yöntemiyle kesit almak için:

1. %70 etil alkolden çıkarılan çiçek tomurcuklarının anterleri 24 saat süreyle sırasıyla %80, %96 ve %100 etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyonu sağlandı.
2. Etil alkol ve ksilol serilerinin her birinde 24 saat tutularak materyalin şeffaflaştırma işlemi tamamlandı.

3. Ksilol içine koyulan ve 60^{o}C' lik etüvde 24 saat bekletilen materyaller ksilol : parafin karışımında 24 saat bekletildikten sonra saf parafin içine alınarak 24 saat daha etüvde bekletildi.
4. Parafin bloklara gömülen materyal, kesit almak için kalıplarda bekletildi ve mikrotomla 6-10µm kalınlığında kesitler alındı. Parafinli kesitler, parafinden kurtarmak için ksilolde 24 saat bekletildi. Ertesi gün ksilol : alkol ve alkol serilerinden geçirilen ve her birinde 15´ bekletilen kesitler, suya getirildi.
5. Kesitler, Delafield's hematoksilin boyasında 1 saat bekletildi.

dH_2O ile yıkanan kesitler, daimi preperat hazırlamak için alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı (Johansen, 1940).

Mikrosporogenezin farklı evreleri %1'lik aseto-orsein kullanılarak ezme preperasyon yöntemi ile incelendi (Jensen, 1962).

Bu yöntemle mikrosporogenezin farklı evrelerinde anter çeperinin bazı histolojik özellikleri de incelendi. Ayrıca bu evrelerde hem parafin hem de 1µm kalınlığındaki yarı ince anter kesitleri PAS ve toluidin mavisi ile boyanarak polisakkarit ve RNA içeriği bakımından incelendi (Jensen 1962, Gabe 1968, İnce 1989).

3.2.4. Tapetum Hücrelerindeki Bölünme Tiplerinin İncelenmesi

Genç çiçek tomurcukları, Nisan ayında Carnoy fiksatifinde fikse edildikten sonra %96'lık etil alkol'de yıkanıp %70 etil alkolde saklandı. Anterler boylarına göre ayrıldı. Preperasyon çalışmaları aseto-orsein ezme yöntemi ile yapıldı ve genellikle geçici preperasyonlar kullanıldı (Jensen, 1962).

1. Anter 1N HCl içinde 60^{o}C'de 20´ hidroliz edildi.
2. 1N HCl'den çıkarılan anterler içinde 9 damla %2'lik aseto-orsein ve 1 damla 1N HCl bulunan saat camı içinde ispirto ocağı alevinde ısıtılıp üzerine Petri kabı kapatılarak 20´ bekletildi.

3. Saat camından alınan anterler aseto-orsein (%2’ lik) boyası damlatılan lam üzerine alındı ve bir kez daha ispirto ocağı alevinden geçirilerek ezme işlemi tamamlandı. Buzdolabında donmuş olan preperatlardan lam ve lamel ayrılarak sırasıyla 2x %96 alkol, 1:1 alkol : ksilol, saf ksilolden geçirilerek entellan ile kapatıldı (Jensen, 1962).

3.2.5. Mikrosporogenezin ve Polen Mitozunun İncelenmesi

Mikrosporogenezin ve polen mitozunun incelenmesinde, tapetumdaki bölünme tiplerinin incelenmesinde kullanılan aseto-orsein ile ezme yöntemi kullanıldı (Jensen, 1962). Mikrosporogenezin eksik kalan bazı evreleri, parafine gömülen çeşitli boylardaki tomurcuklardan alınan kesitlerin, Delafield’s hematoksilin ile boyanıp incelenmesiyle tamamlandı (Johansen, 1940).

3.2.6. Polen Canlılığının İncelenmesi

Polen tanelerinin bazı boyalarla boyanabilme yetenekleri ile canlılıkları arasında ilişki vardır. Gliserinde hazırlanmış aseto-orsein veya lakto-fenolde hazırlanmış anilin mavisi gibi boyalar sadece gelişmesini tamamlamış (fertil) polenleri boyarlar. Gelişmesini tamamlamamış (steril) polenler ise bu boyalar ile boyanmaz, renksiz boş polen çeperleri halinde görülürler (Riley 1948, Alexander 1969, Ünal 1983). Fertil polenler verimli, steril polenler ise verimsiz polenlerdir. Polenlerin bazı boyalarla boyanması ile polen canlılığı arasındaki ilişki gerçeğinden hareket edilerek, inceleme materyali olarak *L. aestivum*’un çiçeklenme zamanında alınan polenler kullanıldı.

Aseto-orsein ezme yöntemi ile polenlerin nukleus sayıları ve şekilleri incelendi (Jensen, 1962). Polen canlılığı için ise KOH içinde 10′ bırakılan polen taneleri laktofenol-anilin mavisi ve lugol (IKI) ile boyanarak Olympus BH-2 ışık mikroskobunda incelendi. Olympus C-5060 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.2.7. Mikrogametofit Gelişiminin İncelenmesi

- *In Vivo* İnceleme

Öncelikle *Leucojum aestivum* bitkisinin yeni açmış çiçeklerinden alınan stilüsler Carnoy fiksatifi (3:1, Etil alkol: Asetik asit) ile fikse edildi. %96 etil alkolde yıkandı ve %70 alkolde saklandı. Stilüsler 1N HCl'de 10´ 60^{o}C'de hidroliz edildi. Daha sonra dH_2O ile yıkandı. Lam üzerindeki aseto-orsein ve laktofenolde hazırlanan anilin mavisi içine alınan stilüsler didiklenerek ezildi ve lamel kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi (Jensen, 1962).

- *In Vitro* İnceleme

Küçük tüplere %10'luk sakkaroz çözeltisinden 5 ml, %0,01'lik borik asitten 1ml ilave edildi. Yeni açmış çiçekten alınan çiçek tozları tüp içine ilave edilip sık sık çalkalandı. Belirli zaman aralıkları ile tüp içinden bir damla sıvı alınıp lamel kapatmadan mikroskop altında gözlendi. Tüp büyümesi inceleme için yeterli olduğunda tüp içindeki karışım Carnoy fiksatifi ile fikse edildi. Daha sonra aseto-orsein ve lakto-fenolde hazırlanmış Anilin mavisi ile boyanarak vegetatif ve generatif hücrelerin nukleusları ve kalloz gelişimi ışık mikroskobunda incelendi (Jensen, 1962). Çimlenen olgun polen taneleri sayılarak çimlenme oranı hesaplandı.

In vitro ortamda çimlendirilen polen tüplerinde kalloz tıpaların oluşumu görülmediğinden kalloz tıpaları göstermek için önceden Carnoy fiksatifi ile fikse edilmiş stilüsler, musluk suyunda yıkandı. 4M NaOH içinde 55^{o}C'de 4 saat bırakıldı. Tekrar musluk suyunda yıkandı. Lam üzerine alınan stilüsler üzerine 1 damla lakto-fenolde hazırlanmış Anilin mavisi damlatılarak lamel kapatıldı. Bir gece karanlıkta +4^{o}C'de bekletildi (Scribailo ve Barret, 1991).

Çalışma sırasında hazırlanan preperatlar, Olympus BH-2 marka ışık mikroskobunda incelendi ve Olympus C-5060 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.2.8. Ginekeumun İncelenmesi

Nisan ayında *L. aestivum*'a ait çeşitli boylardaki tomurcuk ve çiçeklerden ginekeumlar ayrıldı. El ile alınan kesitler binoküler altında incelendi. Karpeller ayrılarak tohum taslakları binoküler yardımıyla sayıldı.

3.2.9. Megasporangiyum Gelişiminin İncelenmesi

L. aestivum'a ait çeşitli boylardaki tomurcuk ve çiçekler, Carnoy fiksatifinde (3:1, Etil alkol:Asetik asit) fikse edildikten sonra %96'lık etil alkolde yıkandı ve daha sonra %70 etil alkolde saklandı. Parafin yöntemi (Johansen, 1940) ile elde edilen kesitler Olympus BH-2 marka ışık mikroskobunda incelendi ve Olympus C-5060 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.2.10. Megasporogenez ve Megagametogenezin İncelenmesi

L. aestivum'a ait çeşitli boylardaki tomurcuk ve çiçekler, Carnoy fiksatifinde (3:1, Etil alkol : Asetik asit) fikse edildikten sonra % 96'lık etil alkolde yıkandı ve daha sonra %70 etil alkolde saklandı. Değişik boylardaki tomurcuk ve çiçeklerin ovaryumları ayrıldı. Ovaryumlardan parafin yöntemiyle kesit almak için (Johansen, 1940):

1. Ovaryumlar 24 saat süreyle sırasıyla %80, %96 ve %100 etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyonu sağlandı.
2. Etil alkol ve ksilol serilerinin her birinde 24 saat tutularak materyalin şeffaflaştırma işlemi tamamlandı.
3. Ksilol içine koyulan ve 60^{o}C' lik etüvde 24 saat bekletilmiş olan materyaller ksilol : parafin karışımında 24 saat bekletildikten sonra saf parafin içine alınarak 24 saat daha etüvde bekletildi.
4. Parafin bloklara gömülen materyal, kesit almak için kalıplarda bekletilmiş ve mikrotomla alınan kesitlerin kalınlığı materyale ve incelenmek istenen evrelere göre ayarlandı. 6-15µm kalınlığında kesitler alındı.

5. Parafinli kesitler, parafinden kurtarmak için ksilolde 24 saat bekletildi ve ertesi gün ksilol : alkol ve alkol serilerinden geçirilen ve her birinde 15´ bekletilen kesitler, suya getirildi.
6. Kesitler, Delafield's hematoksilin boyasında 1 saat bekletildi.
7. dH_2O ile yıkanan kesitler, daimi preperat hazırlamak için alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

Çeşitli boydaki tomurcuk ve çiçeklerin ovaryumlarından birçok kesit alındı ve bu kesitlerde tohum taslaklarının gelişimi ile megasporogenez ve megagametogenezin çeşitli evreleri incelendi (Johansen, 1940).

Bu yöntemle farklı gelişim evrelerindeki tohum taslaklarının histolojik özellikleri incelendi. Ayrıca bu evrelerde alınan 1µm kalınlığındaki yarı ince kesitler PAS ve toluidin mavisi ile boyanarak polisakkarit ve RNA içeriği incelendi (Jensen 1962, Gabe 1968, İnce 1989).

3.2.11. Temizleme Tekniği ile Embriyo Keselerinin İncelenmesi

Carnoy fiksatifinde saklanan tomurcuklardan ovaryumlar ayrıldı. Oda sıcaklığındaki %85'lik laktik asitte 24 saat bırakıldı. Daha sonra tohum taslakları ovaryumdan çıkarıldı ve 2:2:2:2:1 oranında %85 laktikasit, kloral hidrat, fenol, karanfil yağı, ksilolden oluşan temizleme sıvısında 48 saat bekletildi. Şeffaflaşan tohum taslakları pastör pipeti yardımıyla lam üzerindeki temizleme sıvısına aktarıldı (Herr, 1971). Üzerine lamel kapatılarak Olympus BH-2 marka ışık mikroskobunda incelendi ve Olympus C-5060 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.3. Floresans Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler

3.3.1. Polen Canlılığının ve Mikrogametofitin İncelenmesi

L. aestivum'un çiçeklenme zamanında alınan polenler ve daha önceden *iv vitro* kültür ortamında çimlendirilmiş ve Carnoy fiksatifi ile fikse edilmiş polen tüpleri Anilin blue (Merck) ile boyanarak Olympus BX51 floresans mikroskobunda incelendi ve RT Color Spot 2.2.1 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.4. Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Sitolojik İncelemeler

3.4.1. Farklı Gelişim Evrelerinde Anter Çeperi ve Mikrosporların İnce Yapısının İncelenmesi

Fiksasyon

Boyları 1-4mm arasında değişen anterler $1mm^3$'lük parçalara bölündü. %3'lük gluteraldehitte (0.1 M tamponlu) 2-4 saat bekletildi. %1'lik OsO_4'e (0.1M Milloning's fosfat tamponlu) alındı. Örnekler tampon çözelti ve distile su ile 3-4 kez yıkandı. %5'lik uranil asetatta 2 saat bekletildi, distile su ile 2-3 kez yıkandı (Canberk, 1997).

Dehidrasyon

%30, %50, %70, %90 aseton serilerinde 10'ar dakika, %100 asetonda 30 dakika, 1 aseton : 1 propilen oksitte 20 dakika, %100 propilen oksitte 20 dakika bekletildi (Canberk, 1997).

Kapsüllere Gömme

Örnekler dehidrasyon işleminden sonra 1:1 propilen oksit-epon 812 karışımında 1 saat, 1:3 propilen oksit-epon 812 karışımında 1 saat, epon 812'de, desikatörde bir

gece bekletildi. Kapsüllere gömülen örnekler, 40^{o}C'de 3 gün, 45^{o}C'de 1 gün, 60^{o}C'de 3 gün bırakıldı (Canberk, 1997).

Kesit Alma

Ultramikrotomla alınan 1000 nm'lik yarı ince kesitler lam üzerine alındı ve %1'lik toluidin mavisi ile 1-2 dakika boyanarak 5 dakika ısıtma tablasında bekletildi. Entellan ile kapatıldıktan sonra daimi preperat haline getirildi ve ışık mikroskobunda incelendi. Saptanan bölgelerden ultramikrotom ile alınan 150-300A^{o} (15-30nm) kalınlığındaki ince kesitler film kaplı gridler üzerine alındı ve %2 uranil asetat ile boyandı. Gridler üzerindeki örnekler, JEOL Jem 1010 marka elektron mikroskobu ile incelenerek fotoğraf çekildi (Canberk, 1997).

3.5. Preperasyonda Kullanılan Bazı Boya ve Çözeltilerin Hazırlanışı

Feulgen hazırlanışı

2gr kristal fuksin 400ml distile suda kaynatılır ve süzülür. 6gr $K_2S_2O_5$ ve 60ml 1N HCl ilave edilir ve çalkalanır. Şişenin ağzı kapatılır ve karanlıkta 24 saat bekletilir. 0.5gr aktif karbon ilave edilir ve süzülür (Ozban ve Özmutlu, 1991).

%2'lik aseto-orseinin hazırlanışı

45ml asetik asit içine 2gr orsein ilave edilerek eritildi, cam balonda kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı. Eriyik soğuyunca 55ml saf su eklenerek süzüldü (Ozban ve Özmutlu, 1991).

-IKI (İyotlu potasyum iyodür)'ün hazırlanışı

2gr KI, 200ml dH_2O içinde eritilerek, bu eriyiğe 1gr I ilave edildi (Yakar-Tan, 1982).

Lakto-fenol Anilin mavisinin hazırlanışı

100ml Laktik asit
100gr Fenol kristali
100ml Gliserin
100ml dH_2O

Fenol kristali dH_2O'da eritildi, laktik asit ve gliserin ilave edilerek lakto-fenol hazırlandı. Lakto-fenol ve suda hazırlanmış % 0.1'lik Anilin mavisi eşit miktarlarda karıştırıldı (Mclean ve Cook, 1941).

Floresans mikroskobu için Anilin mavisinin hazırlanışı

100ml 0.1N K_3PO_4 içinde 0.1gr suda eriyen Anilin Blue (Merck) çözündürülerek hazırlandı (Ünal,1982).

Delafield's hematoksilinin hazırlanışı

6ml absolu alkolde çözündürülmüş 1gr hematoksilin, 100ml doymuş alüminyum amonyum sülfat [$AlNH_4(SO_4)_2$] çözeltisine damla damla ilave edildi. Bir hafta hava ve ışığa maruz bırakıldı. 25ml gliserin ve 24ml metil alkol ilave edilerek süzüldü (Mclean ve Cook, 1941).

Milloning's fosfat tamponunun hazırlanışı

Solüsyon A

2.26gr $NaH_2PO_4.H_2O$ 100ml dH_2O'da çözündürüldü.

Solüsyon B

2.52gr NaOH 100ml dH_2O'da çözündürüldü.

Solüsyon C

5.40gr glikoz 100ml dH_2O'da çözündürüldü.

Solüsyon D

Solüsyon A'dan 41.5ml ve solüsyon B'den 8.5ml alınarak 50ml'lik bir solüsyon elde edildi (Milloning, 1962).

Tampon solüsyonu

Solüsyon C'den 5ml ve solüsyon D'den 45ml alınarak karıştırıldı, pH 7.2-7.4 arasında ayarlandı (Canberk, 1997).

%3'lük gluteraldehitin hazırlanışı

%50'lik gluteraldehitten 1.2ml alınarak, Milloning's fosfat tamponu ile 20ml'ye tamamlandı (Canberk, 1997).

%1'lik OsO_4'in hazırlanışı

0.1gr OsO_4 içeren ampul kırılarak 10ml Milloning's fosfat tamponu içinde koyu renkli cam bir şişede 1 gece çözündürüldü (Canberk, 1997).

Epon gömme karışımı hazırlanışı

13ml Epon gömme karışımı (Epon 812)
8ml DDSA
7.5ml MNA
0.42ml DMP 30 (Canberk, 1997)

%1'lik Toluidin mavisi'nin hazırlanışı

1gr Na tetraborat (Borax)
1gr Toluidin mavisi
100ml dH_2O

dH_2O içine borax katılarak iyice karıştırıldı, çözündükten sonra toluidin mavisi eklendi ve karıştırıldı. Solüsyon, filtre kağıdı ile süzüldükten sonra kullanıldı (İnce, 1989).

PAS ve hematoksilin hazırlanışı

Schiff reaktifinin hazırlanışı: 100ml dH_2O kaynatılır. Hemen ateşten çekilip, 1gr bazik fuksin kaynatılmış dH_2O'da eritilir. Solüsyonun 60°C'ye kadar soğuması beklenir. Soğuyan karışım süzülür, içerisine 2gr potasyum metabisülfit ile 20ml 1N HCl ilave edilir. Buzdolabında, 18-24 saat ağzı kapalı olarak bekletilir. Sonra, bu solüsyona 300 mgr aktif kömür ilave edilip, kuvvetlice karıştırılır. Huni ve süzgeç kağıdı yardımıyla, dikkatlice süzülür (Jensen 1962, Gabe 1968).

1N HCl'in hazırlanışı

HCl (%37'lik konsantre)	83.3ml
dH_2O	916.7ml

Periyodik asit solüsyonunun hazırlanışı

Periyodik asit	1gr
dH_2O	100ml

Yıkama solüsyonu

%10'luk potasyum metabisülfit ($K_2S_2O_5$)	10ml
1/10N HCl	10ml
Çeşme suyu	180ml

Hepsi karıştırılır ve 3 ayrı şaleye bölünür. Her boyada taze olarak hazırlanmalıdır.

Hematoksilin

A: Hematoksilin 1gr

dH_2O 10ml

dH_2O içine hematoksilin konarak, ısı yardımıyla eritilir.

B: $AlK(SO_4)_2.12H_2O$ 20gr

dH_2O 200ml

dH_2O içinde $AlK(SO_4)_2.12H_2O$ (Aluminium potassium sufate dodecahydrate) eritilir. Eğer erimez ise, ısı ile eritilebilir. (Aluminium potassium sufate dodecahydrate, dH_2O içine konulmadan önce teksir kağıdı arasında güzelce ezilmelidir.)

İki solüsyon karıştırılır. Ertesi gün, 0,177gr $KMnO_4$ ilave edilir, ısıtılır (tam kaynamadan indirilir).

Boyamanın takibi:

1. Parafinleri giderilerek suya indirilen kesitler, periyodik asitte 5′ bırakılır.
2. Akan çeşme suyu altında 3 kere çalkalanıp, 10′ suyun altında bırakılır. dH_2O'ya alınıp, 3 kere çalkalanır.
3. Karbon kağıdı ile kaplanmış şale içindeki Schiff solüsyonunda, karanlık yerde (dolabın içinde) 15′ bırakılır.
4. Yıkama solüsyonu I'de 5′
5. Yıkama solüsyonu II'de 5′
6. Yıkama solüsyonu III'de 5′
7. Akan suda 5′
8. Hematoksilinde 7′ tutulur.
9. Kesitler 10′ akan suda morartılır.
10. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek, entellan ile kapatılır (Jensen 1962, Gabe 1968).

Temizleme Sıvısının Hazırlanışı

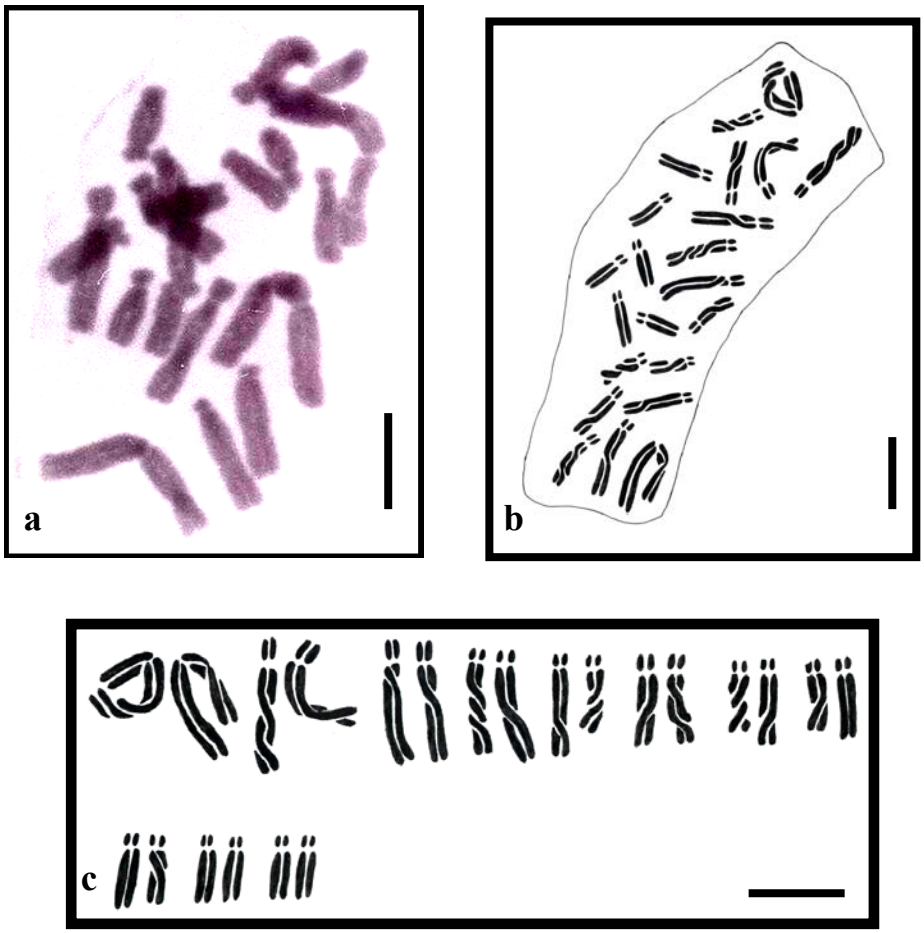
4ml	% 85 Laktik asit
4gr	Kloral hidrat
4gr	Fenol
4ml	Karanfil yağı
2ml	Ksilol

%85 laktikasit, kloral hidrat, fenol, karanfil yağı, ksilol sırasıyla 2:2:2:2:1 oranında karıştırılarak temizleme sıvısı elde edildi (Herr, 1971).

5. BULGULAR

5.1. *Leucojum aestivum* L.'un Karyolojik Özellikleri

Bu çalışmada Edirne, Tavuk Ormanı'ndan toplanan *L. aestivum* bitkilerinin adventif köklerinden hazırlanan ezme preperatlarda mitoz bölünmenin metafaz kromozomları incelendi ve kromozom sayısı (diploid) 2n=22 olarak bulundu. Temel kromozom sayısı x=11 olarak saptandı. Karyotipi incelendiğinde 1. kromozom çiftinin metasentrik, 2. ve 3. çiftin submetasentrik geri kalan 8 kromozom çiftinin ise akrosentrik durumlu oldukları gözlendi. Kromozomların morfolojik özellikleri ve metafaz kromozomları ile karyogramları Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. *L. aestivum*'un adventif kök ucu kromozomları; a, metafaz kromozomlarının genel görünüşü 2n=22; b, metafaz kromozomlarının çizimi; c, metafaz kromozomlarının karyogramı, barlar=10µm

5.2. *Leucojum aestivum* L.'un Embriyolojik Özellikleri

4.2.1. Andrekeum

Andrekeum 6 stamenden oluşur. Anterler sarı renkli, bazifiks, filamentler beyaz renklidir. Olgun anter boyu genellikle 4mm'dir fakat 5mm'lik anterlere de rastlanmıştır (Şekil 4.2a). Filamentler anterlerden daha kısadır. Anterler olgunlaştığında mikrosporangiyumlar stomiyumlarından yarılarak açılırlar (Şekil 4.2b).



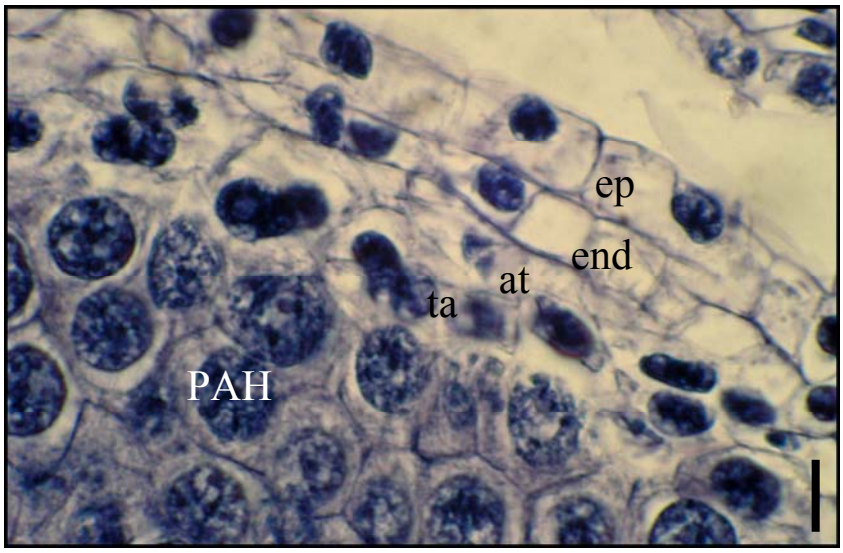
Şekil 4.2. *L. aestivum*'da a, anterlerin gelişimleri sırasındaki boyları; b, yarılarak açılan anterler.

4.2.1.1. Anter Çeperi

L. aestivum'da anterler tetrasporangiattır. Polen ana hücrelerindeki (PAH) mayoz bölünmenin erken profaz evresinde anter çeperini çevreleyen epidermis ile sporogen doku arasında 3 veya 4 hücre sırası bulunmaktadır. Anter gelişiminin bu fazında epidermis hücrelerinin diğer hücrelerden daha büyük olduğu, endotesyumda çeper kalınlaşmasının başlamadığı ve tapetum hücrelerinin bir veya iki nukleuslu olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3). Tapetum salgı tipindedir. Mikrosporlar tetradtan salındıktan sonra dejenere olmaya başlarlar (Şekil 4.12b).

Olgun bir anterden enine kesit alındığında en dışta bir sıra yassı ve şişkin epidermis hücreleri bulunur, bu hücreler gelişimin sonuna kadar parçalanmadan kalır. Epidermisin altında 1-2 sıralı endotesyum, 1-2 sıralı ara tabaka ile lokuluslarda polen taneleri görülmüştür. 1-2 sıralı olan tapetum hücreleri polen tanesinin oluşması sırasında mikrosporlar tarafından absorbe edildiğinden görülmemektedir. Endotesyum

hücrelerinde anastomoz yapmış lifsi kalınlaşmalar gözlenmiştir (Şekil 4.14). Anterin olgunlaşması sırasında ara tabaka hücreleri ezilmiş ve enine uzamıştır (Şekil 4.4).

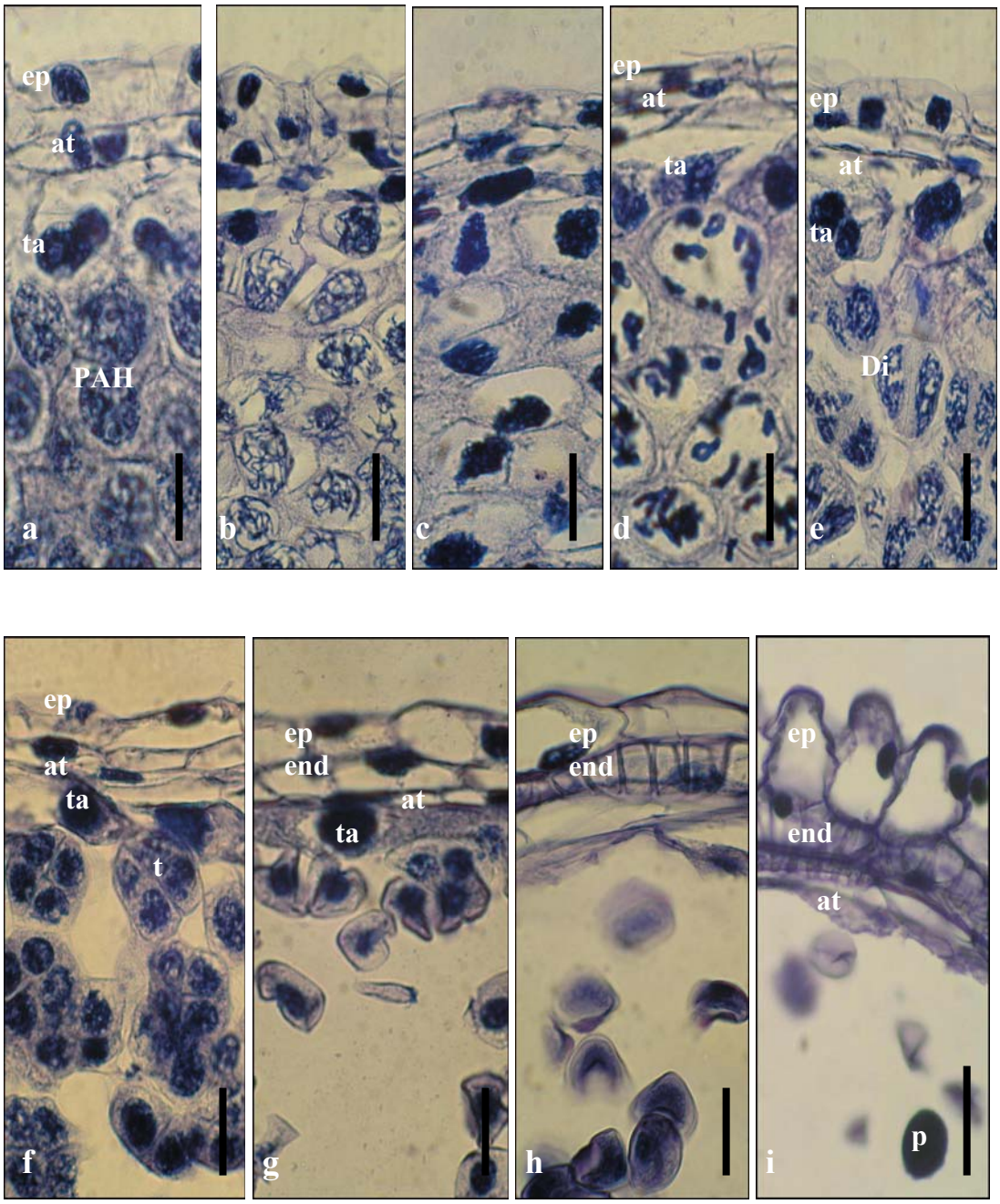


Şekil 4.3. *L. aestivum*'da genç anterin enine kesitinin genel görünüşü; bar=20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; PAH, polen ana hücresi; ta, tapetum)



Şekil 4.4. *L. aestivum*'da olgun anterin enine kesitinin genel görünüşü; bar=50µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; p, polen)

Anter çeperindeki dokuların değişimi Şekil 4.5'te daha detaylı görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi endotesyum kalınlaşması olgun polen evresinde başlamış, ara tabaka anter gelişiminin son evresine kadar görülmüştür. Tapetum hücrelerinin olgun polen evresinde dejenere oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.5. *L. aestivum*'un mikrosporogenez ve mikrogametogenezin çeşitli evrelerinde anter çeperinin gelişimi; a, leptoten; b, zigoten; c, pakiten; d, diakinez; e, diad evresi; f, tetrad evresi; g, buruşuk mikrospor evresi; h; mikrogametogenez; i; olgun polen evresi; a-h, bar=20µm; i, bar=50µm (at, ara tabaka; Di, diad; end, endotesyum; ep, epidermis; p, polen; PAH, polen ana hücresi; t, tetrad; ta, tapetum)

4.2.1.2. Anter Çeperinin Mikrosporogenezin Çeşitli Evrelerinde Histokimyasal Özellikleri

L. aestivum'a ait farklı boylardaki genç ve olgun anterlerden alınan kesitler PAS ve toluidin mavisi ile boyanarak sporogenezin çeşitli evrelerinde polisakkarit ve RNA içerikleri bakımından incelendi.

Anterdeki polisakkarit içeriğinin genellikle hücre çeperlerinde (Şekil 4.6- 4.8, 4.9, 4.10) ve özellikle de konnektif dokuda bulunan iletim demetlerinin hücre çeperlerinde (Şekil 4.8d, ok) yoğunlaştığını görmekteyiz. Anter gelişimi sırasında anter çeper hücrelerinin ve mikrospor hücrelerinin sitoplazmalarında çözünmeyen polisakkaritlere rastlanmamıştır.

Anterin erken gelişim evresinde sporogen doku hücrelerinin sitoplazma ve nukleuslarının RNA bakımından çok zengin olduğu, genç anter çeperi hücrelerinde ve konnektif doku hücrelerinde ise RNA'nın nukleusta yoğunlaştığı gözlendi (Şekil 4.11a).

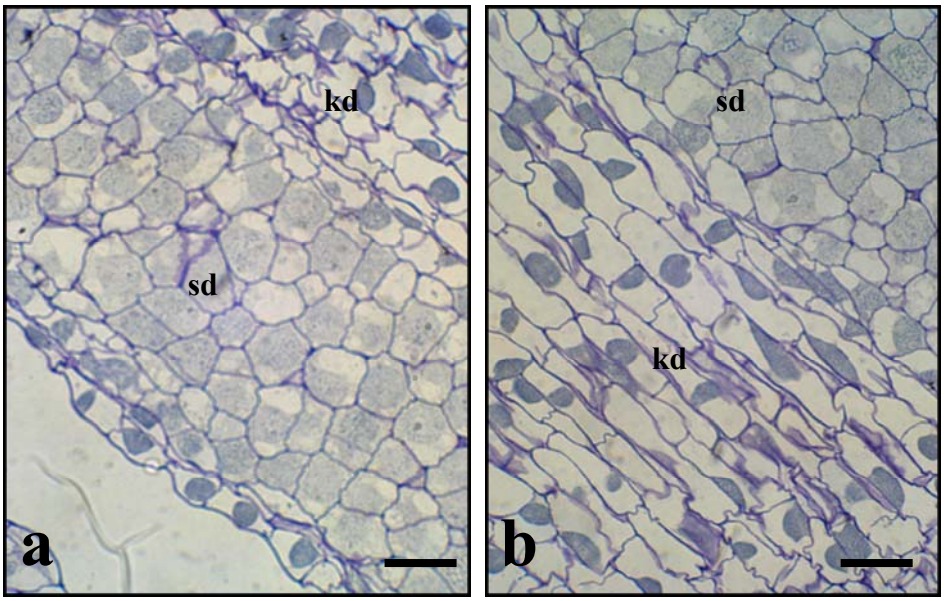
Polen ana hücreleri çevresinde kalloz çeper oluşmadan önceki evrede polen ana hücrelerinin RNA içeriğinde belirgin bir azalma ve sitoplazmalarında büyük vakuollerin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.11b).

Polen ana hücreleri çevresinde kalloz çeper oluşumu tamamlandığı evrede ise polen ana hücrelerinin sitoplazma ve nukleuslarında RNA içeriğinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.12a).

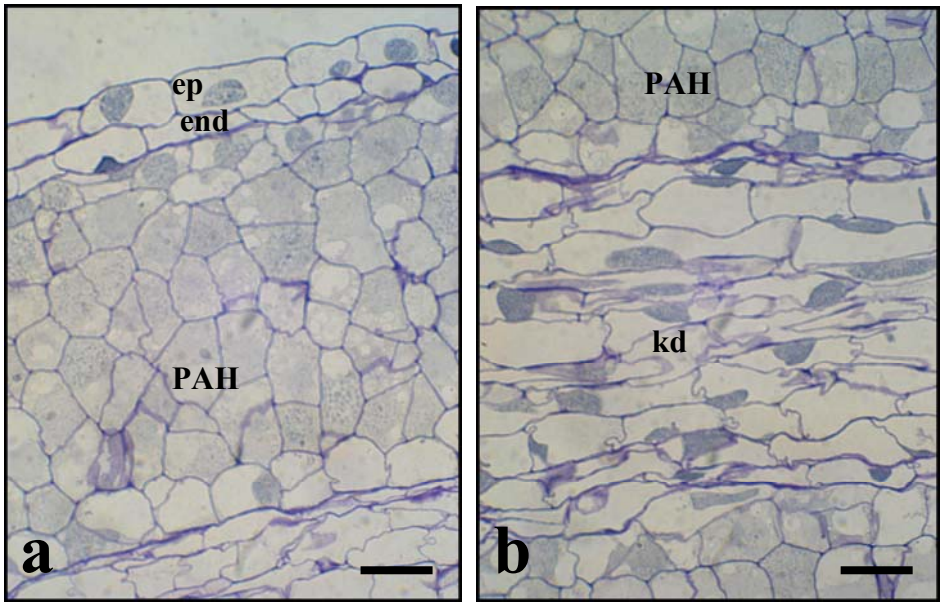
Mikrosporogenezin tetrad evresinde tetrad ve tapetum hücrelerinin sitoplazma ve nukleuslarının RNA içeriği bakımından zengin olduğunu (Şekil 4.12b), buruşuk mikrospor evresinde ise hem mikrosporların hem de tapetum hücrelerinin RNA içeriğinin azaldığını görmekteyiz (Şekil 4.12b).

Mikrosporların buruşuk evreden sonra tapetum hücrelerinden sıvı alarak şişmeye başladıkları, tek nukleuslu mikrospor evresinde mikrosporların ve bozulmaya başlayan

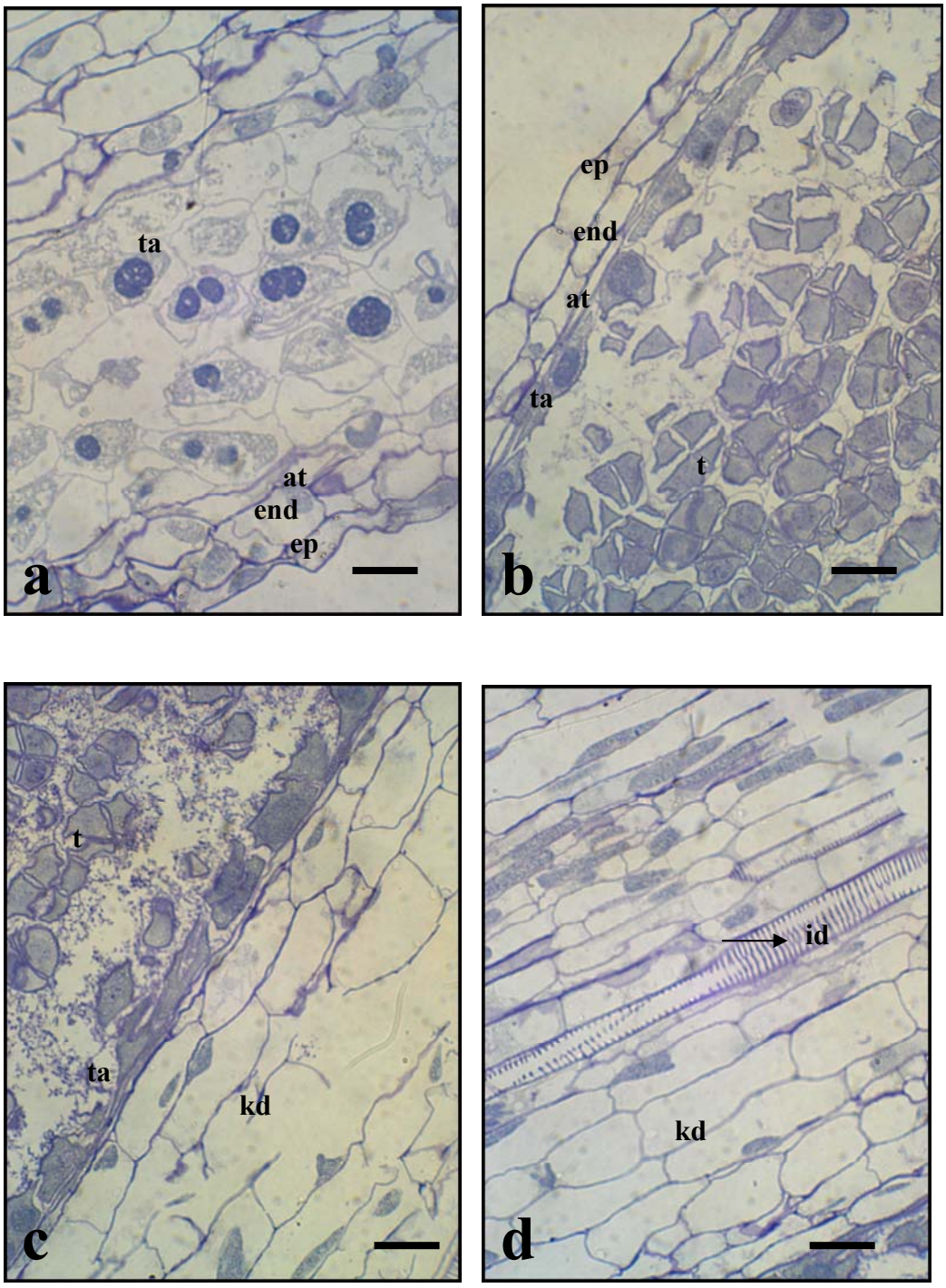
tapetum hücrelerinin RNA içeriği bakımından zengin oldukları ve ayrıca bu evrede anter çeperinin epidermis dışındaki endotesyum ve ara tabaka hücrelerinde de yer yer RNA miktarında artış görülmektedir (Şekil 4.13). Olgun anterlerde anter çeperi ve konnektif doku hücrelerinde RNA içeriği azalmıştır. Bu evrede endotesyumda lifsi kalınlaşmalar görülmektedir (Şekil 4.14).



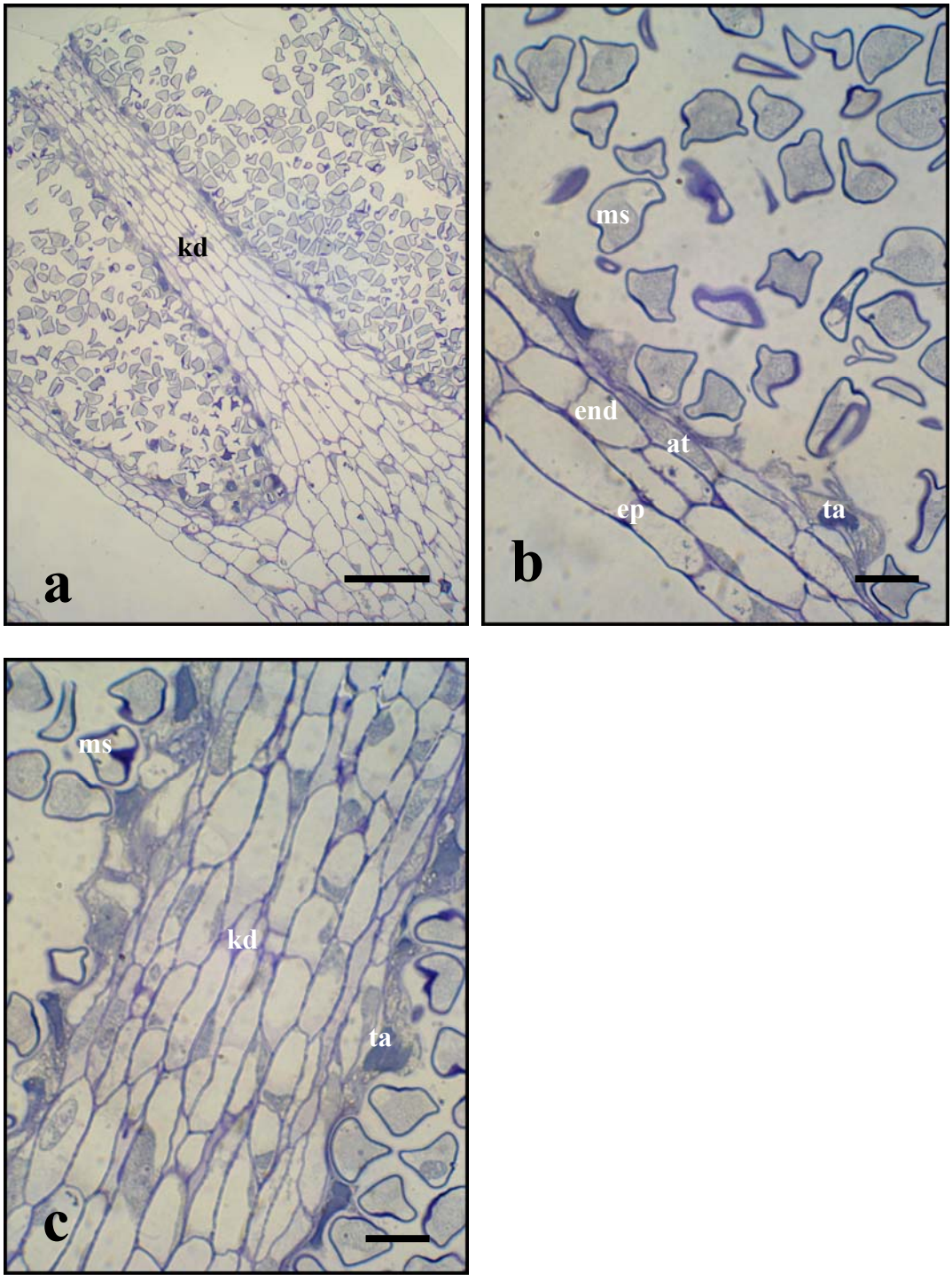
Şekil 4.6. PAS ile muamele edilmiş *L. aestivum*'un sporogen doku evresindeki anterin boyuna kesitleri. a, sporogen doku; b, konnektif doku, bar=20µm (kd, konnektif doku; sd, sporogen doku)



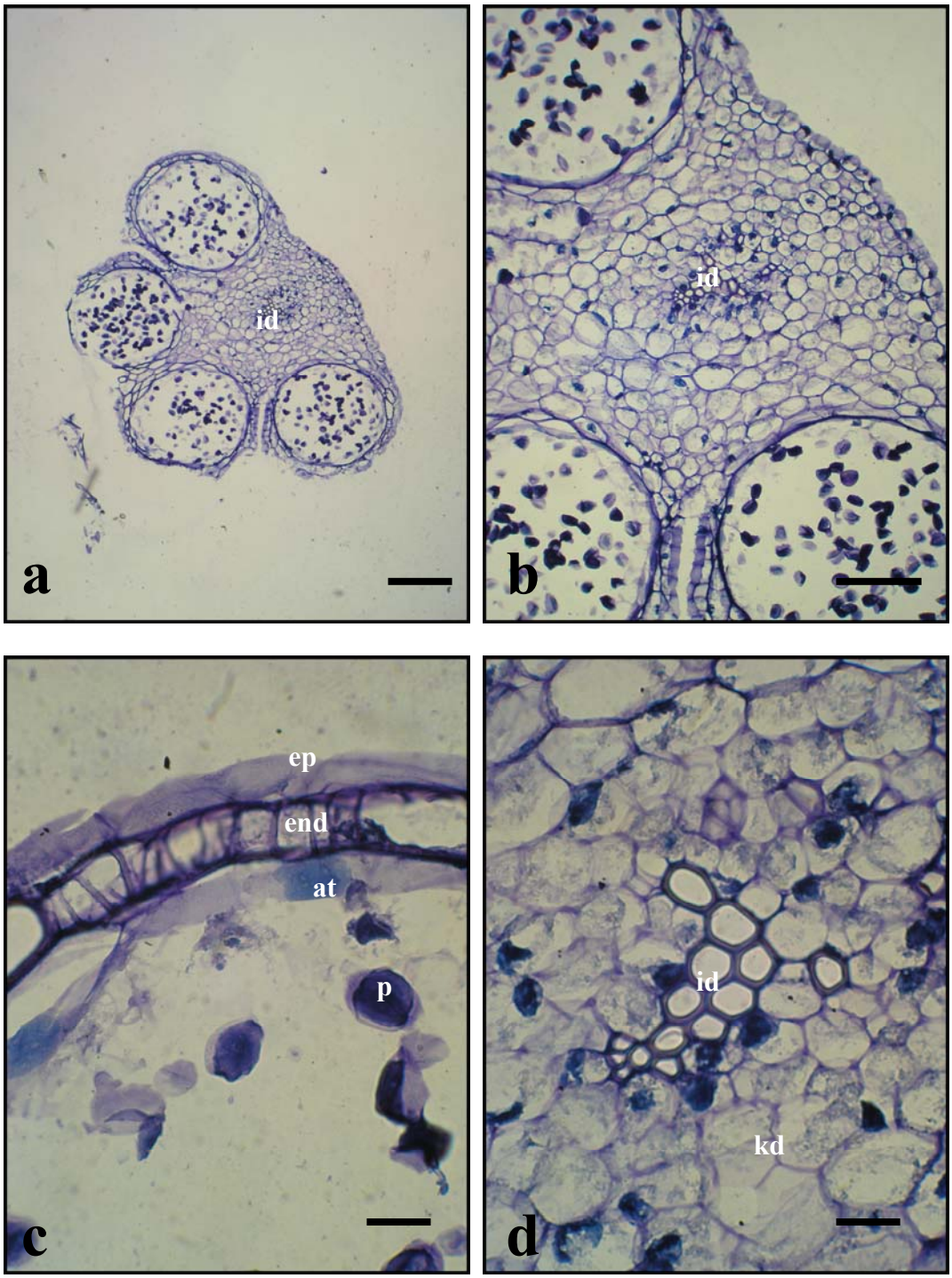
Şekil 4.7. PAS ile muamele edilmiş *L. aestivum*'un mayoz-I evresindeki anterin boyuna kesitleri. a, anter lokusundaki mikrospor ana hücreleri; b, konnektif doku, bar=20µm (end, endotesyum; ep, epidermis; kd, konnektif doku; PAH, polen ana hücresi)



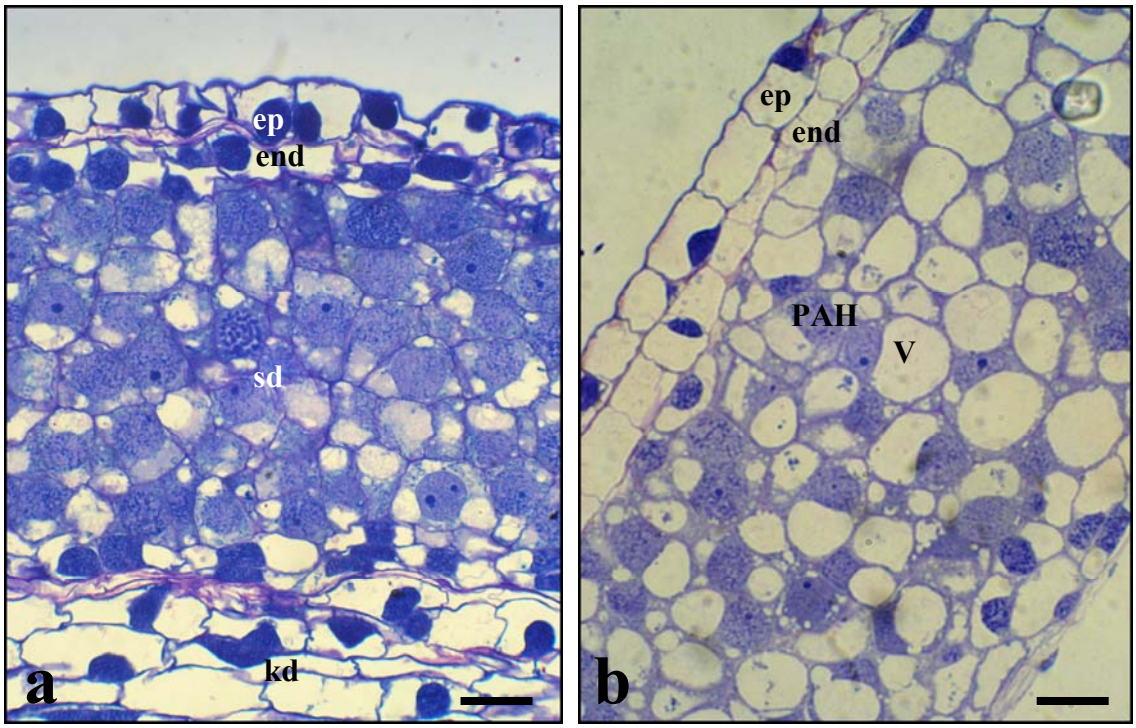
Şekil 4.8. PAS ile muamele edilmiş *L. aestivum*'un tetrad evresindeki anterin boyuna kesitleri. a, tapetum hücreleri (teğetsel kesit); b, tetradlar; c, konnektif dokuya bitişik tapetum hücreleri; d, konnektif doku ve iletim demetleri (ok), bar=20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; id, iletim demeti; kd, konnektif doku; t, tetrad; ta, tapetum)



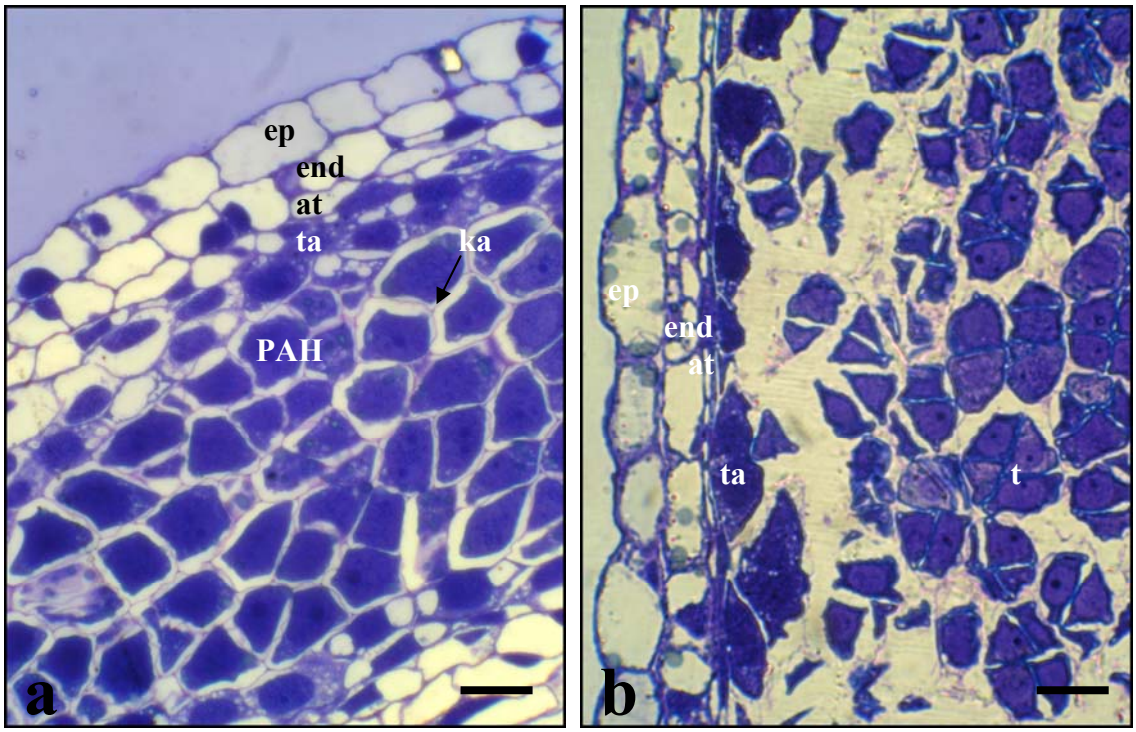
Şekil 4.9. PAS ile muamele edilmiş *L. aestivum*'un mikrospor evresindeki anterin boyuna kesitleri. a, anterin boyuna kesitinin genel görünüşü, bar=100µm; b, anter çeperi ve mikrosporlar, bar=20µm; c, konnektif doku, mikrosporlar ve bozulmaya başlayan tapetum hücreleri, bar=20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; kd, konnektif doku; ms, mikrospor; ta, tapetum)



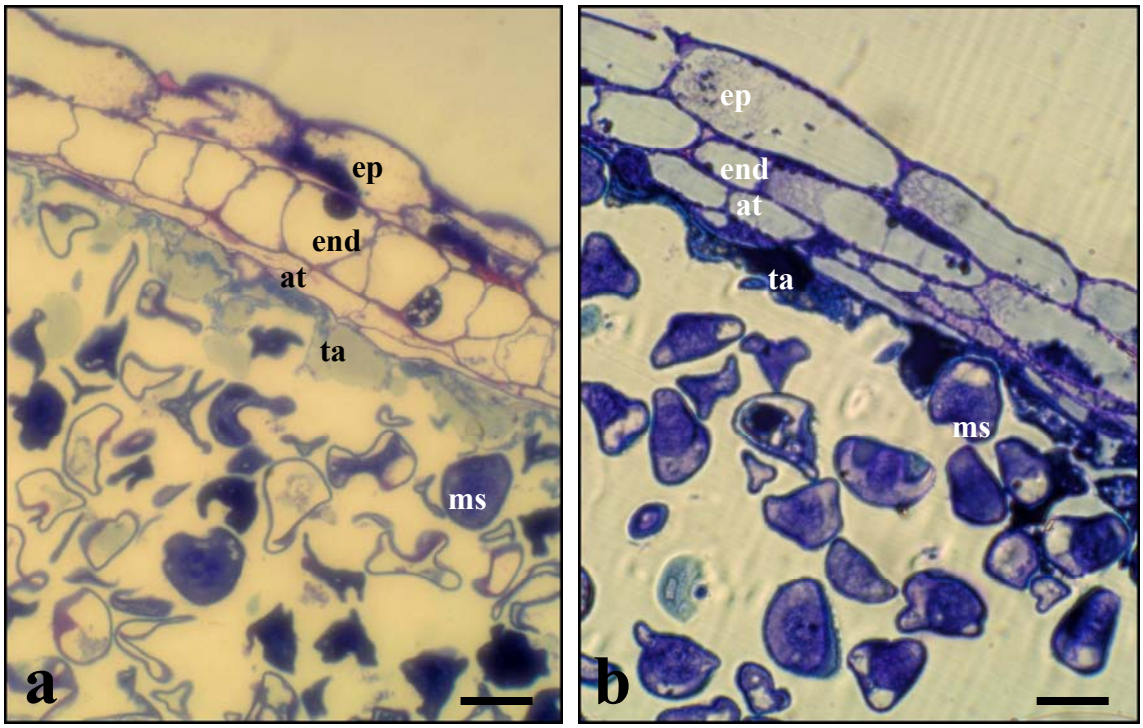
Şekil 4.10. PAS ile muamele edilmiş *L. aestivum*'un olgun anterin enine kesitleri. a, bar=200µm; b, bar=100µm; c, olgun anter çeperi, bar=20µm; d, konnektif dokudaki iletim demetleri, bar=20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; id, iletim demeti; kd, konnektif doku; p, polen)



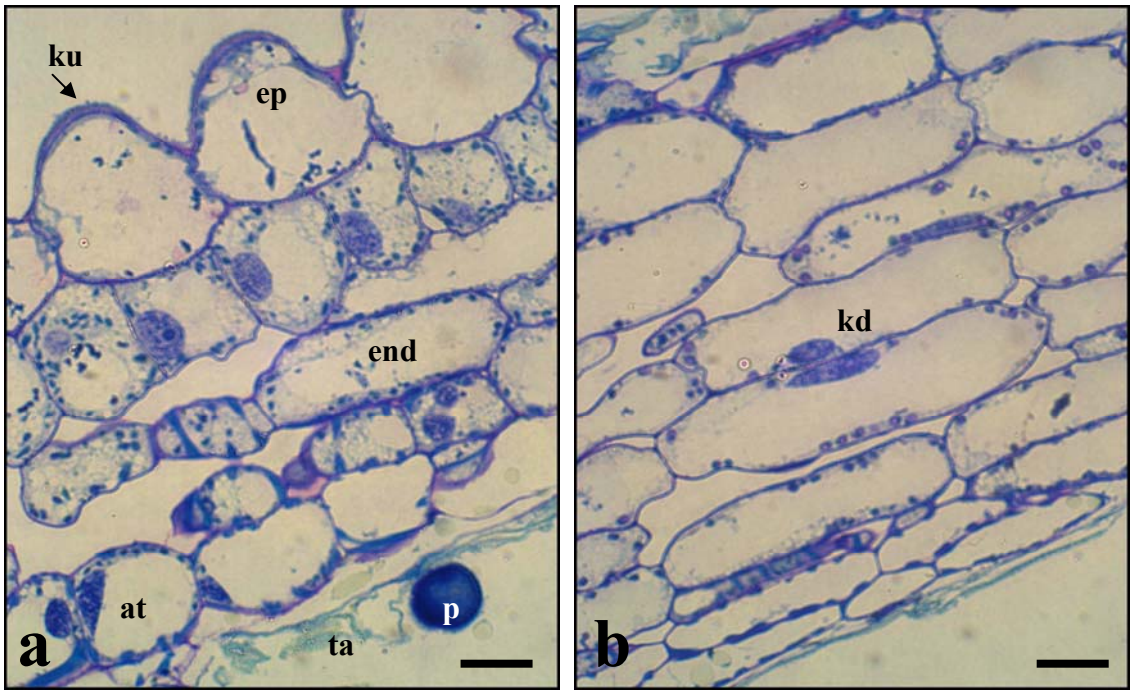
Şekil 4.11. a, *L. aestivum*'un toluidin mavisi ile muamele edilmiş anterlerin boyuna kesitleri. a, sporogen doku evresindeki anter kesiti; b, Polen ana hücresi evresindeki anter kesiti, bar 20µm (end, endotesyum; ep, epidermis; kd, konnektif doku; PAH, polen ana hücresi; sd, sporogen doku; V, vakuol)



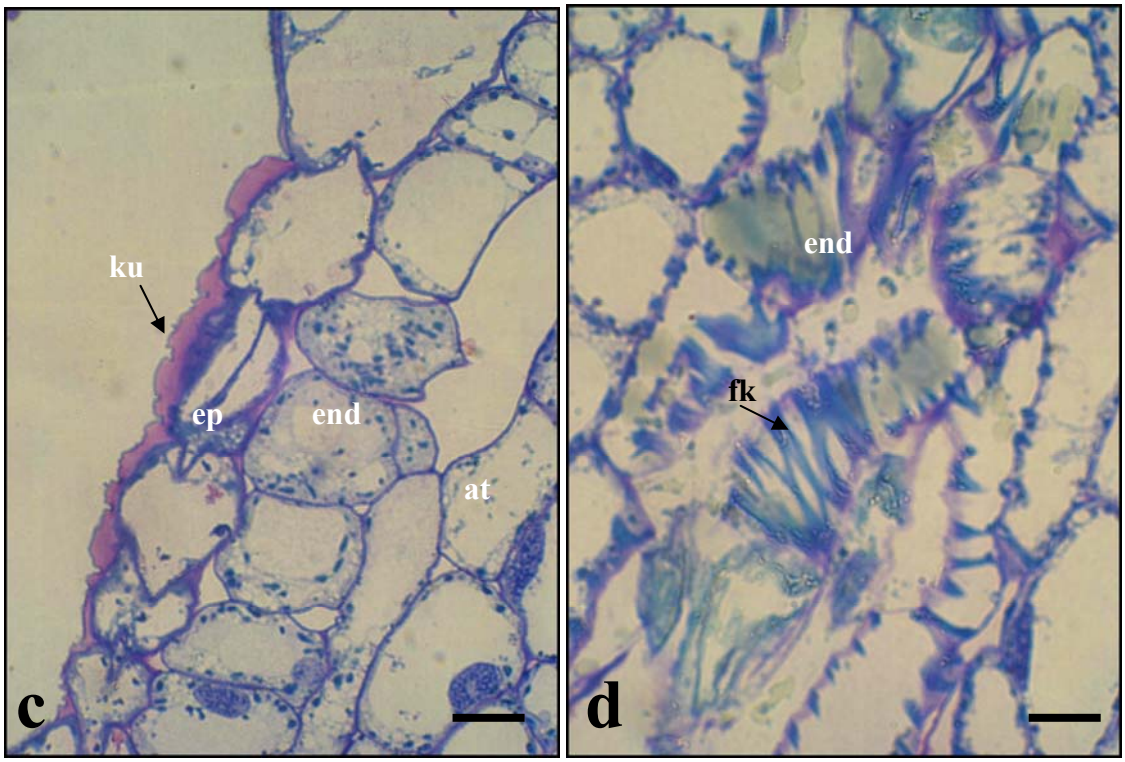
Şekil 4.12. a, *L. aestivum*'un toluidin mavisi ile muamele edilmiş mayoz-I evresindeki anterin boyuna kesiti; b, tetrad evresindeki anterin boyuna kesiti, bar 20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; ka, kalloz; PAH, polen ana hücresi; t, tetrad; ta, tapetum)



Şekil 4.13. *L. aestivum*'un toluidin mavisi ile muamele edilmiş tek nukleuslu mikrospor evresindeki anterinin boyuna kesitleri, a, erken evre; b, geç evre, bar 20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; ms, mikrospor; ta, tapetum)



Şekil 4.14. *L. aestivum*'un toluidin mavisi ile muamele edilmiş olgun polen evresindeki anterin boyuna kesiti. a, anter çeperi; b, konnektif doku. Bar= 20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; kd, konnektif doku; ku, kutikula; p, polen; ta; tapetum)



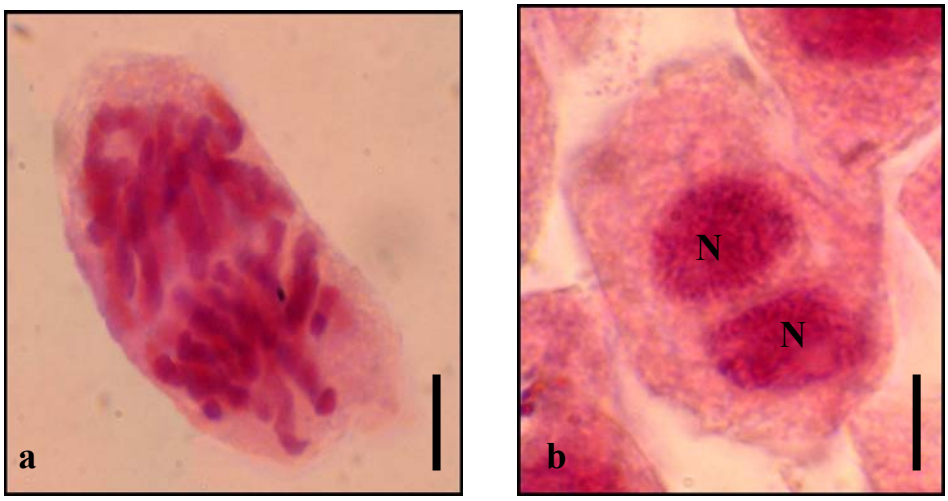
Şekil 4.14. (devam) *L. aestivum*'un toluidin mavisi ile muamele edilmiş olgun polen evresindeki anterin kesitleri. c, epidermis hücrelerinin dış yüzeyinde kütin kalınlaşmaları (ok) (boyuna kesit); d, endotesyum tabakasındaki fibrilsi kalınlaşmalar (ok) (teğetsel kesit) Bar= 20µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; fk, fibrilsi kalınlaşma; ku, kutikula; ta; tapetum)

4.2.1.3. Tapetum Hücrelerindeki Bölünme Tipleri

L. aestivum'un anter çeperinin tapetum hücrelerinde, normal mitoz bölünme ve sekonder nukleus bölünmeleri ile nukleus birleşmeleri görülmüştür.

4.2.1.3.1. Normal Mitoz Bölünme

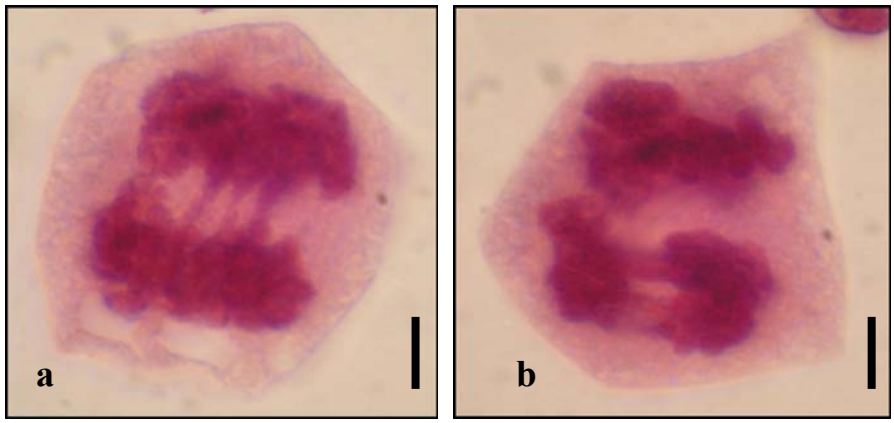
Polen ana hücreleri mayoz bölünmeye başlamadan önce tapetum hücrelerinin nukleus hacimlerinin arttığı görülür. Anafaz evresinde kromatidler normal olarak kutuplara çekilirken, telofazda kromatidlerin spiralleri gevşer ve nukleus zarı oluşur. Karyokinezi sitokinez takip etmediği için bu iki nukleus aynı hücre içinde bulunur (Şekil 4.15 a,b).



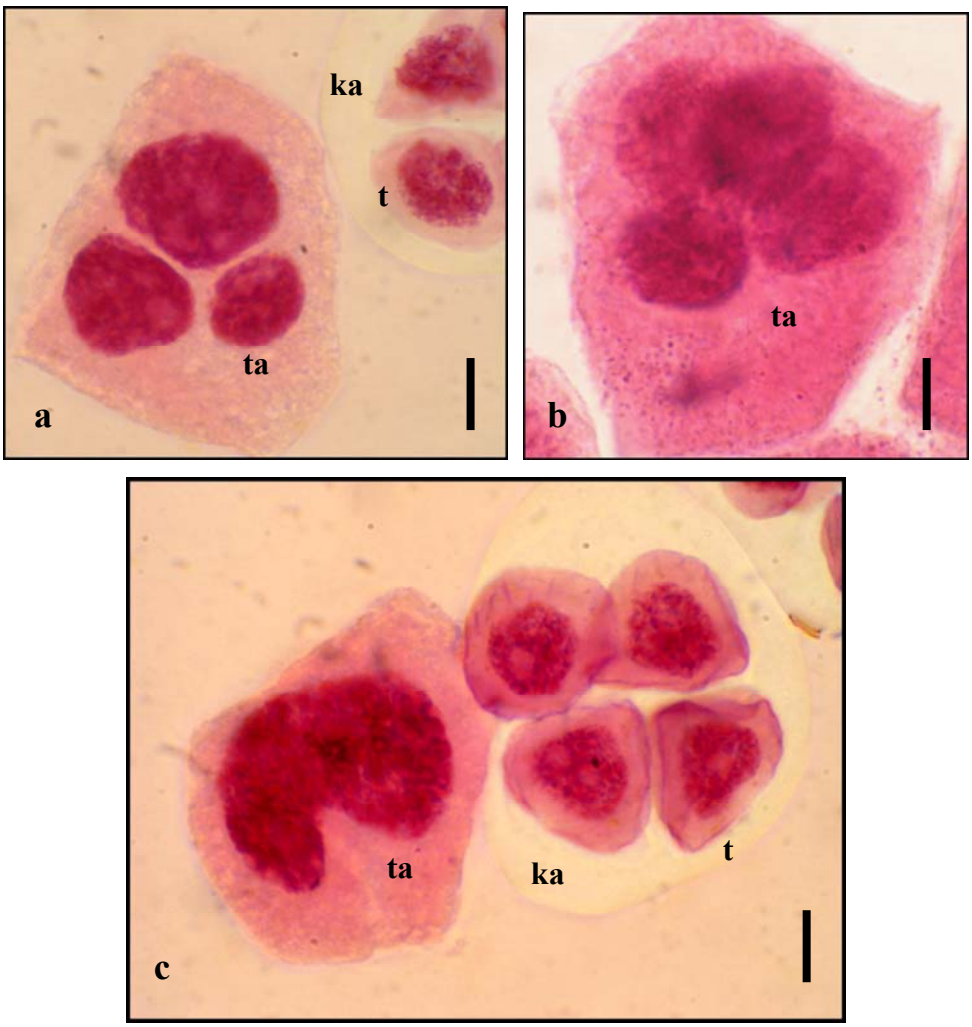
Şekil 4.15. *L. aestivum*'da normal mitoz evresindeki tapetum hücreleri a, anafaz; b, iki nukleuslu tapetum hücresi. Bar=10µm (N, nukleus)

4.2.1.3.2. Sekonder Nukleus Bölünmeleri ve Birleşmeleri

Tapetum hücrelerinde normal mitoz bölünme sonucunda iki nukleuslu tapetum hücreleri oluşur (Şekil 4.15b). Bu hücrelerin sitoplazmalarında bir artış görülür ve bunlar daha sonra tekrar mitoz geçirirler. Sekonder nukleus bölünmelerinde normal anafaz evresi görüldüğü gibi anormal anafaz evreleri de gözlendi. Bu evrede kromozom köprülerinden (Şekil 4.16a,b) dolayı nukleusların birleştiği görüldü. Nukleus sayısı ve hacimlerinin farklılık gösterdiği, nukleus sayılarının 1 ile 4 arasında (Şekil 4.17b) değiştiği, tetrad evresinde ise genellikle bütün nukleusların birleşerek poliploid nukleusları (Şekil 4.17c) oluşturdukları gözlendi.



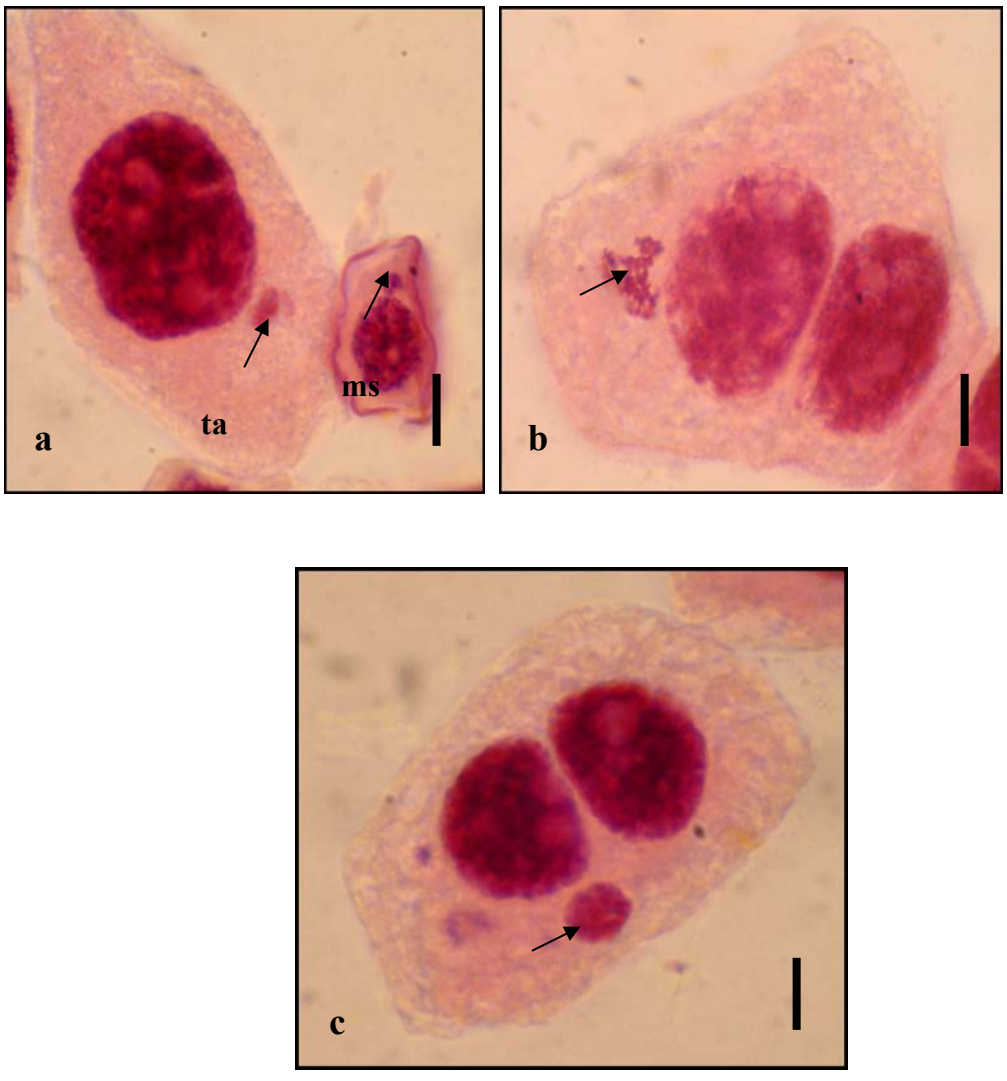
Şekil 4.16. *L. aestivum*'un tapetum hücrelerinde görülen sekonder nukleus bölünmeleri; Kromozom köprüleri içeren anafaz evreleri. Bar= 10µm



Şekil 4.17. *L. aestivum*'un tapetum hücrelerinde sekonder nukleus bölünmeleri ve nukleus birleşmeleri a, farklı poliploid kromozom sayısına sahip üç nukleus içeren tapetum hücresi ve tetrad; b, dört nukleuslu tapetum hücresi; c, tetrad ve poliploid nukleuslu tapetum hücresi. Bar=10µm (ka, kalloz; t, tetrad; ta, tapetum)

4.2.1.3.3. Tapetum Hücrelerinde Görülen Anormallikler

L. aestivum'un tapetum hücrelerinde görülen normal mitoz ve sekonder nukleus bölünmelerinin telofaz evresinde nukleus zarı oluştuktan sonra bazı hücrelerin sitoplazmasında ekstra kromatin parçacıkları (oklar) gözlenmiştir (Şekil 4.18a,b,c). Tapetum hücrelerindekine benzer bu durum çok nadir olarak bazı mikrosporlarda da görülmektedir (Şekil 4.18a).



Şekil 4.18. *L. aestivum*'un tapetum hücrelerinde görülen bazı anormallikler. a,b, kalgın kromozomlar (oklar); c, mikronukleus (ok); Bar=10µm (ms, mikrospor; ta, tapetum)

4.2.1.4. Mikrosporogenez

Leucojum aestivum'da mayoz bölünme sonucunda oluşan mikrospor sayılarında ve polenlerin karyolojik yapısında bazı farklılıklar gözlendi. Bu nedenle mikrosporogenez ve mayozdaki düzensizlikler ayrıntılı olarak incelendi ve elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak verildi.

L. aestivum'da bir anter lokusundaki PAH'lerinde mayoz bölünmenin asinkronik olarak geçtiği gözlendi. Anterin tepe noktasındaki PAH'lerinde erken mayoz evreleri, taban kısmındakilerde ise daha geç mayoz evreleri gözlendi. Ayrıca aynı tomurcuğun anterleri arasında da asinkronizasyon olduğu saptandı.

İnterfaz: Bu evrede aynı anterden yapılan ezme preperatlarda polen ana hücrelerinin nukleusları hacim bakımından birbirinden farklılık göstermez. Polen ana hücrelerinin etrafında kalloz çeper bulunmaz (Şekil 4.19a).

Leptoten: Polen ana hücrelerinin nukleuslarındaki kromatin gevşek bir hal alır ve kalloz çeper kutupsal olarak oluşmaya başlar (Şekil 4.19b). Zigoten evresinden önce kalloz çeper oluşumu tamamlanır (Şekil 4.19c).

Zigoten: Kromatin materyali bu evrede gevşek bir hal alarak hücre boyunca yayılır (Şekil 4.19d).

Pakiten: Homolog kromozomlar bir araya gelir. Hücrenin merkezinde yer alan nukleus hücrenin kenarına çekilir. Hücre zarına bitişik yoğun bir halde yer alır. Bu evreye buket evresi de denir (4.19e).

Diploten: Bu evrede bivalent kromozomların boyları kısalmaya başlar (Şekil 4.19f).

Diakinez: Bu evrede 11 bivalent sayıldı fakat bazıları farklı düzlem üzerinde bulunduğundan hepsi aynı düzlemde görüntülenemedi (Şekil 4.19g).

Metafaz I: İncelenen hücrelerin çoğunda kromozomların ekvator tablasında normal dizildikleri gözlendi (Şekil 4.19h). Bazı hücrelerde ise bazı kromozomların metafaz plağını oluştururken geri kaldıkları görüldü (Şekil 4.21a).

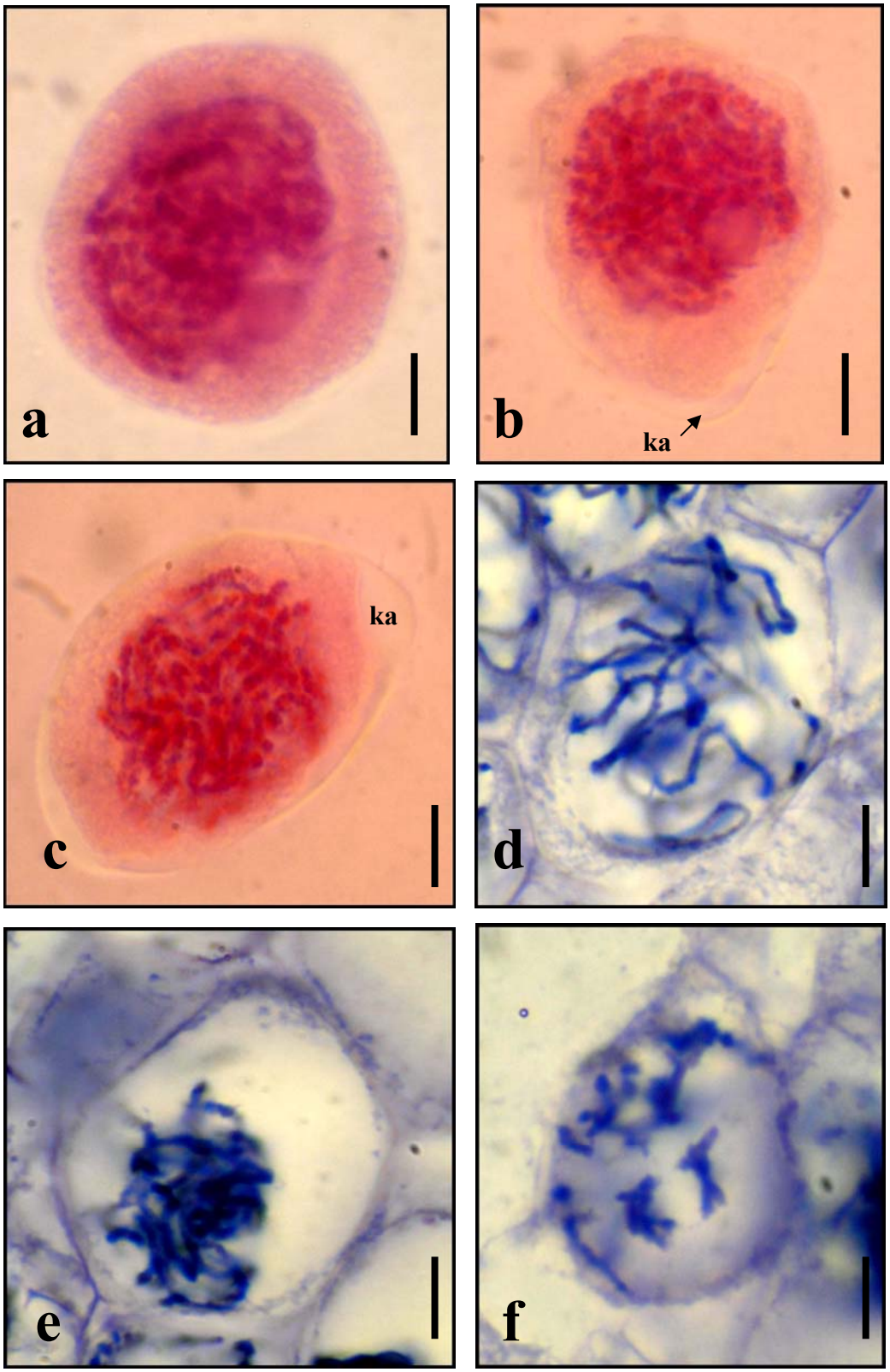
Anafaz I: Mayoz bölünmenin anafaz I evresinde, bazı hücrelerde, kromozomların kutuplara normal çekildikleri (Şekil 4.19i) halde, bazı hücrelerde kalgın kromozomların bulunduğu (Şekil 4.21b), bazılarında ise köprü oluşumu (Şekil 4.21c) gibi anormallikler saptandı.

Telofaz I: Bu evrede normal olarak homolog kromozomlar kutuplara çekilirken (Şekil 4.19j) bazı hücrelerde kutuplara çekilmemiş kromozomlar ile kromatin şeklinde köprüler görüldü (Şekil 4.21d). Telofaz sonunda iki nukleus arasında orta lamel oluşarak diad meydana geldiği ve süksesif tip sitokinez gözlendi.

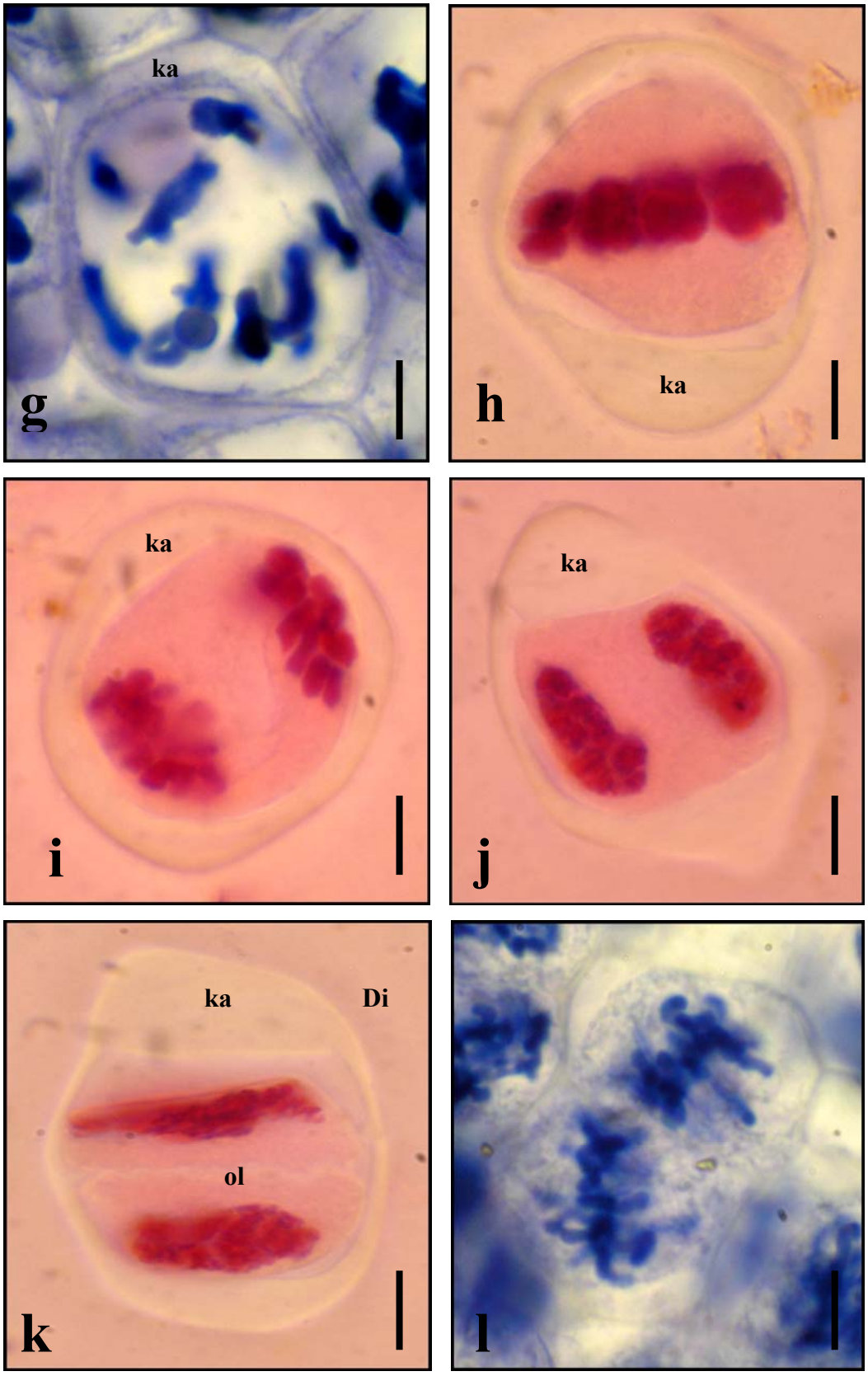
Metafaz II: Genellikle kromozomların ekvator tablasında düzenli olarak dizildikleri (Şekil 4.19l), bazı hücrelerde ise ekvator tablasında dizilmeyen kromozomlar görüldü (Şekil 4.21e).

Anafaz II: Normal olarak ekvator tablasında dizilen kromozomların kromatidleri kutuplara düzenli bir şekilde çekilmeye başladığı gözlendi (Şekil 4.19m). Bazı hücrelerde ise asinkronizasyon görüldü. Diadın bir hücresi metafazda iken diğeri düzensiz bir anafaz evresinde olduğu dikkati çekti (Şekil 4.21f).

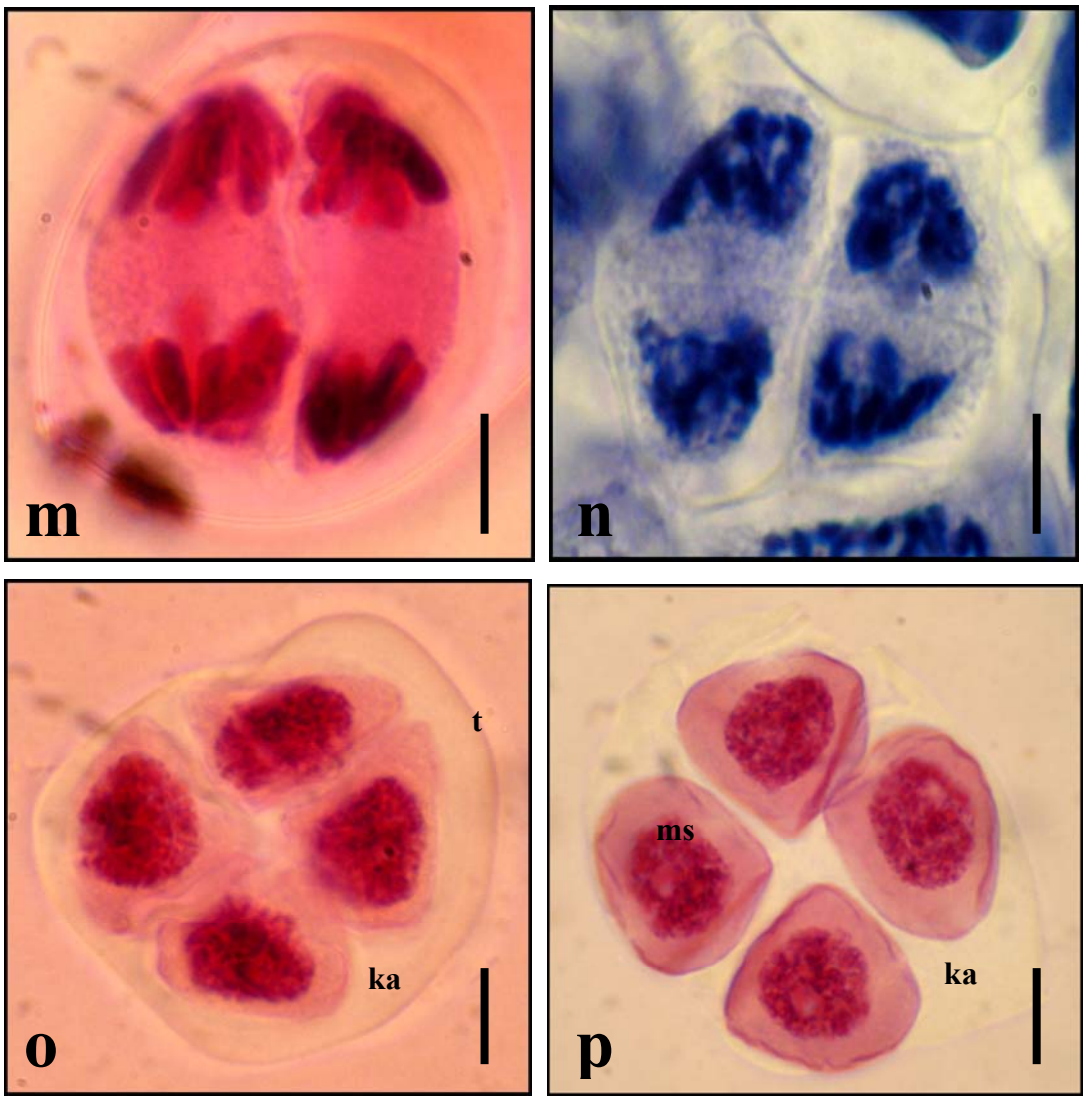
Tetradlar: Telofaz II sonunda 4 farklı tip tetradın oluştuğu saptandı. Genelde izobilateral (Şekil 4.20a) ve dekusat (Şekil 4.20b) tip tetradlar gözlenirken nadiren linear (Şekil 4.20c) ve T (Şekil 4.20d) şeklindeki tetradlara da rastlandı. Tetradların bazılarında mikronukleuslar gözlendi (Şekil 4.20 g,h). Tetradlarda iyi gelişmiş kalloz çeper görüldü (Şekil 4.19o). İlerleyen evrelerde mikrosporların etrafındaki kalloz çeper parçalanır ve mikrosporlar serbest kalırlar. Mikrosporogenez genellikle düzenli olmasına rağmen çeşitli evrelerde bazı düzensizlikler gözlenmiştir. Bu düzensizliklerin oranı % 8 olarak saptanmıştır (Tablo4.1).



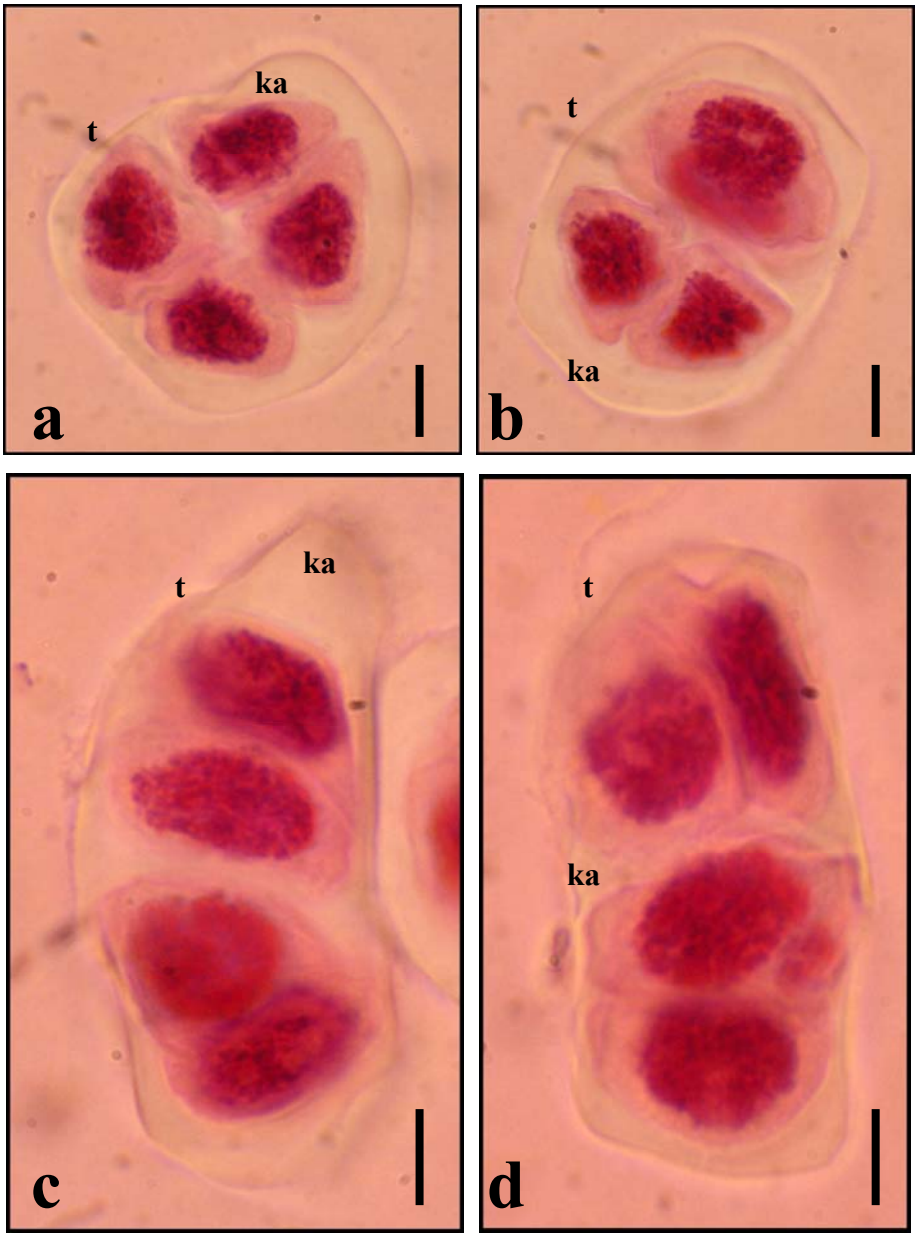
Şekil 4.19. *L. aestivum*'un polen ana hücresinde süksesif tipte mayoz bölünme. a, interfaz; b,c leptoten; d, zigoten; e, buket halindeki pakiten; f, diploten. Bar=10µm (ka, kalloz)



Şekil 4.19. (devam) *L. aestivum*'un polen ana hücresinde süksesif tipte mayoz bölünme. g, diakinez; h, metafaz I; i, anafaz I; j, telofaz I; k, diad (interfaz); k, profaz II; l, metafaz II, Bar=10µm (Di, diad; ka, kalloz; ol, orta lamel)



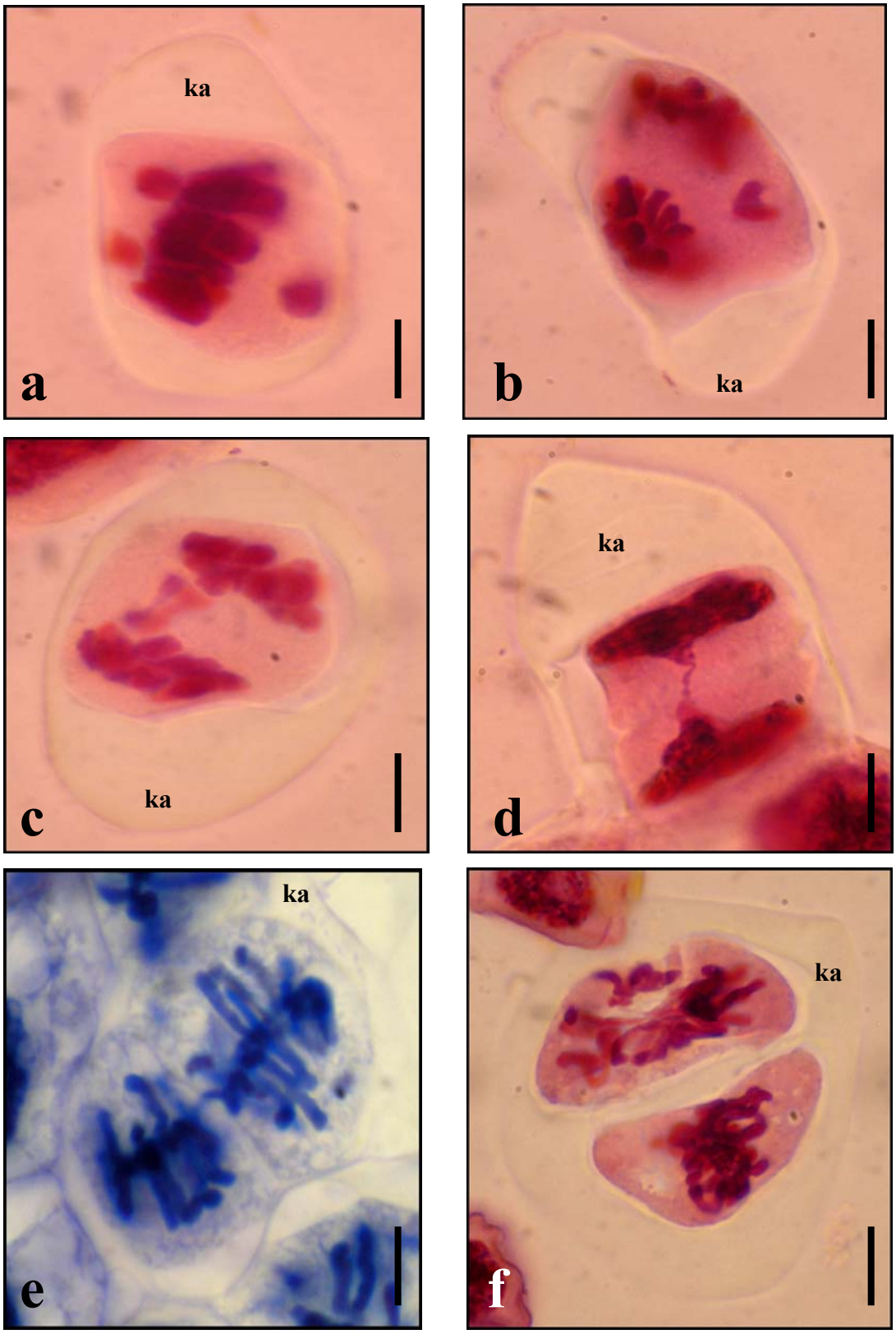
Şekil 4.19. (devam) *L. aestivum*'un polen ana hücresinde süksesif tipte mayoz bölünme. m, anafaz II; n, telofaz II; o, tetrad; p, mikrosporlar. Bar=10µm (ka, kalloz; ms, mikrospor; t, tetrad)



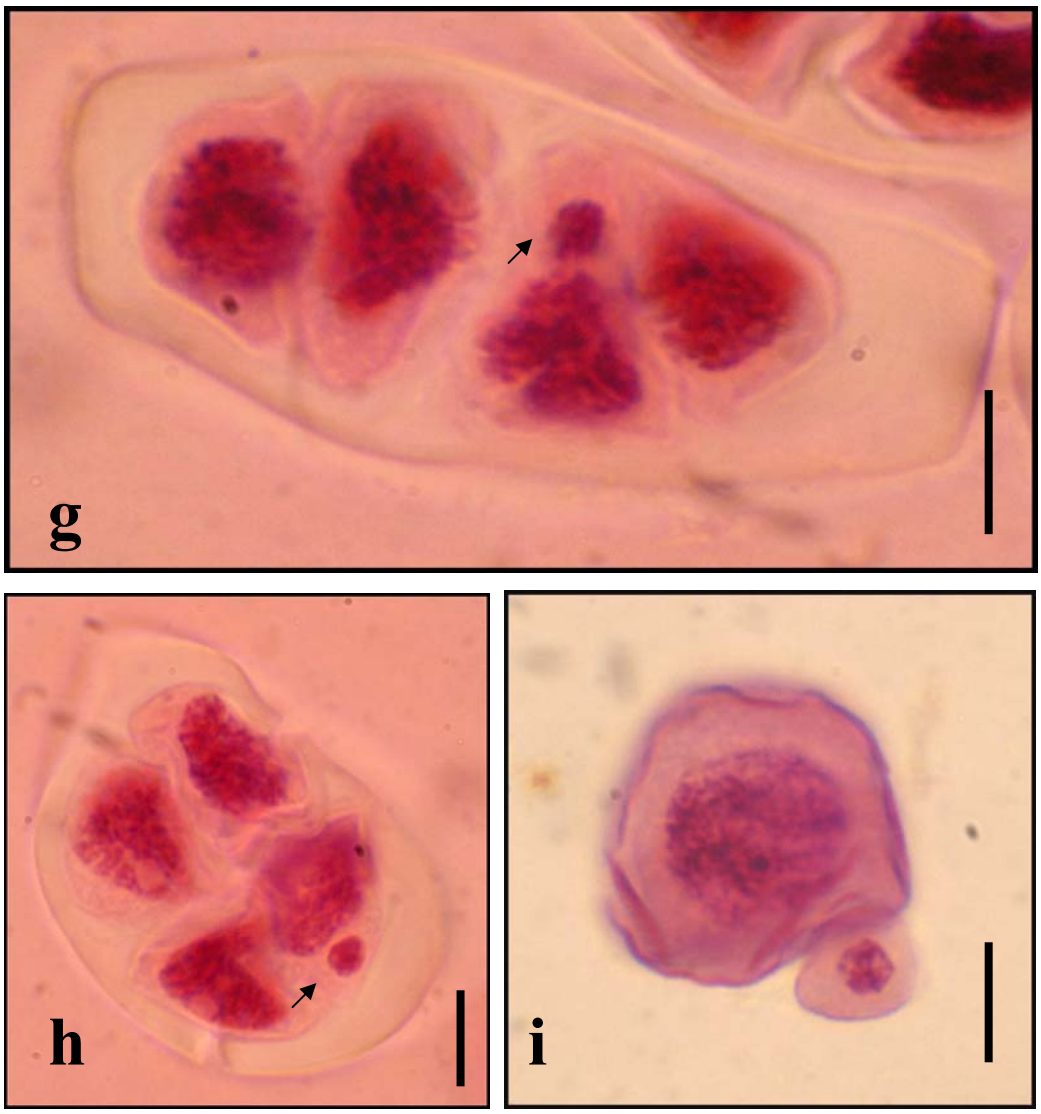
Şekil 4.20. *L. aestivum*'da görülen tetrad tipleri; a, izobilateral; b, dekusat; c, linear; d, T şekli. Bar=10µm (ka, kalloz; t, tetrad)

Tablo 4.1. *L. aestivum*'un PAH'lerindeki mayoz bölünme evrelerinde görülen anormal hücrelerin yüzdesi

	Profaz I	Metafaz I	Anafaz I	Telofaz I / Diad	Metafaz II	Anafaz II	Telofaz II/ Tetrad	Toplam
Sayılan hücre sayısı	228	112	28	176	100	68	308	1000
Normal hücre sayısı	228	84	20	176	84	60	228	920
Anormal hücre sayısı	---	28	8	---	16	8	20	80
Anormal hücre %'si	0	25	28.5	0	20	11	6.4	8



Şekil 4.21. *L. aestivum*'da mikrosporogenez sırasında görülen bazı anormallikler. a, metafaz I'de ekvator plağında dizilmeyen kromozomlar; b, anafaz I'de kalgın kromozom; c, anafaz I'de kromozom köprüleri; d, telofaz I'de kromatid köprüsü; e, metafaz II'de kalgın kromozom; f, metafaz II'de ekvator plağında düzensizlik; Bar=10µm (ka, kalloz)

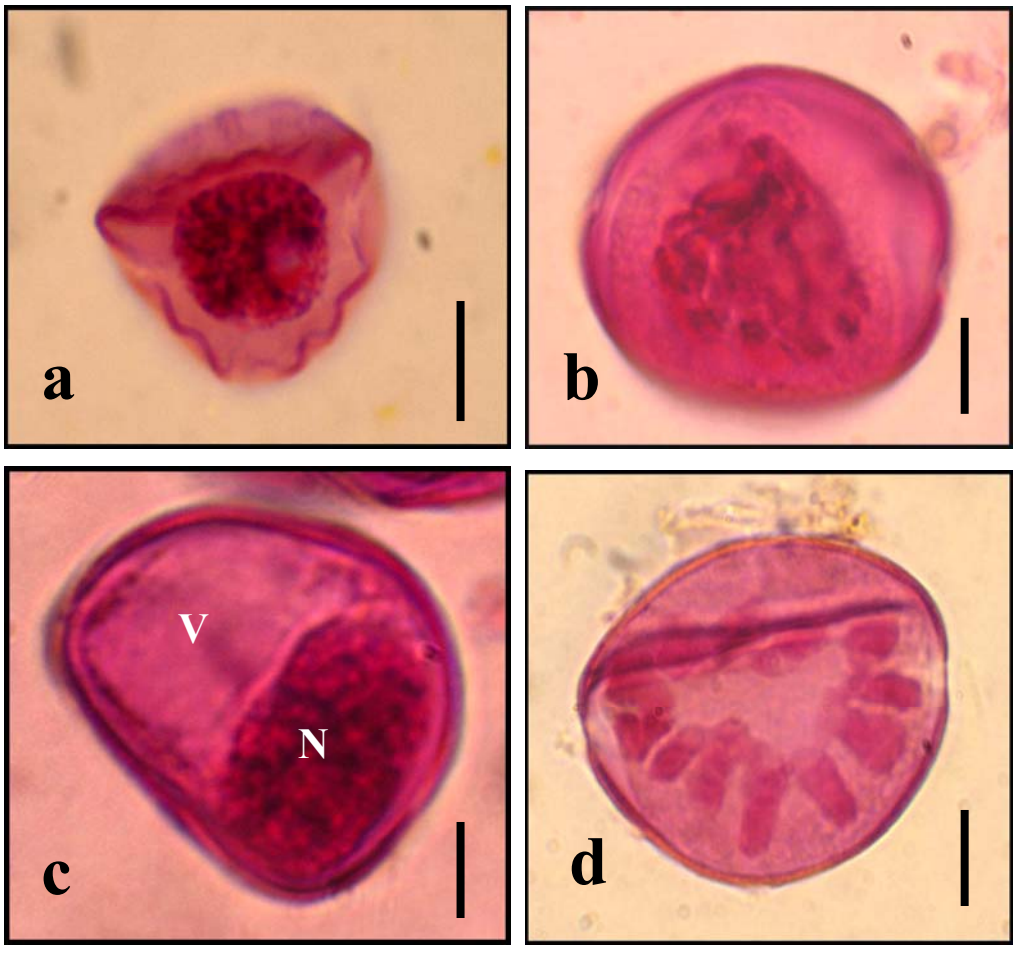


Şekil 4.21. (devam) *L. aestivum*'da mikrosporogenez sırasında görülen bazı anormallikler. g,h linear ve izobilateral tetrad evresindeki mikronukleuslar (oklar); i, farklı büyüklükte nukleus içeren normal ve anormal mikrosporlar. Bar= 10µm

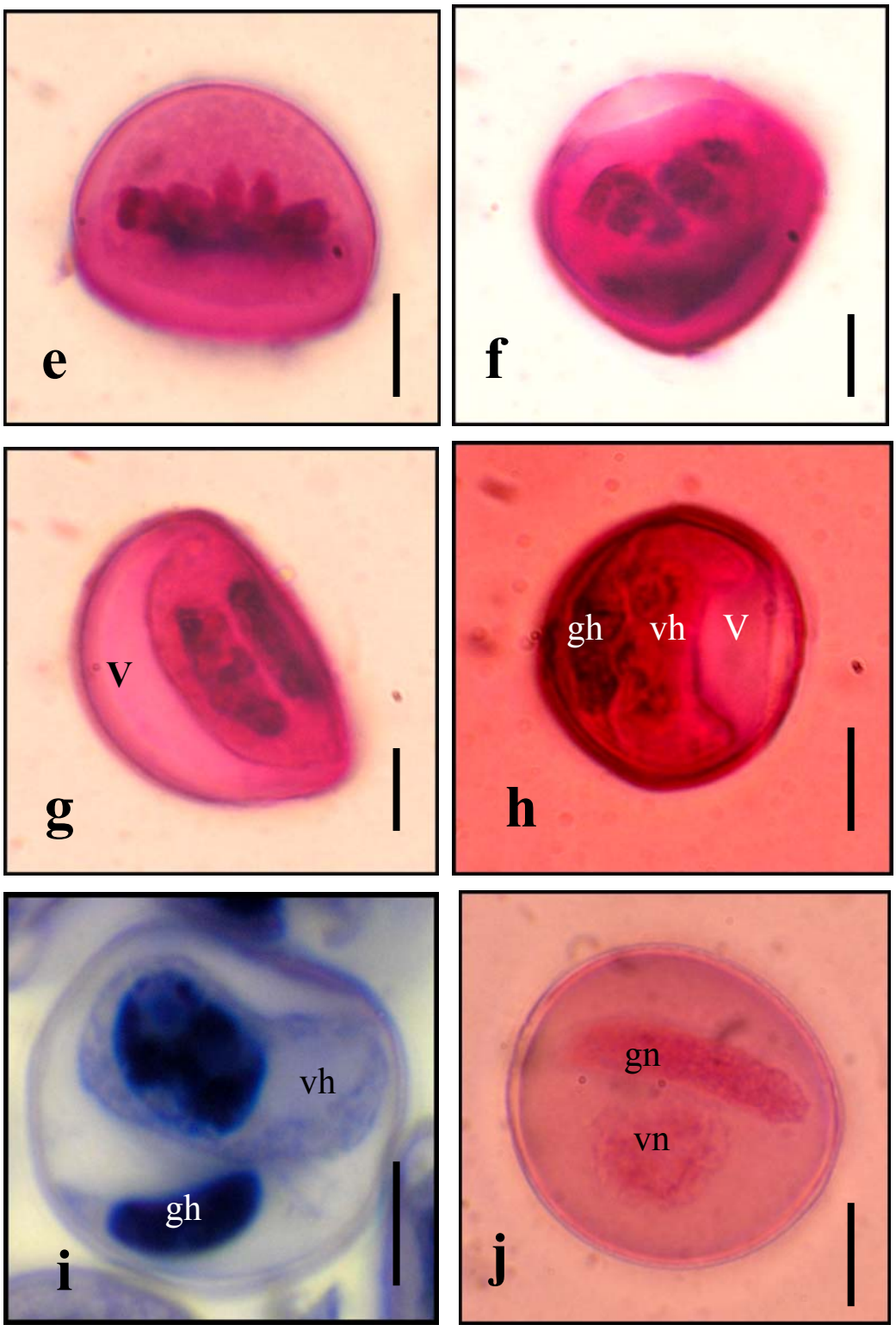
4.2.1.5. Polen Mitozu

Leucojum aestivum'da tetrad evresindeki kallozun parçalanmasıyla serbest kalan mikrosporların midye şeklinde ve hücre çeperlerinin buruşuk olduğu görüldü (Şekil 4.22a). İlerleyen evrelerde mikrosporların şiştiği, hücre çeperinin düzleştiği (Şekil 4.22b) ve bir kutupta vakuol oluştuğu gözlendi. Nukleusun ise hücre içinde çepere

yakın bir bölgede yeraldığı ve mikrosporda polaritenin oluştuğu görüldü (Şekil 4.22c). Polen mitozunda metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinin normal geçtiği gözlendi (Şekil 4.22d,e,f,g). Polen mitozu sonunda çepere yakın olan nukleusun generatif hücreyi diğerinin vegetatif hücreyi oluşturduğu görüldü (Şekil 4.22h,i). Olgunlukta iki hücreli olan polenlerde mercek şeklindeki generatif hücre nukleusunun daha koyu boyandığı, küresel vegetatif hücre nukleusunun ise daha az boyandığı gözlendi (Şekil 4.22j). Polen mitozu sonunda oluşan normal polenlerin yanı sıra bazı anormal polenlere de rastlandı (4.23a,b,c).



Şekil 4.22. *L. aestivum*'da polen mitozu. a, buruşuk mikrospor evresi; b, Şişmiş mikrospor; c, polarize olmuş vakuollü mikrosporda profaz evresi; d, metafaz evresinin üstten görünüşü; Bar=10µm (N, nukleus; V, vakuol)



Şekil 4.22. (devam) *L. aestivum*'da polen mitozu. e, metafaz evresinin yandan görünüşü; f, anafaz; g, telofaz; h, vakuollü polen evresi; i, j olgun polen. Bar=10µm (gh, generatif hücre; gn, generatif nukleus; V, vakuol; vh, vegetatif hücre; vn, vegetatif nukleus)

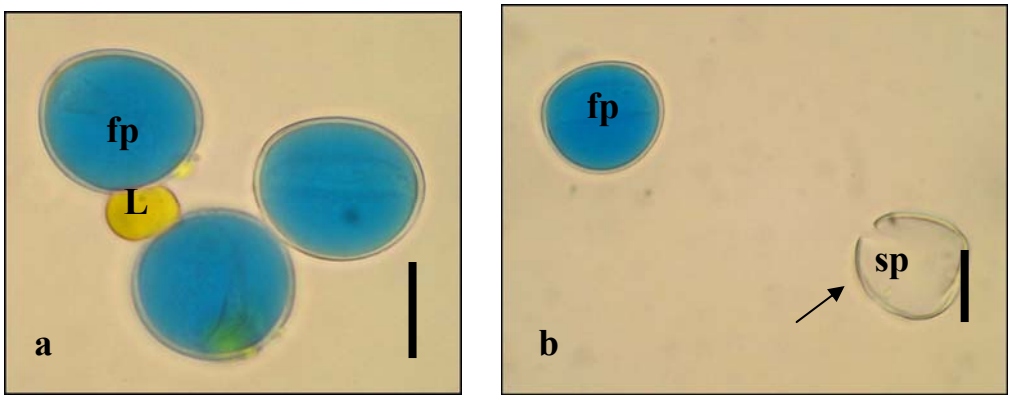


Şekil 4.23. *L. aestivum*'un polenlerinde görülen bazı anormallikler. Bar=10µm

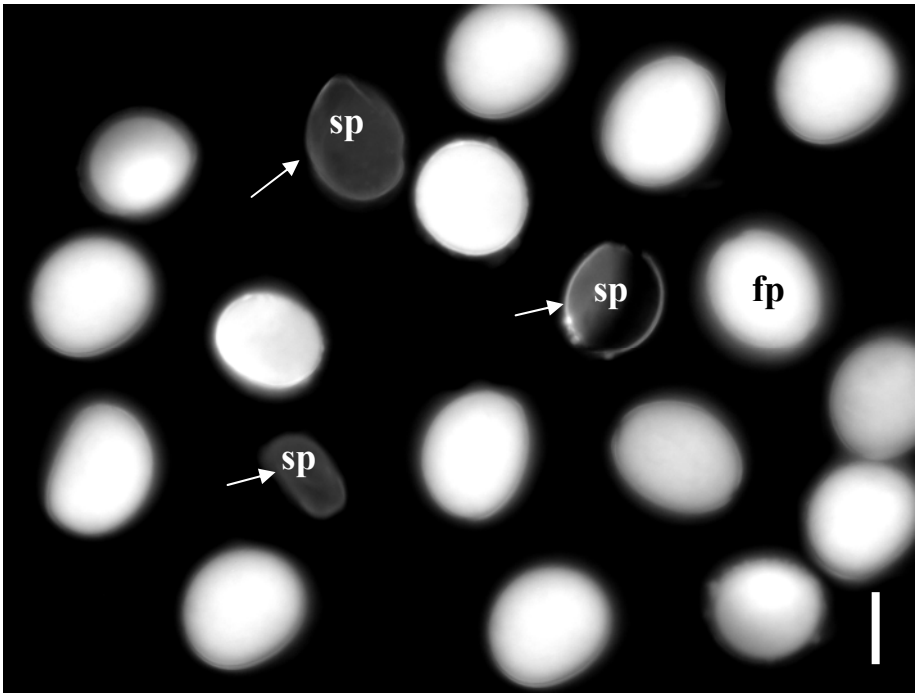
4.2.1.6. Polen Canlılığı

Leucojum aestivum'da polenlerinin canlılığı ışık ve floresans mikroskobu ile incelendiğinde genellikle iyi boyandıkları görüldü (Şekil 4.24a). Laktofenolde hazırlanan anilin mavisi (Şekil 4.24b) ve anilin blue (Merck) (Şekil 4.25) ile boyanan polenler fertil kabul edildi. 17216 adet polen sayıldı ve polen sterilite oranı %1.7 olarak bulundu.

100 adet polen boyu ölçülerek, ortalama polen boyunun 38.85±2.26µm, eninin 24.36±2.1µm olduğu saptandı. Polen taneleri bilateral simetrik, monokolpat, prolattır. Olgun polenler anterden atılırken iki nukleusludur. Generatif nukleus uzun ve mercek şeklinde, vegetatif nukleus ise loplu görünüştedir.



Şekil 4.24. *L. aestivum'* un olgun polen taneleri; a, anilin mavisi ile boyanmış fertil polenleri, b, fertil ve steril (ok) polenler, Bar=20µm (sp, steril polen; fp, fertil polen; L, lipid)



Şekil 4.25. *L. aestivum'*a ait fertil ve steril (oklar) polenlerin floresans mikrokobundaki görünüşleri, Bar= 20µm (sp, steril polen; fp, fertil polen)

Örneğin Orijini: Tavuk Ormanı- EDİRNE
Toplama Tarihi: 19.04.2005
Polen Tipi : Monokolpat
Polen Şekli : Prolat, P/ E =1.59 (W)
Ekzin : Ortalama kalınlık (İntin Dahil) 1.52 µm
Apertürler: Kolpuslar sivri uçlu, sınırları belirgin ve düzgün
Strüktür: Tektat, ekt/end ≈ 3/1
Skulptür: Retikulat
Ekzin/ intin ≈ 1.8

4.2.1.7. Mikrogametofit Gelişimi

Mikrogametofitin gelişimi *in vitro* kültür ortamında incelendi. *Leucojum aestivum*'un 15-20mm büyüklüğündeki yeni açmış çiçeklerinin anterlerinden elde edilen polen tanelerinin *in vitro* temel çimlenme ortamında çimlendiği görüldü (Şekil 4.26). 1000 adet polen sayıldı ve olgun polen tanelerinin çimlenme oranı %73 olarak bulundu. Çimlenen polen tüpleri sitolojik olarak incelendiğinde nukleus davranışları bakımından bazı farklılıklar görüldü. Bazı polen tüplerinde generatif ve vegetatif nukleusların tüp içinde ilerlemeyip, polen içinde kaldığı gözlendi (Şekil 4.27a,b).

Bazılarında ise her iki nukleusun da polen tüpü içinde ilerlediği görüldü. Normal olarak bu polen tüplerinin bazılarında vegetatif nukleus önde ilerlerken (Şekil 4.26d) bazı tüplerde ise generatif nukleusun önde ilerlediği dikkati çekti (Şekil 4.27c,d).

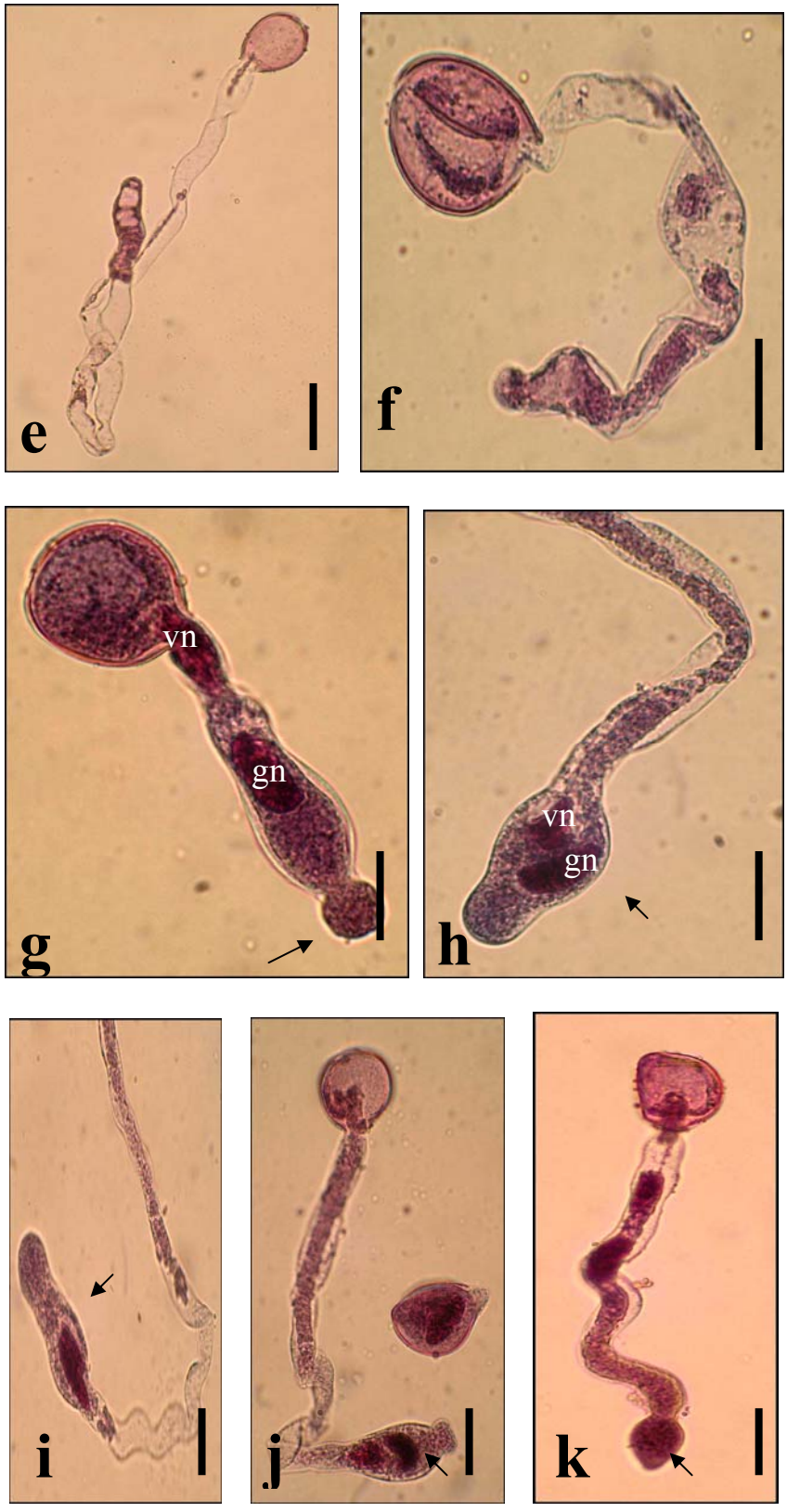
L. aestivum'un *in vitro* polen çimlenmesi sırasında normal tüplerin yanı sıra bazı anormal tüpler de gözlendi. Bu anormalliklerin, bazı polen tüplerinin zayıf gelişmesi (Şekil 4.27e,f) ve bazılarında ise tüp ucu şişmeleri (Şekil 4.27g,h,i,j,k) olduğu saptandı. *L. aestivum*'un hem ışık hem floresans mikroskobu (Şekil 4.28a,b) ile incelenen *in vitro* ortamda çimlenmiş polen tüplerinde kalloz tıpa oluşumu görülmediğinden *in vivo* ortamda çimlenmiş polen tüpleri incelendi. *In vivo* ortamdaki polen tüplerinin *in vitro* ortamdakilere göre çok daha uzun olduğu ve kalloz tıpaların oluştuğu görüldü (Şekil 4.29a,b).



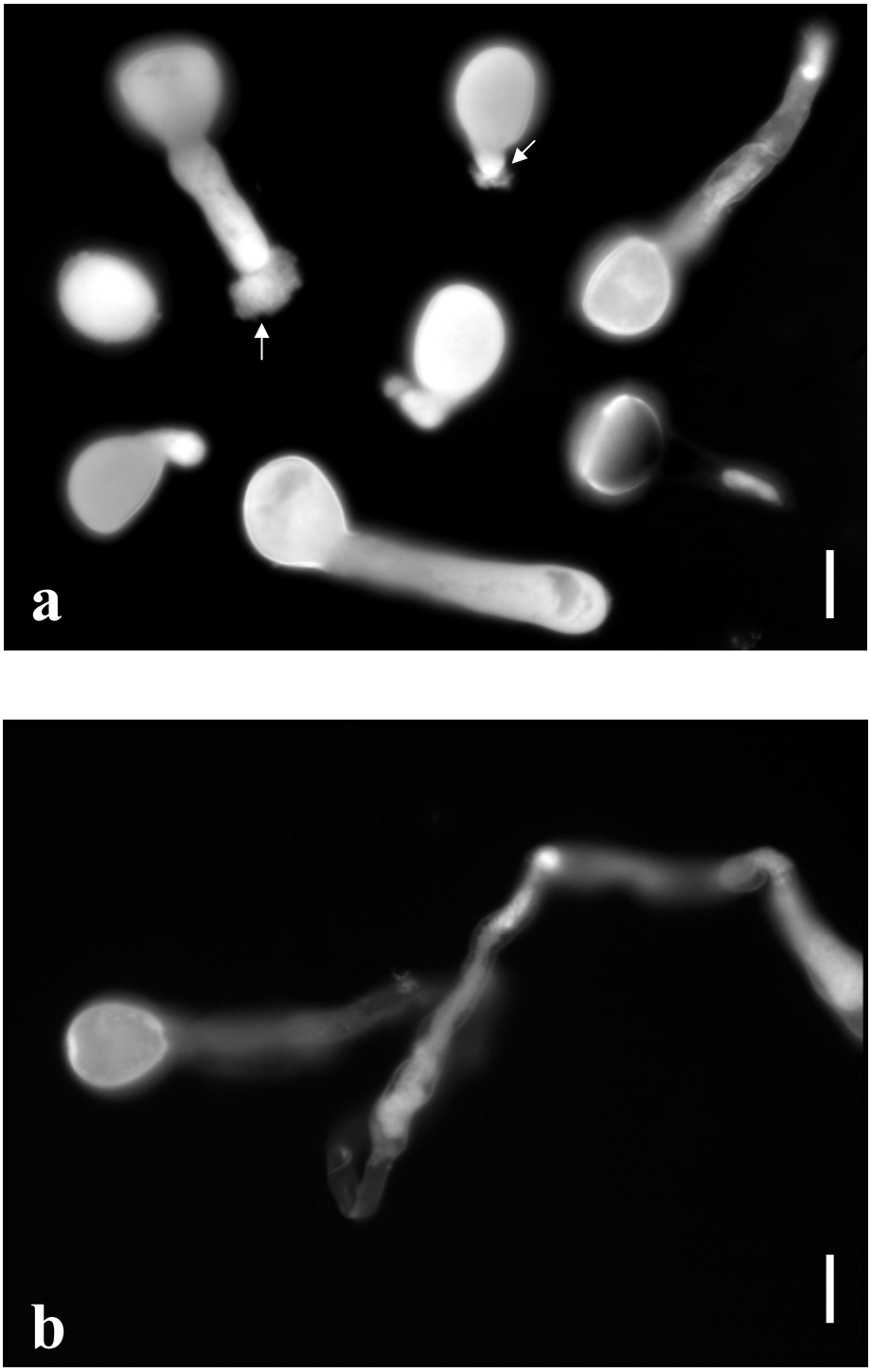
Şekil 4.26. *L. aestivum*'un *in vitro* kültür ortamındaki mikrogametofitin normal gelişim evreleri. a, çimlenmekte olan iki hücreli polen tanesi Bar=20µm; b,c, vegetatif ve generatif hücre nukleusunun polen tüpüne yönelmesi, Bar=20µm; d, vegetatif hücre nukleusunun uzayan tüpte ilerlemesi Bar=20µm, e, polen tüpünde sperm nukleusları Bar=20µm; f,g, polen tüpünün ucundaki sperm hücreleri, f, Bar=30µm; g, Bar=10µm (gn, generatif nukleus; sh, sperm hücresi; sn, sperm nukleusu; vn, vegetatif nukleus)



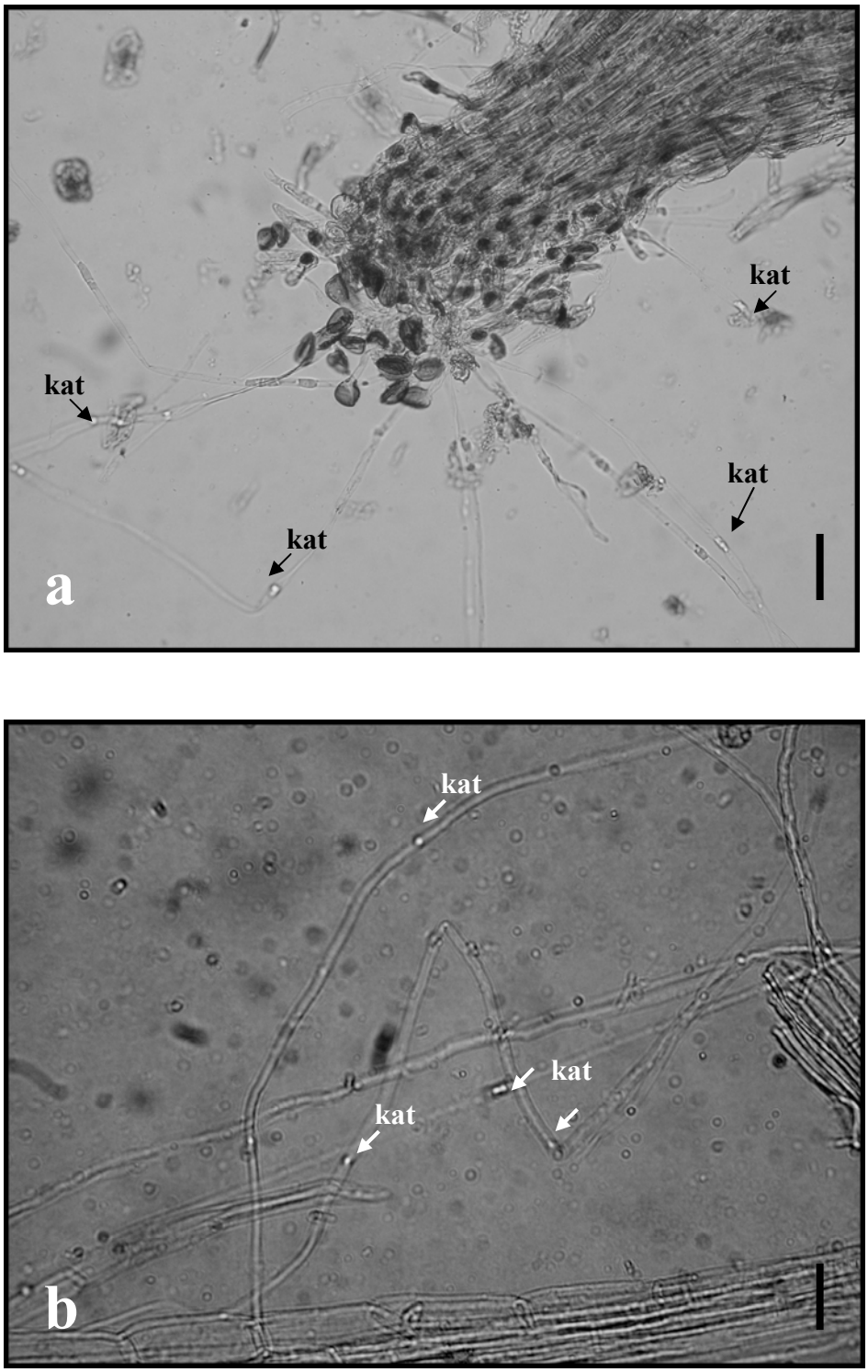
Şekil 4.27. *L. aestivum*'un *in vitro* kültür ortamındaki mikrogametofitin gelişiminde saptanan anormallikler. a,b, tüpte generatif ve vegetatif nukleuslar görülmeyen polen tüpleri c,d, generatif nukleusun önde ilerlediği polen tüpleri, Bar=20µm (gn, generatif nukleus; vn vegetatif nukleus)



Şekil 4.27. (devam) *L. aestivum*'un *in vitro* kültür ortamındaki mikrogametofitin gelişiminde saptanan anormallikler. e,f, zayıf gelişen polen tüpleri, e, Bar=30µm, f, Bar=20µm; g,h,i,j,k, tüp ucu şişmesi görülen polen tüpleri; Bar=20µm (gn, generatif nukleus; vn, vegetatif nukleus)



Şekil 4.28 *L. aestivum*'un *in vitro* ortamda çimlenen polen tüplerinin floresans mikroskobunda çekilmiş fotoğrafları, a, gelişmekte olan polen tüpleri ve bazı tüplerde gözlenen tüp ucu şişmeleri (oklar); b, uzamış polen tüpü; Bar=20µm



Şekil 4.29. *L. aestivum*'un *in vivo* ortamda çimlenen polen tüplerinde kalloz tıpa oluşumu (oklar), a, bar=120µm; b, bar=50µm (kat, kalloz tıpa)

4.2.1.8. Farklı Gelişim Evrelerinde Anter Çeperinin ve Sporogen Dokunun İnce Yapısı

Leucojum aestivum'da, erken mikrosporogenez, tetrad, tek nukleuslu mikrospor ve olgun polen evrelerinde anter çeperinin ve mikrosporların ince yapısı incelendi.

Mikrosporogenez öncesinde sporogen doku hücrelerinde nukleusun hücrenin bir tarafında yer aldığı ve organellerin dağılımda polarite gözlendi. Hücre organellerinin daha çok nukleus çevresinde toplandığı, diğer tarafta ise polizomların yoğun olduğu görüldü. Nukleus çevresinde az sayıda plastid ve mitokondri, GER ve birkaç diktiyozom ile farklı büyüklükte birkaç vakuol yer alır. GER'in ve diktiyozomların az geliştiği, vakuollerin genellikle çepere yakın olduğu, plastidlerin bölündüğü gözlendi. Mitokondrilerin kristalarının da çok fazla gelişmediği görüldü. Hücredeki çeper kalınlaşmasının homojen olduğu gözlendi (Şekil 4.30).

PAH'lerinin tapetum tabakasına bitişik olan kısımları incelendiğinde, PAH'lerinin nukleuslarının eukromatin, tapetum hücrelerindeki nukleusların ise heterokromatin bakımından zengin olduğu gözlendi. (Şekil 4.31). Hem PAH'leri arasında hem de PAH ile tapetum hücreleri arasındaki hücre çeperinde yer yer ince kalmış bölgelerin bulunduğu görüldü. PAH'leri organel içeriği bakımından tapetum hücrelerine göre daha yoğundur. Yine bu evrede de farklı büyüklükte ve bölünmekte olan plastidler (Şekil 4.32 -ok) ile mitokondriler gözlendi (Şekil 4.33-ok). GER'in az geliştiği, polizomların yoğun, diktiyozom ve vakuollerin az sayıda olduğu dikkati çekti.

Mayoz bölünmenin erken profaz I evresinde PAH'nde nukleusun büyük bir vakuolden dolayı hücrenin kenarında bulunduğu, hücre organellerinin ise nukleus ve hücre çeperi arasında yer aldığı gözlendi. Çok sayıda mitokondri ile az sayıda plastid, az gelişmiş GER'in bulunduğu saptandı (Şekil 4.34). Nukleus zarının çok sayıda por içerdiği ve çevresinde polizomların yoğun olduğu görüldü. (Şekil 4.35). Ayrıca PAH'leri arasındaki hücre çeperinde yer yer ince kalmış bölgeler gözlendi. Plazma zarı ayırt edildi. (Şekil 4.36). Daha ileri evrede mitokondri ve plastidlerin sayılarının arttığı, vakuollerin boyutlarında azalma ve sayılarında artış gözlendi. Nukleolus içeren

nukleuslarda eukromatin yoğundu (Şekil4.37). PAH'leri arasında kalan hücre çeperinin bazı bölgelerinde yer yer incelmeler bu evrede de gözlendi (Şekil 4.38). Bu evrede, tapetum hücrelerinde heterokromatin bakımından yoğun olan tek ve büyük bir nukleus hücrenin ortasında yeralır, organel içeriği açısından çok zengin olmamakla birlikte organeller nukleus etrafında toplanmıştır (Şekil 4.39). Anter çeperinin 4 ile 6 sıralı hücre tabakasından oluştuğu, epidermis, endotesyum ve ara tabaka hücrelerinin organel içeriği yönünden çok fakir olduğu gözlendi. Nukleus dışında organel görülmedi (Şekil 4.40).

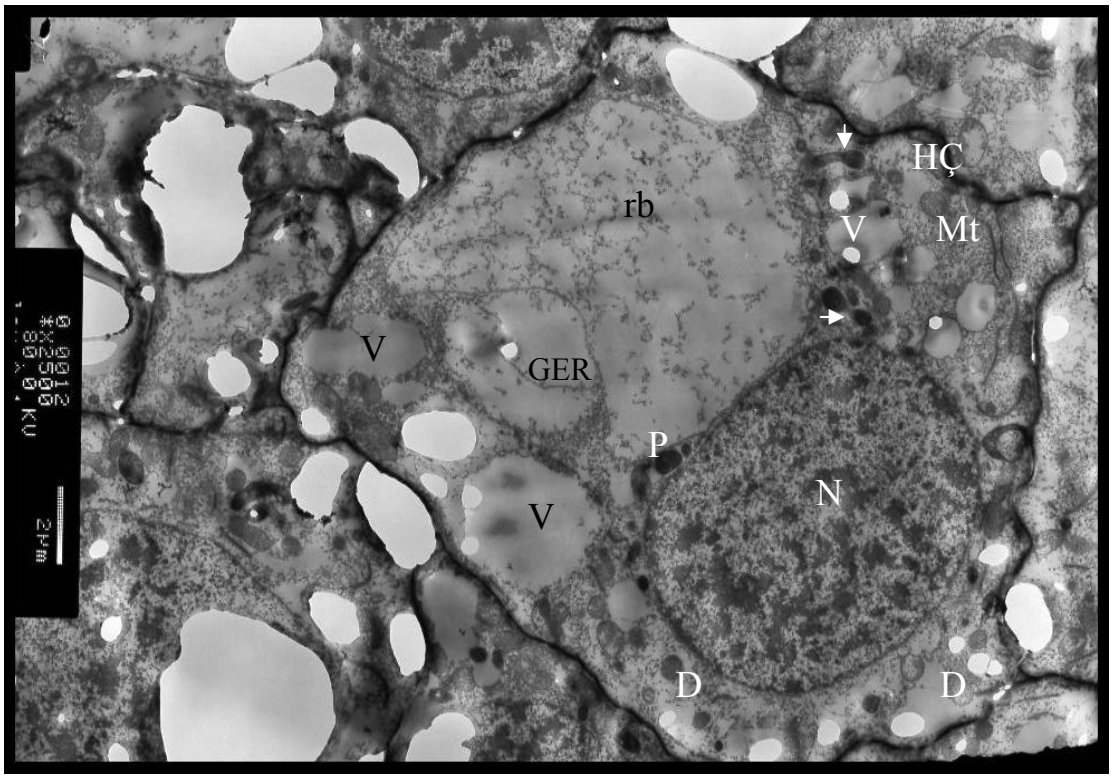
Mayoz sonunda, tetradı (Şekil 4.41) oluşturan mikrosporlarda hücre çeperinde ekzin oluşumunun başladığı ve hücre çeperinin buruşuk bir görünümde olduğu gözlendi. Bu evrede nukleusun hücrenin büyük bir kısmını kapladığı, organellerin ise nukleus ve hücre zarı arasındaki dar alanda yeraldığı görüldü (Şekil 4.42). Tetradtan ayrılan mikrosporların bazılarının anter lokusundaki sıvıyı alarak şiştikleri ve bazılarının ise şişmediği gözlendi. Şişme gösteren mikrosporların nukleus sitoplazma ve organel içeriği normal olduğu halde diğerlerinde nukleus kromatin dağılımının atipik olduğu ve sitoplazmasının az olduğu organel içeriğinin ise yok denecek kadar az olduğu dikkati çekti (Şekil 4.43). Bu evrede anter çeperinin özellikle epidermis tabakası hücrelerinde de bazı değişiklikler göze çarptı. Bu hücrelerde birkaç büyük vakuol ile heterokromatin bakımından yoğun bir nukleus bulunduğu sitoplazmanın hücre çeperine yakın çevresel olarak yeraldığı gözlendi. Mayozun erken evrelerindeki anter çeperi hücrelerinin içeriğine göre mitokondri ve lipid granülleri sayısında artış görüldü. Endotesyum hücrelerinde ise büyük bir vakuol ile içinde lipid granülleri ve az sayıda mitokondrilerin yer aldığı çevresel sitoplazma dikkati çekti (Şekil 4.44).

Tetradtan ayrılan ve şişen mikrosporların tapetuma yöneldiği gözlendi. (Şekil 4.45). Bu evrede anter çeperinin ince yapısında bazı değişiklikler kaydedildi. Özellikle epidermis hücrelerinde çevresel sitoplazmadaki organel içeriği ile lipid granüllerinin sayı ve hacimlerinde artış görüldü (Şekil 4.46). Endotesyum hücrelerinin nukleuslarının küçüldüğü ve büyük merkezi bir vakuol ile çevrede yer alan sitoplazmada az sayıda organel görüldü. Büyük vakuollü olan ara tabaka hücrelerinde sitoplazma ve organel içeriği az olduğu, tapetum hücrelerinin dejenere olmaya başladığı dikkati çekti. Bu

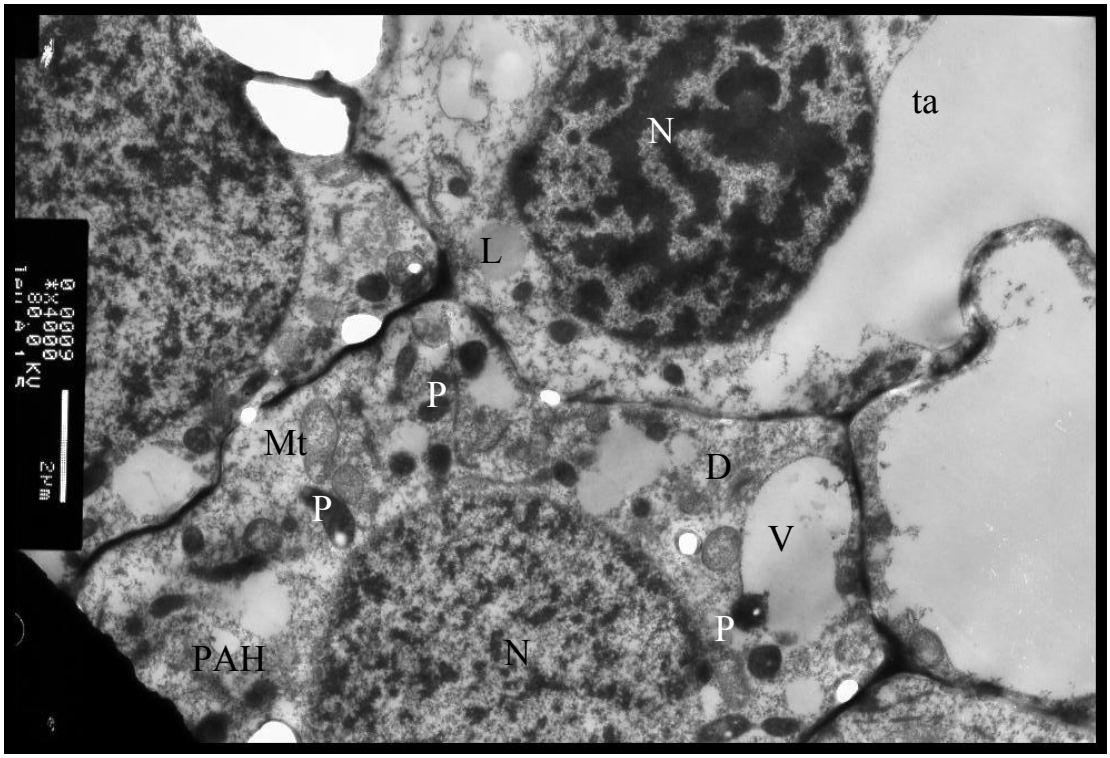
evrede mikrosporlarda hücre çeperinde ekzin oluşumunun devam ettiği gözlendi. Hücrenin ortasında yeralan nukleusta nukleolus ile eukromatin ve heterokromatin bölgeler normal görünümdedir. Nukleus çevresinde vesikül oluşumu göze çarptı. Sitoplazmada çok sayıda farklı büyüklükte mitokondriler ile çok sayıda polizom gözlendi (Şekil 4.47). Bu evrede tapetum hücrelerinden salgı granüllerinin mikrospor ile tapetum hücresi arasındaki alana salındığı görüldü. Mikrospor hücresindeki mitokondrilerin mikrosporun tapetuma bakan yüzünde daha çok toplandıkları gözlendi (Şekil 4.48).

Mikrosporların polen mitozuna başlamadan önce polarite gösterdikleri saptandı. Nukleusun hücrenin bir kutbuna göç ettiği, diğer kutupta ise içinde polizomların yoğun olduğu sitoplazma yer aldı. Nukleus çevresinde vesikül oluşumu gözlendi. Çok sayıda plastid ve mitokondrinin hücre içinde periferik olarak çepere yakın bir dağılım gösterdiği saptandı (Şekil 4.49).

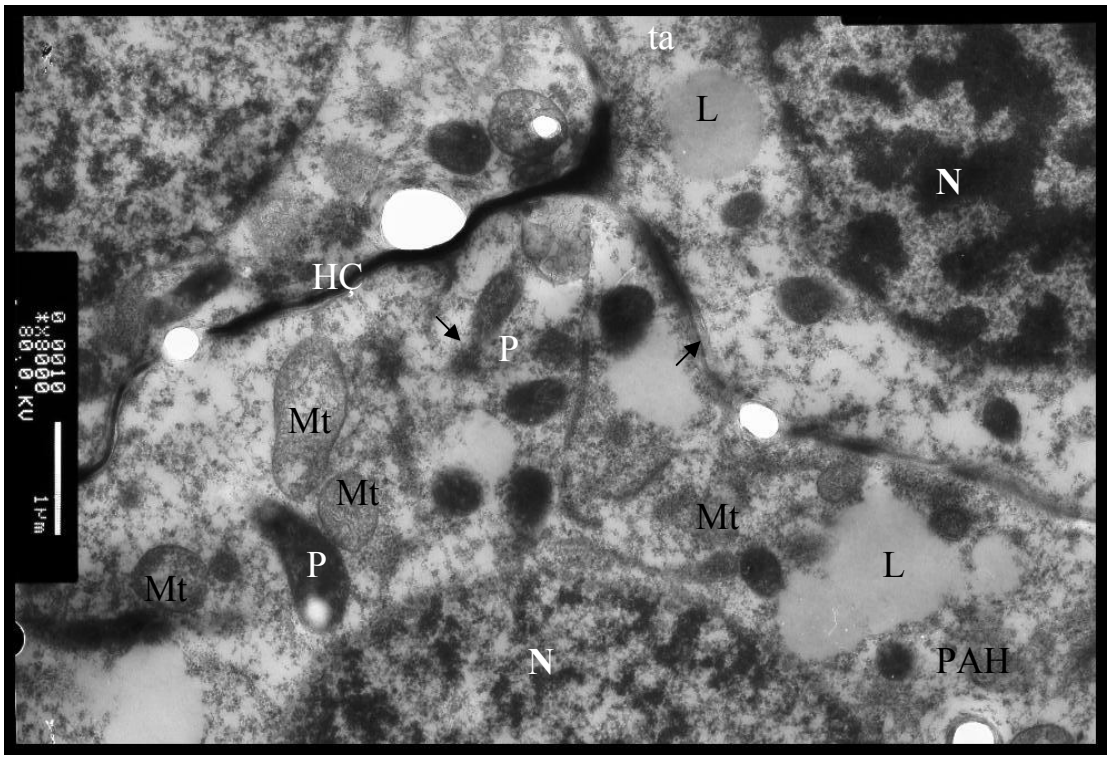
İki hücreli olgun polen tanelerinde generatif hücre nukleusunun mercek şeklinde, vegetatif hücre nukleusunun ise loblu bir yapıda olduğu gözlendi. Generatif hücre nukleusu heterokromatin bakımından zengin olduğu halde vegetatif hücre nukleusu eukromatince zengin olduğu ve sitoplazmasında çok sayıda nişasta taneleri içerdiği gözlendi. Polen çevresinde çok sayıda lipid damlalarının bulunduğu saptandı (Şekil 4.50). Dejenerasyonu artan tapetum hücreleriyle polen taneleri arasında ubish granülleri görüldü ve madde alışverişinin devam ettiği saptandı (Şekil 4.51). Tapetum hücreleri dejenere olurken diğer anter çeperi hücrelerinin en faal dönemlerini sürdükleri ve organel içeriklerinin önceki dönemlere göre bariz bir şekilde arttığı gözlendi (Şekil 4.52). Epidermis hücrelerinde çok sayıda mitokondri bulunduğu ve amiloplastların oluştuğu görüldü (Şekil 4.53). Endotesyum hücreleri de epiderma hücreleriyle aynı özelliği göstermektedir. Çeper kalınlaşmaları ince yapıda saptanamadı (Şekil 4.52).



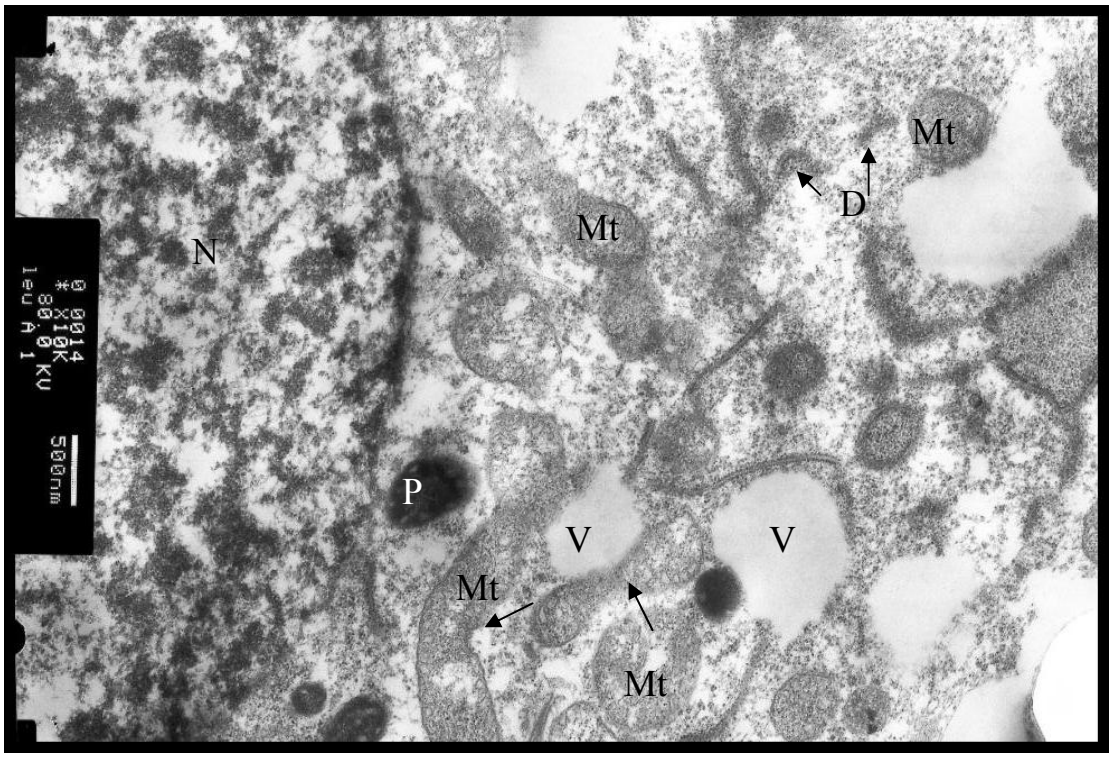
Şekil 4.30. *L. aestivum*'da sporogen doku hücresinin ince yapısını gösteren elektron mikrografı (D, diktiyozom; GER, granüllü endoplazmik retikulum; HÇ, hücre çeperi; Mt, mitokondri; N, nukleus; P, plastid; V, vakuol)



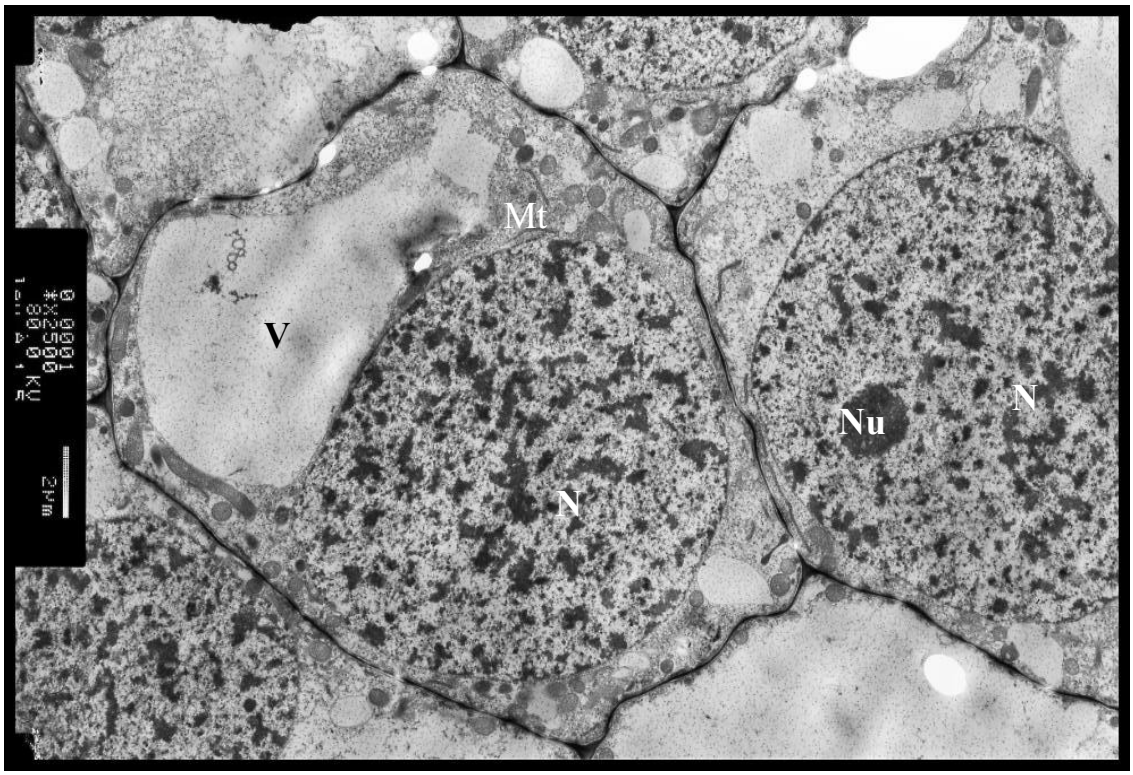
Şekil 4.31. *L. aestivum*'da polen ana hücresinin ve tapetum hücresinin ince yapısını gösteren elektron mikrografı (D, diktiyozom; HÇ, hücre çeperi; L, lipid; Mt, mitokondri; N, nukleus; P, plastid; PAH, polen ana hücresi; ta, tapetum; V, vakuol)



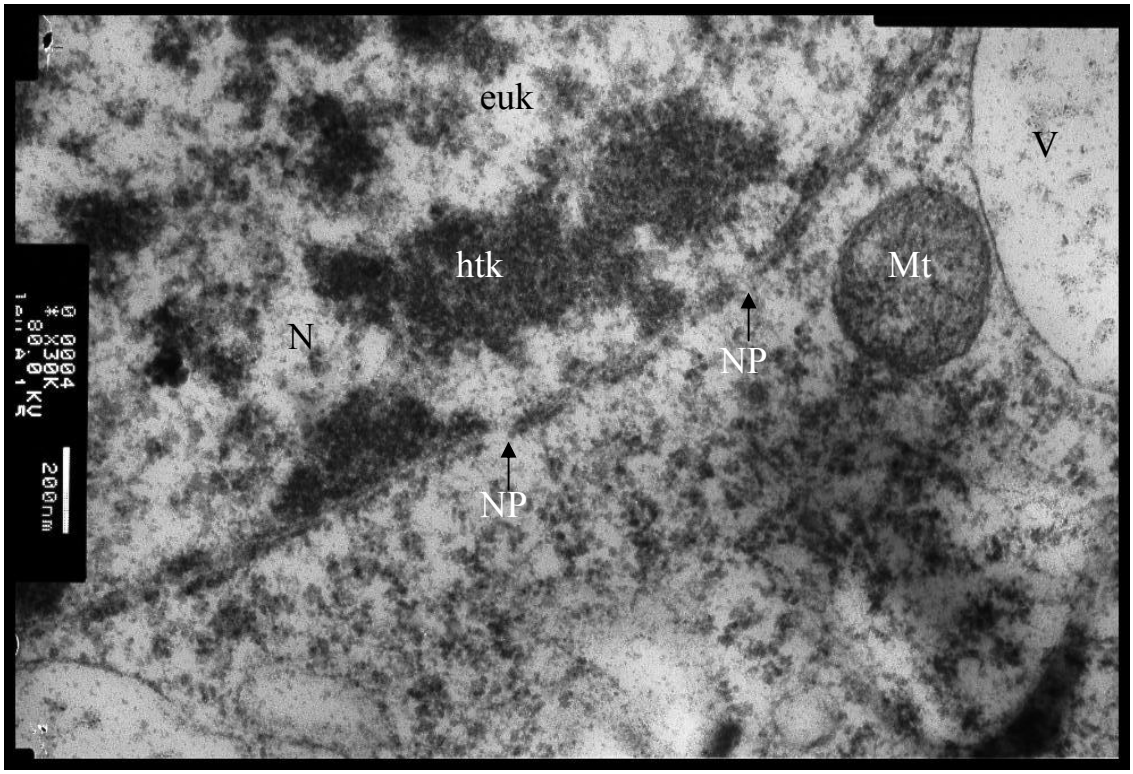
Şekil 4.32. *L. aestivum*'da polen ana hücresi ve tapetum hücresi arasındaki hücre çeperinin ince yapısını gösteren elektron mikrografı (HÇ, hücre çeperi; L, lipid; Mt, mitokondri; N, nukleus; P, plastid; PAH, polen ana hücresi; ta, tapetum)



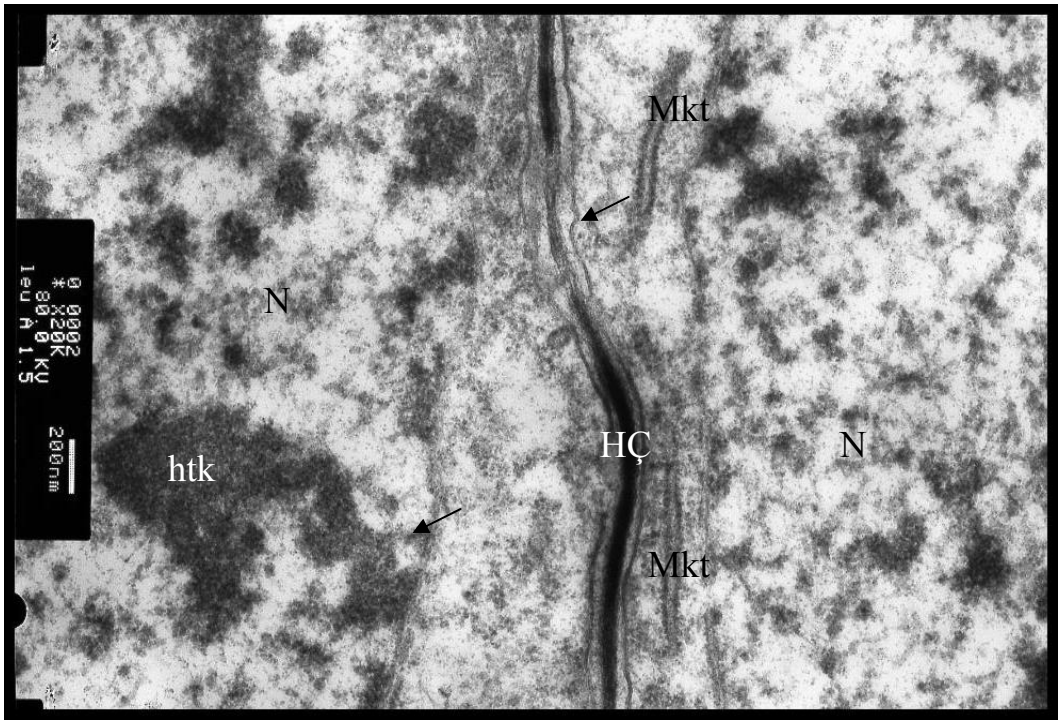
Şekil 4.33. *L. aestivum*'da polen ana hücresinin organel içeriğinin bir kısmını gösteren elektron mikrografı (D, diktiyozom; Mt, mitokondri; N, nukleus; P, plastid; V, vakuol)



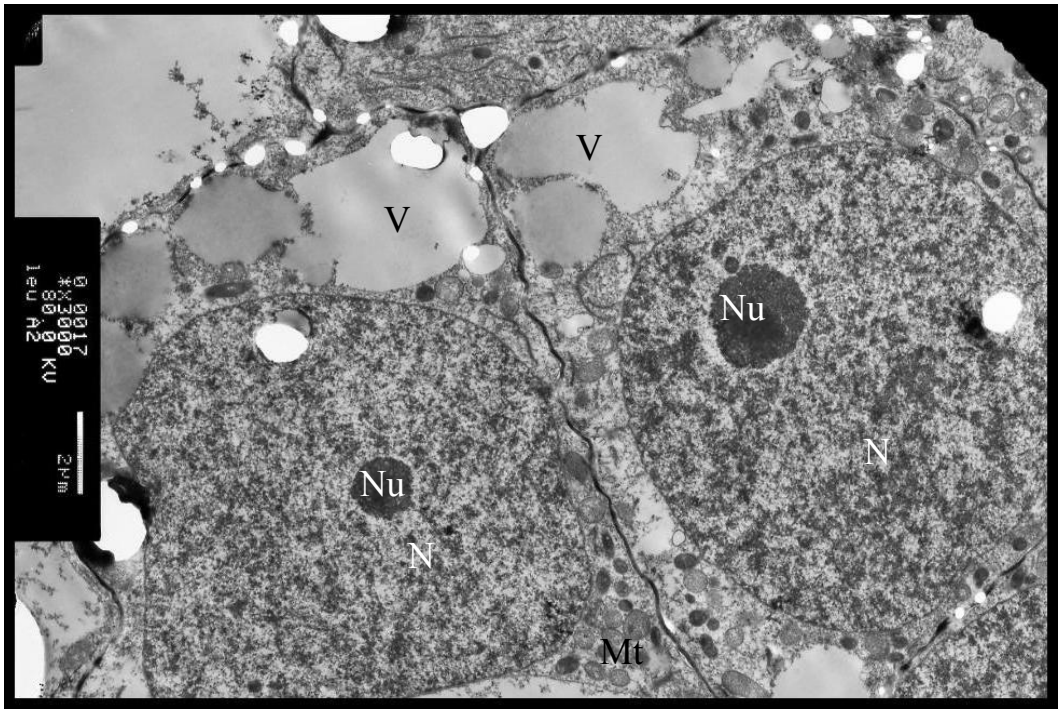
Şekil 4.34. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde polen ana hücresinin elektron mikrografı (Mt, mitokondri; N, nukleus; Nu, nukleolus; V, vakuol)



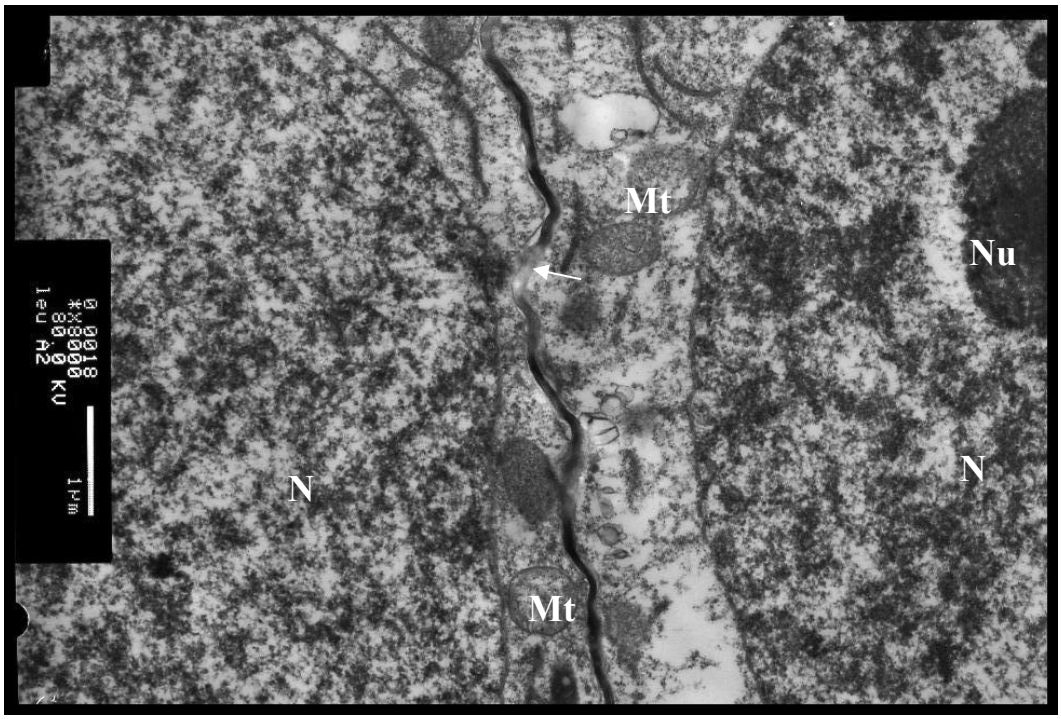
Şekil 4.35. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde polen ana hücresinin nukleus zarının elektron mikrografı (euk, eukromatin; htk, heterokromatin; Mt, mitokondri; N, nukleus; NP, nukleus poru; V, vakuol)



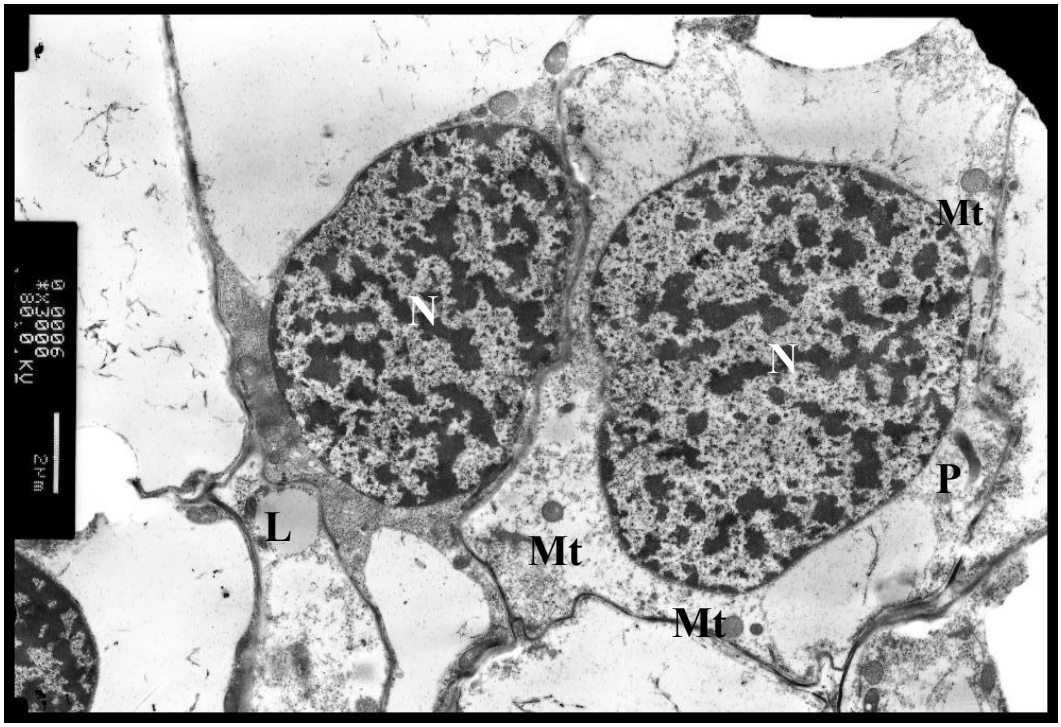
Şekil 4.36. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde iki polen ana hücresi arasındaki hücre çeperinin ince yapısını gösteren elektron mikrografı (HÇ, hücre çeperi; htk, heterokromatin; Mkt, mikrotübül N, nukleus;)



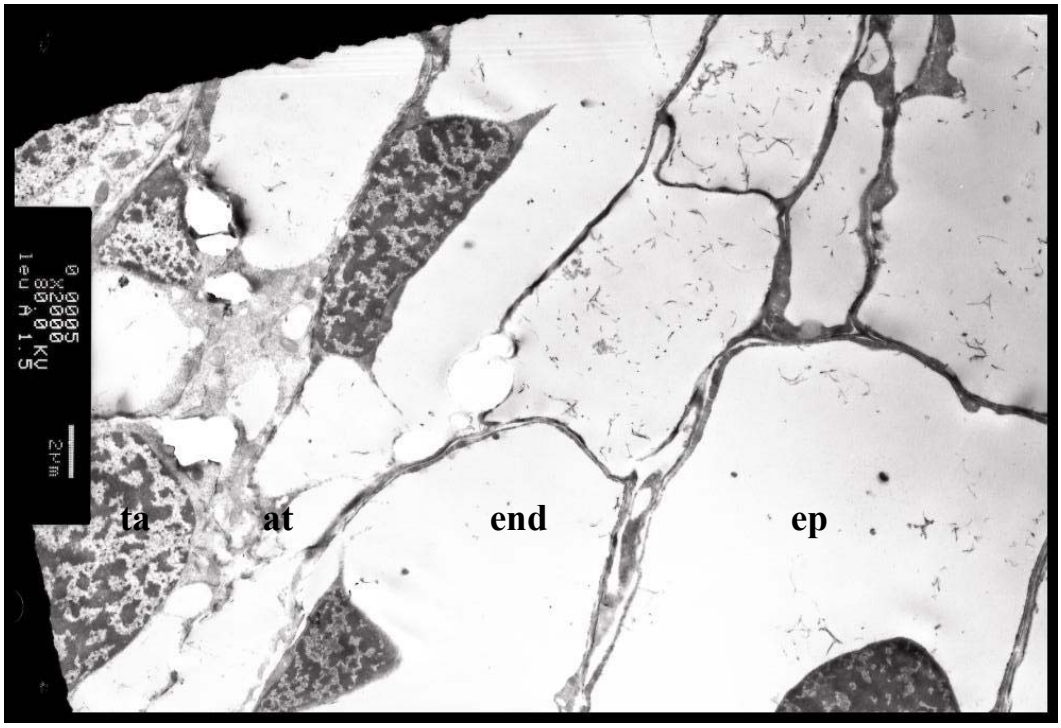
Şekil 4.37. *L. aestivum*'da mikrosporogenez evresinde polen ana hücrelerinin elektron mikrografı (Mt, mitokondri; N, nukleus; Nu, nukleolus; V, vakuol)



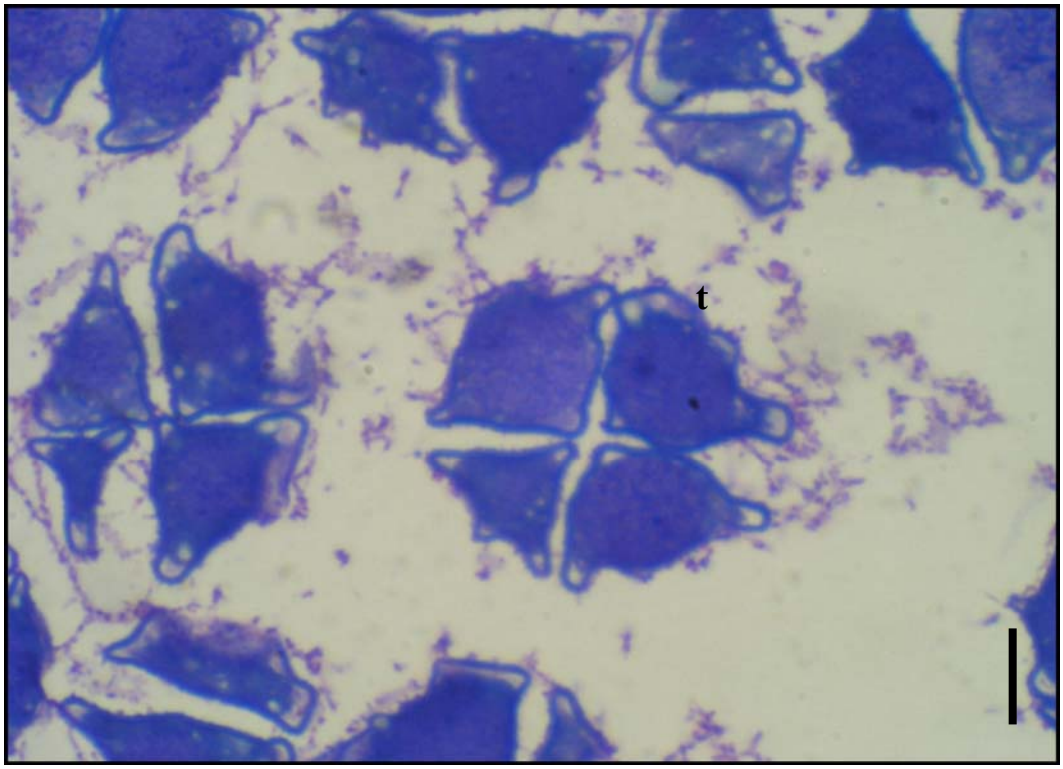
Şekil 4.38. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde iki polen ana hücresi arasındaki hücre çeperinin elektron mikrografi (Mt, mitokondri; N, nukleus; Nu, nukleolus)



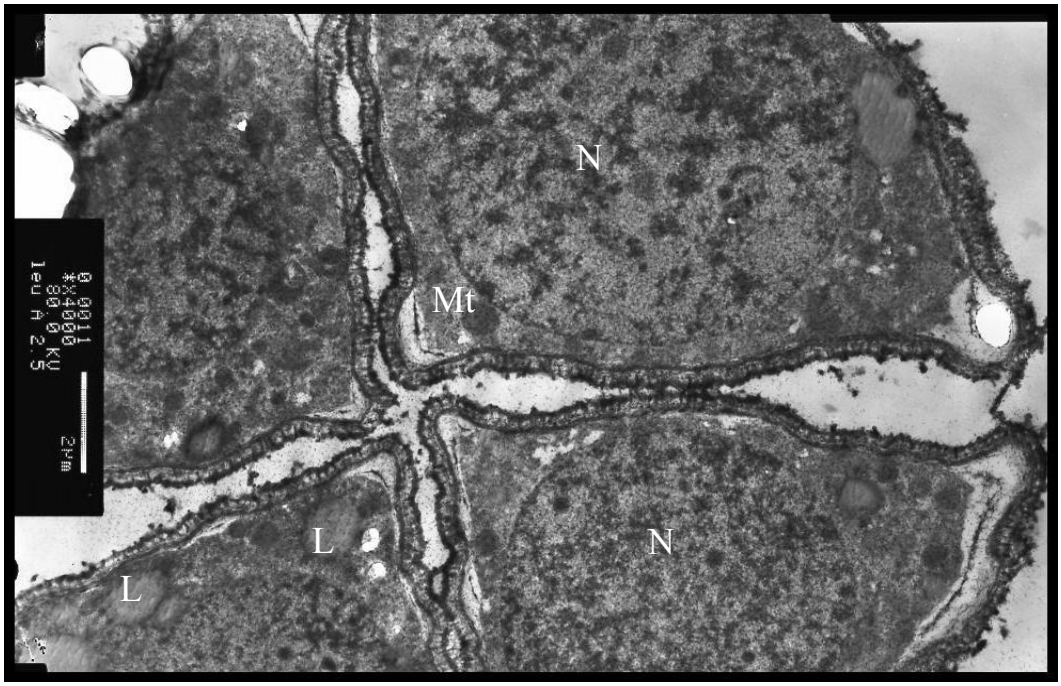
Şekil 4.39. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde tek nukleuslu tapetum hücrelerinin elektron mikrografi (L, lipid; Mt, mitokondri; N, nukleus; P, plastid)



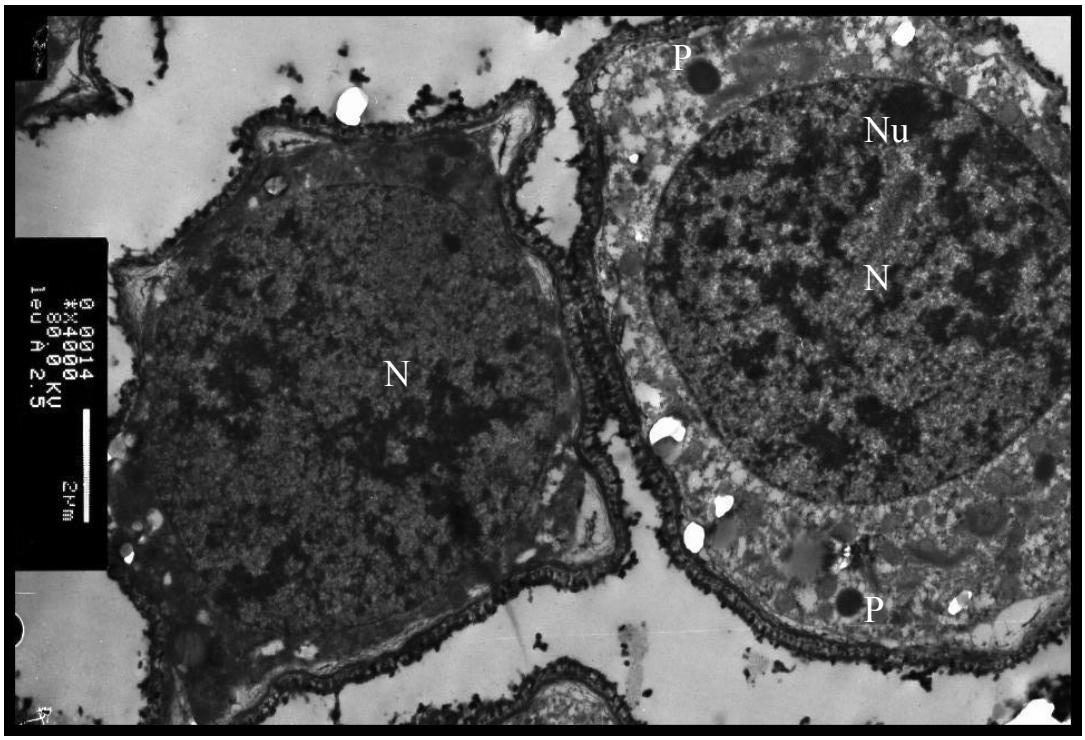
Şekil 4.40. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin erken evresinde anter çeperinin elektron mikrografı (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; ta, tapetum)



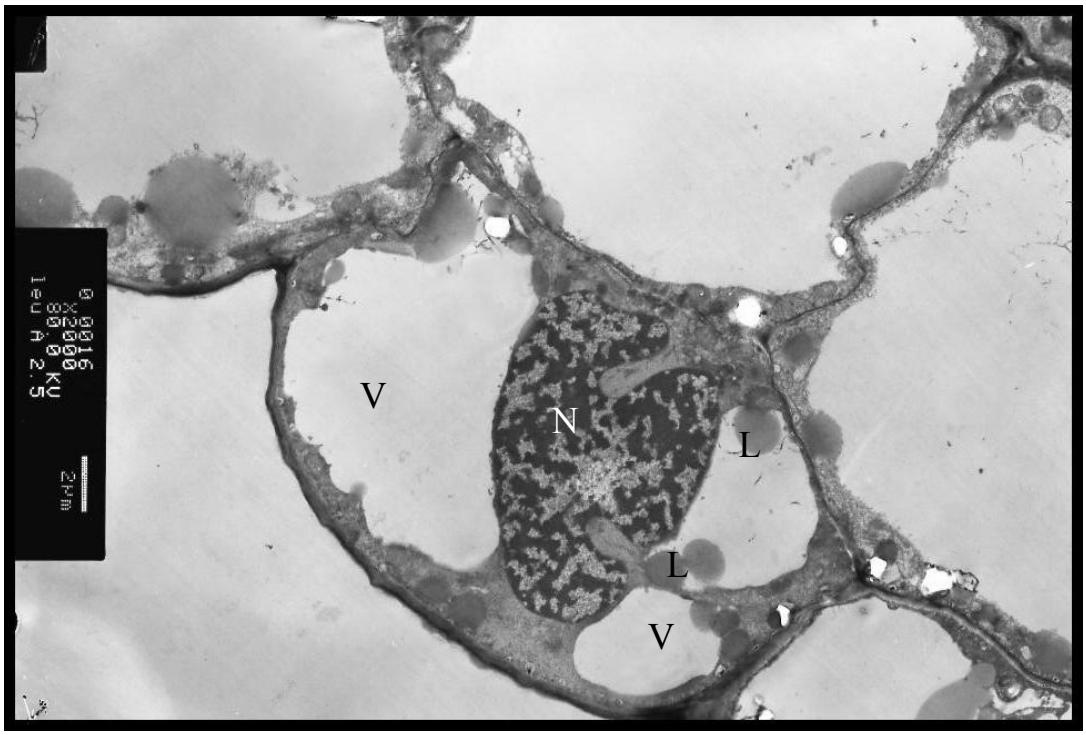
Şekil 4.41. *L. aestivum*'da mikrosporogenezin tetrad evresi, bar=10µm (t, tetrad)



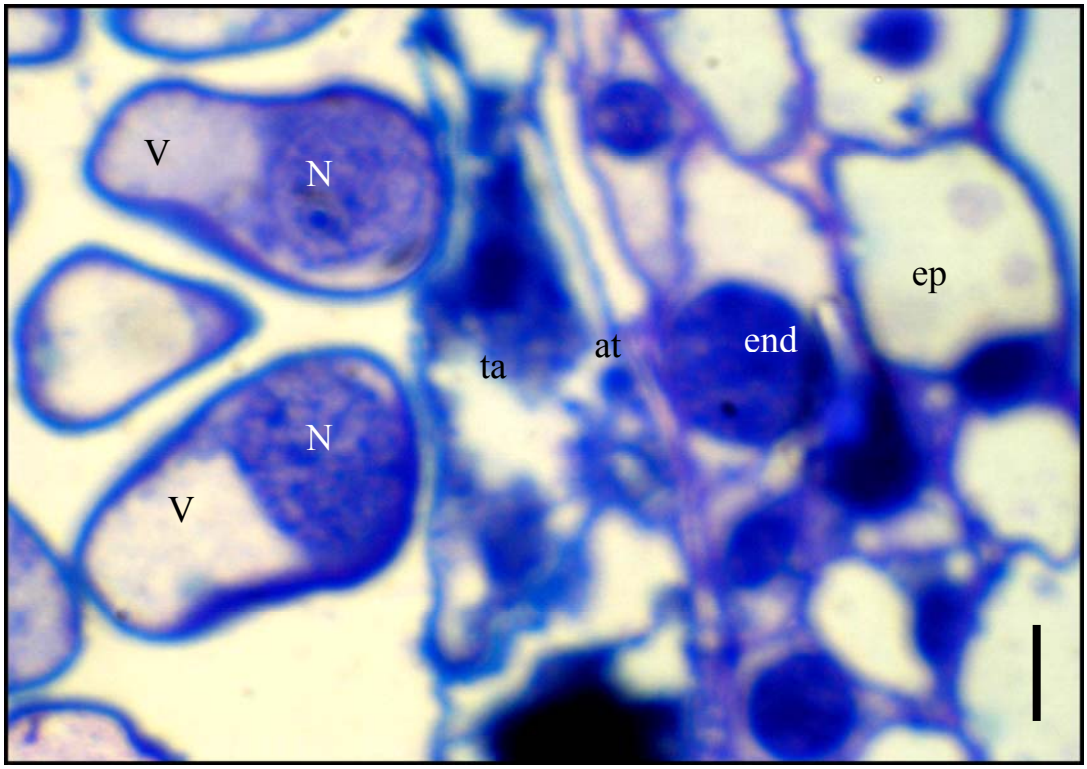
Şekil 4.42 *L. aestivum*'da mikrosporogenezin tetrad evresinin elektron mikrografı (L, lipid; Mt, mitokondri; N, nukleus)



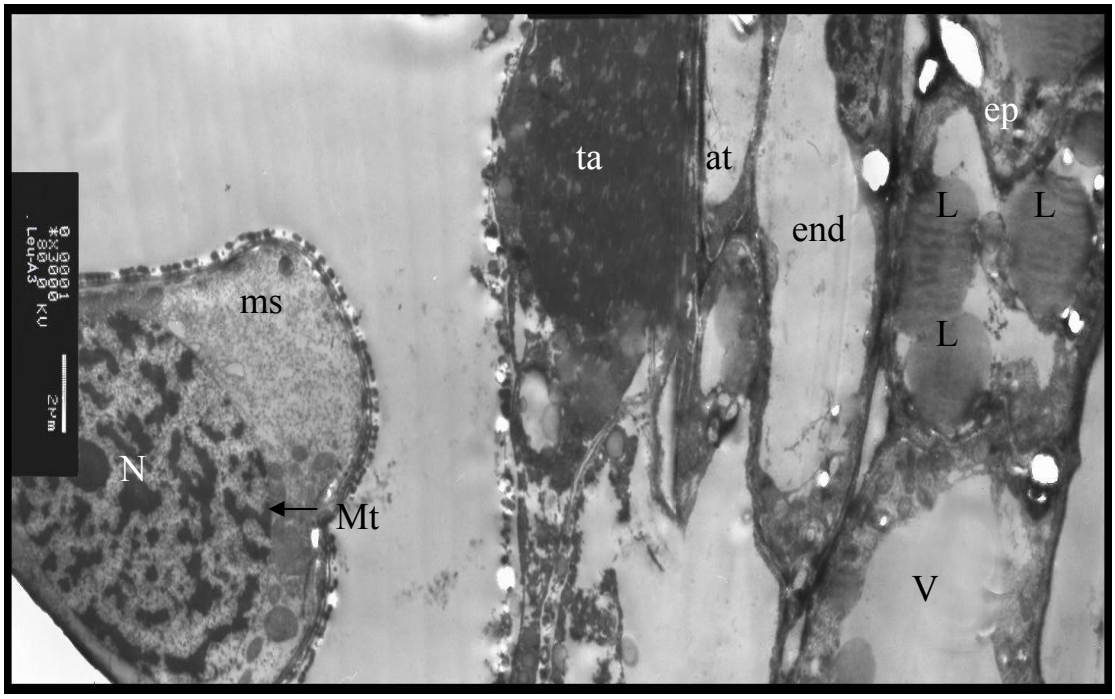
Şekil 4.43. *L. aestivum*'da tetrad evresi sonunda dağılan mikrosporların elektron mikrografı (N, nukleus; Nu, nukleolus; P, plastid)



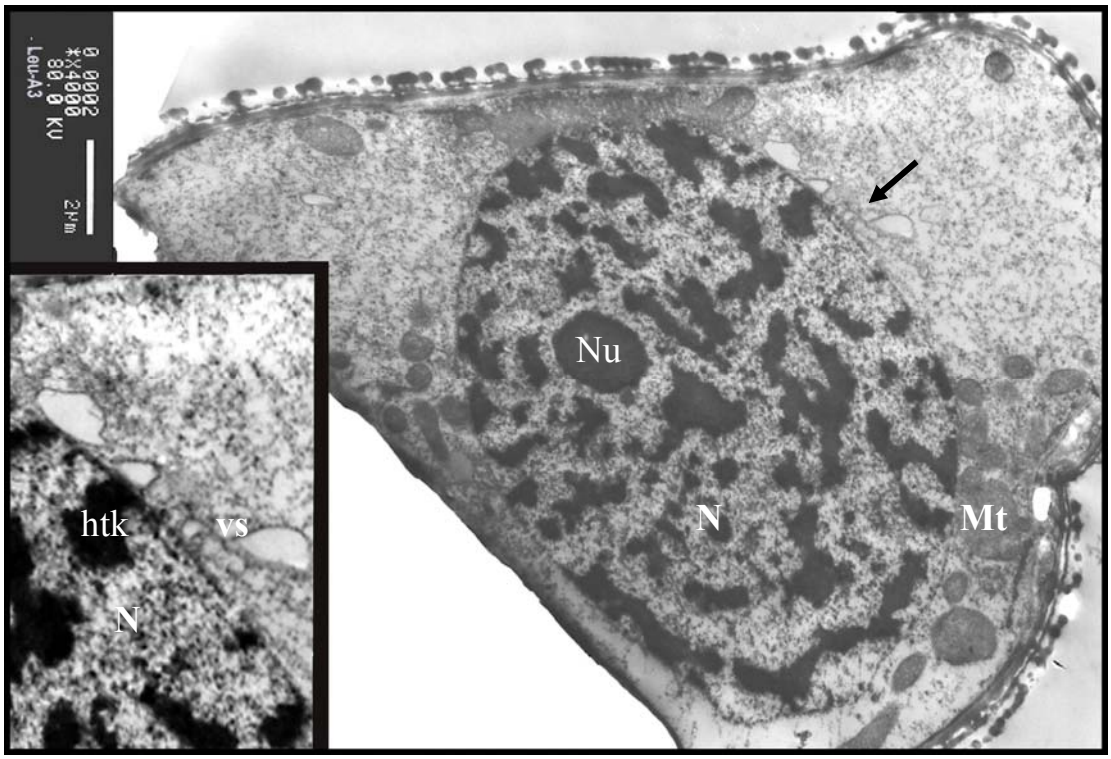
Şekil 4.44. *L. aestivum*'da tetrad evresinde anter çeperinin epidermis tabakasının elektron mikrografı (L, lipid; N, nukleus; V, vakuol)



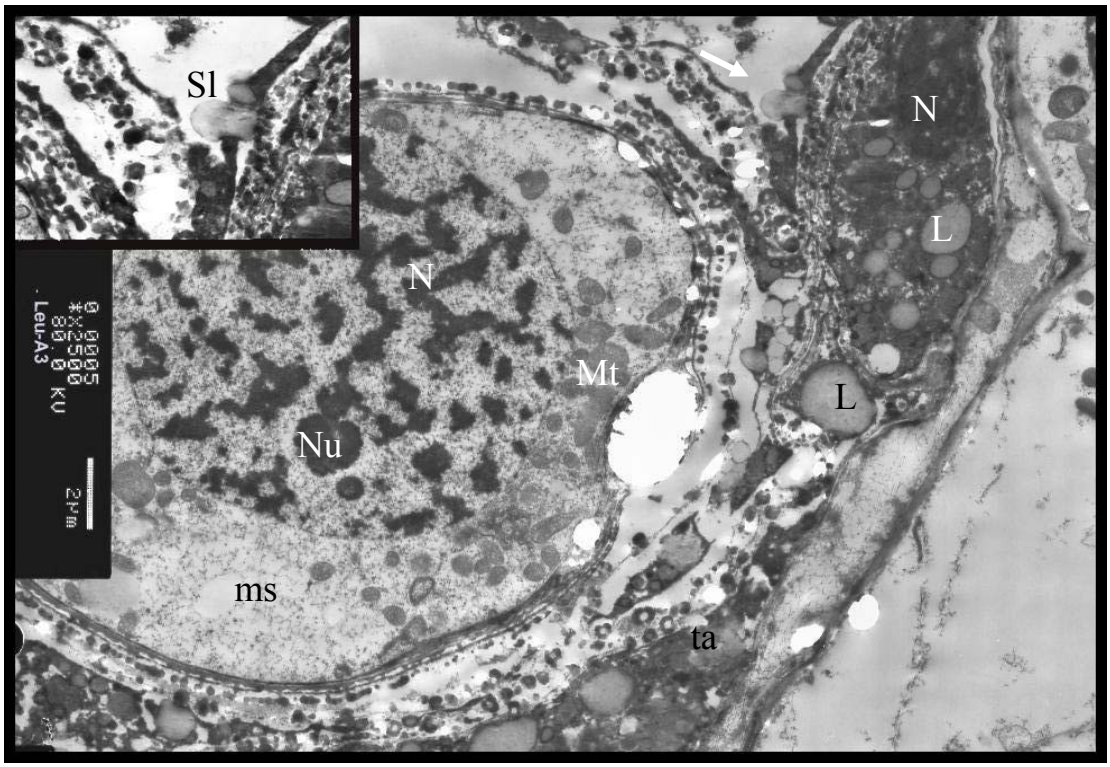
Şekil 4.45 *L. aestivum*da vakuollü polen evresi ve anter çeperi, bar=10µm (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; N, nukleus; ta, tapetum; V, vakuol)



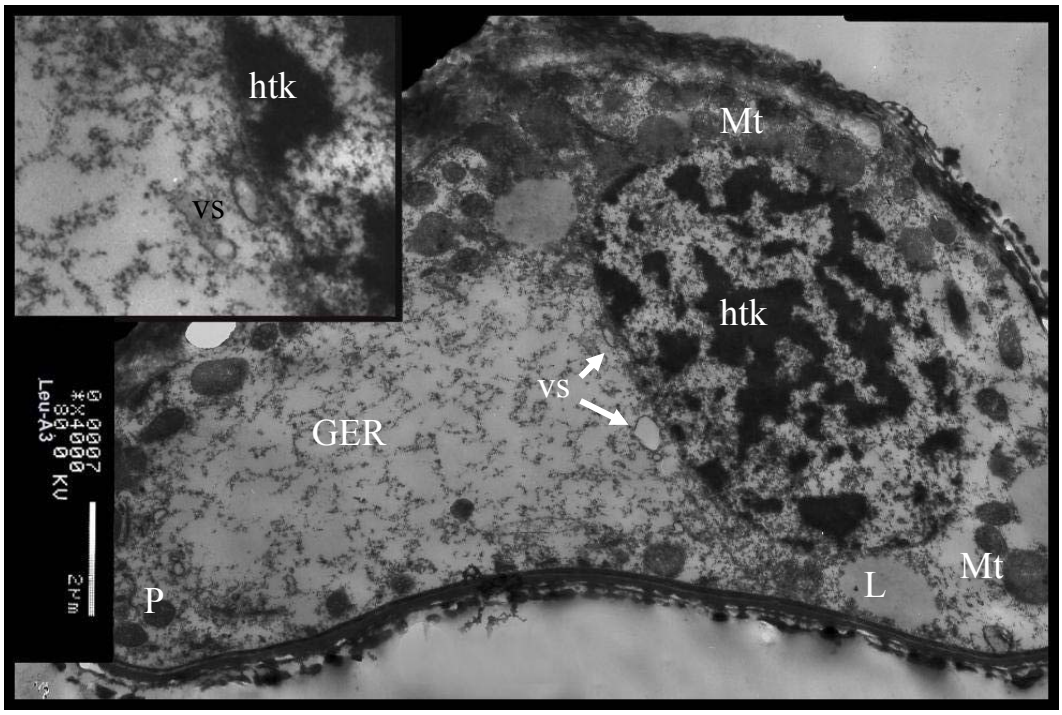
Şekil 4.46. *L. aestivum*'da mikrosporogenez sonunda anter çeperi ve mikrosporun elektron mikrografı (at, ara tabaka; end, endotesyum; ep, epidermis; L, lipid; ms, mikrospor; Mt, mitokondri; N, nukleus; ta, tapetum; V, vakuol)



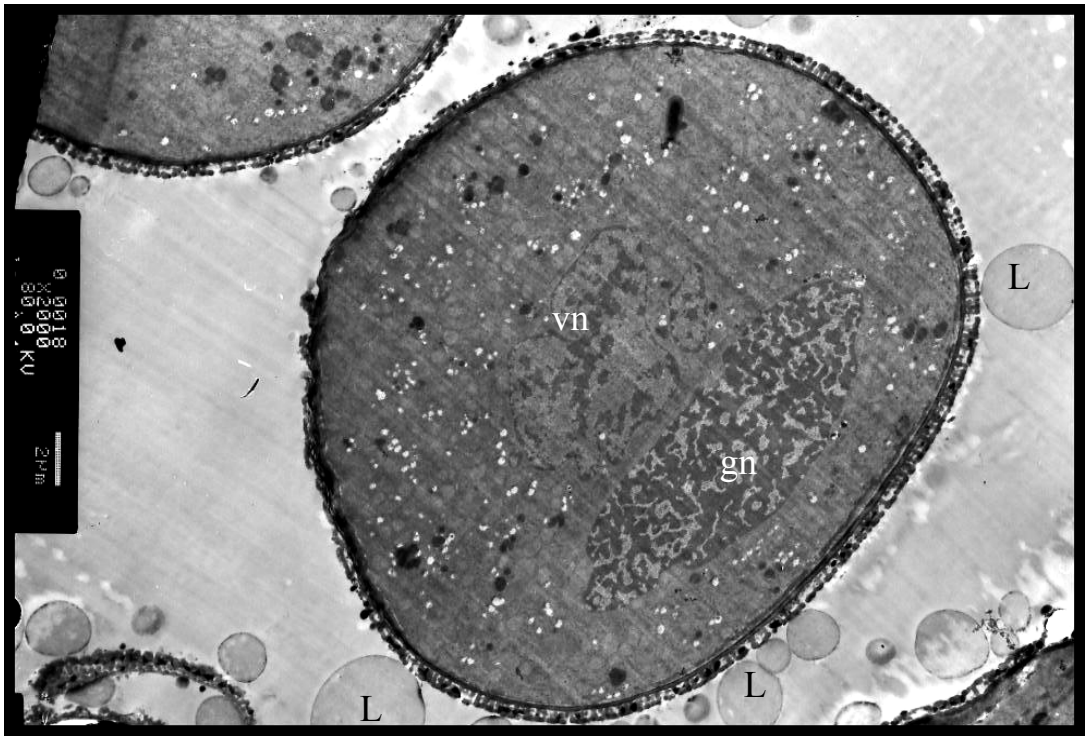
Şekil 4.47. *L. aestivum*'da mikrospor'un elektron mikrografı (Nukleus civarında vesikül oluşumu; ok-küçük resim) (htk, heterokromatin; Mt, mitokondri; N, nukleus; Nu, nukleolus; vs, vesikül)



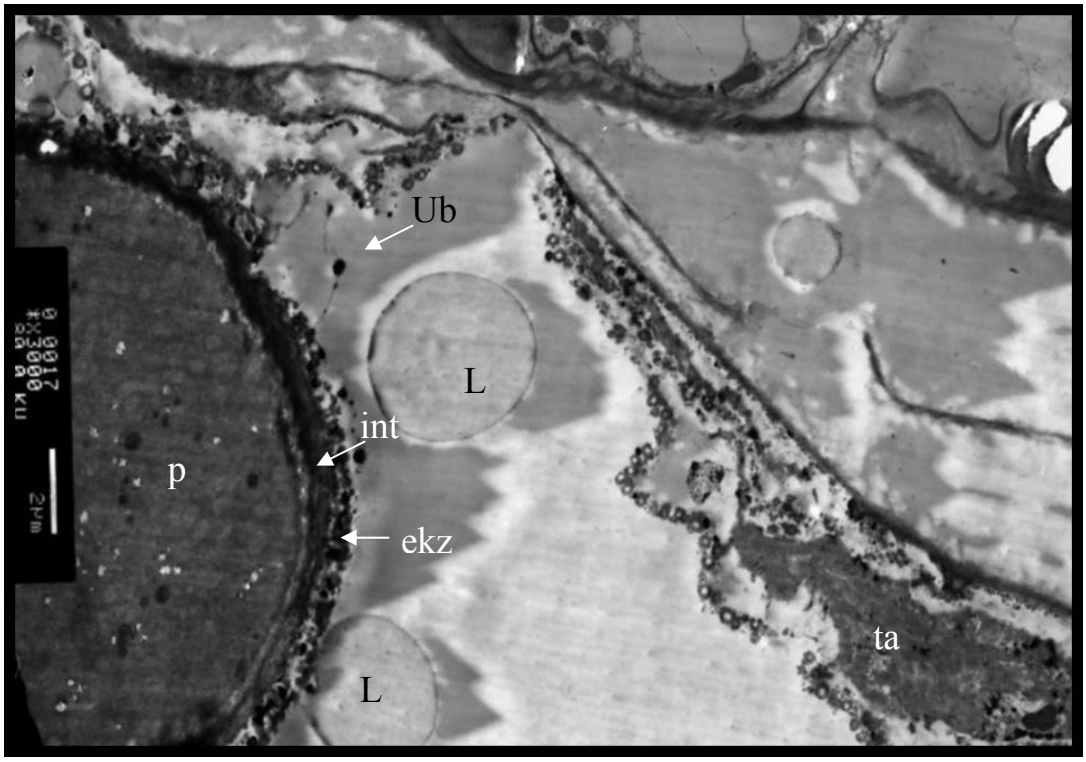
Şekil 4.48. *L. aestivum*'da polen mitozu öncesindeki tapetuma bitişik mikrosporun elektron mikrografı (Tapetum hücresinde ekzositoz,ok-küçük resim) (L, lipid; ms, mikrospor; Mt, mitokondri; N, nukleus; Nu, nukleolus; ta, tapetum; Sl, salgı)



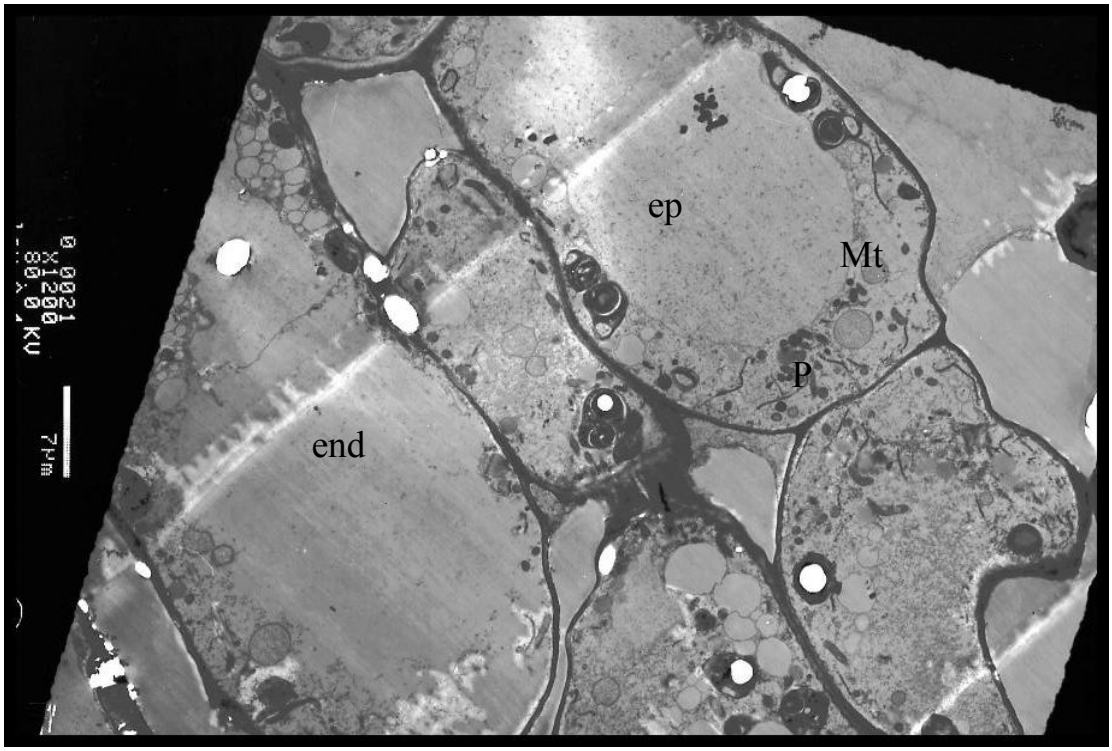
Şekil 4.49. *L. aestivum*'da polen mitozu öncesindeki mikrosporun elektron mikrografı (Nukleus civarında vesikül oluşumu,ok-küçük resim) (GER, granüllü endoplazmik retikulum; htk, heterokromatin; L, lipid; Mt, mitokondri; P, plastid; vs, vesikül)



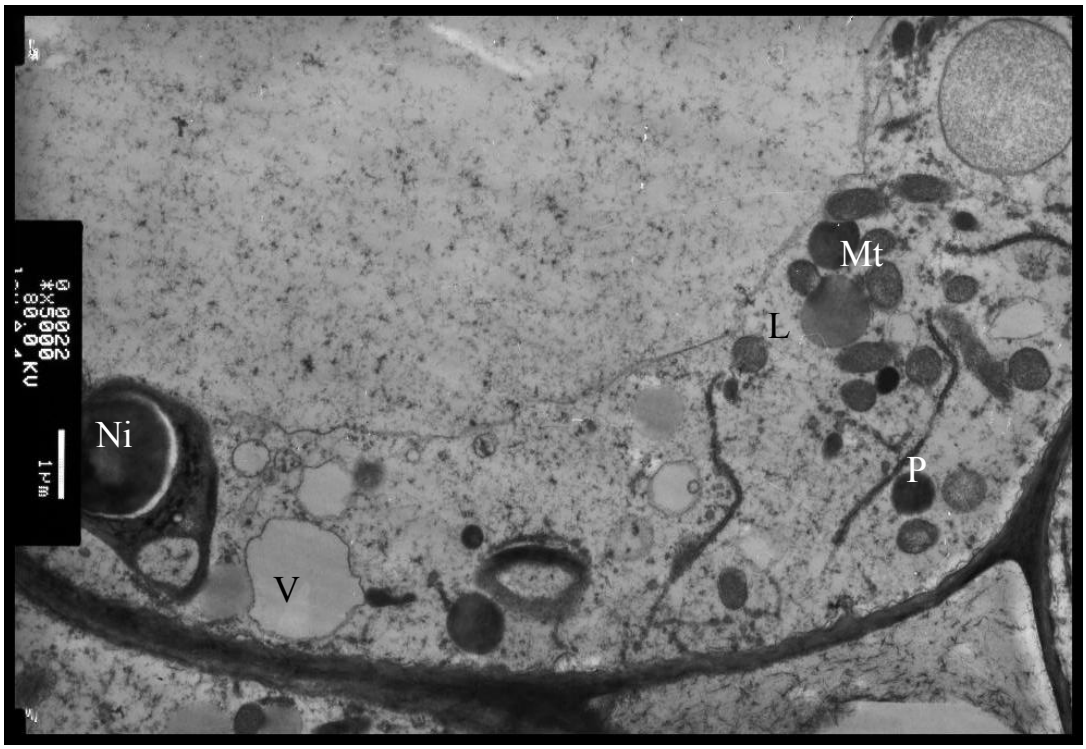
Şekil 4.50. *L. aestivum*'da olgun polen tanesinin elektron mikrografı (gn, generatif nukleus; L, lipid; vn, vegetatif nukleus)



Şekil 4.51. *L. aestivum*'da polen mitozu sonrasında tapetum hücresinin ve polenin elektron mikrografı (ekz, ekzin; int, intin; L, lipid; p, polen; ta, tapetum; Ub, ubish granülü)



Şekil 4.52. *L. aestivum*'da olgun polen evresinde anter çeperinin elektron mikrografı (end, endotesyum; ep, epidermis; Mt, mitokondri; P, plastid)



Şekil 4.53. *L. aestivum*'da olgun polen evresinde anter çeperinde epidermis tabakası hücresinin elektron mikrografı (L, lipid; Mt, mitokondri; Ni, nişasta; P, plastid; V, vakuol)

4.2.2. Ginekeum

Leucojum aestivum'un farklı boylardaki çiçek tomurcukları ve çiçeklerinden boyları 3-14mm arasında değişen ginekeumlar ayrıldı (Şekil 4.54). *L. aestivum*'un 3 karpelden oluşan sinkarp ginekeumunda (Şekil 4.55a) her karpelin ventral çeperi boyunca dizilmiş 30-40 adet tohum taslağı içerdiği gözlendi (Şekil 4.55b). Tohum taslakları marginal-sentral plasentalanma göstermektedir (Şekil 4.55a).



Şekil 4.54. *Leucojum aestivum*'un farklı boylardaki ginekeumları



Şekil 4.55. *Leucojum aestivum*'un olgun ovaryumundan enine kesit (a), Ovuller (b)

4.2.2.1. Megasporangiyum Gelişimi

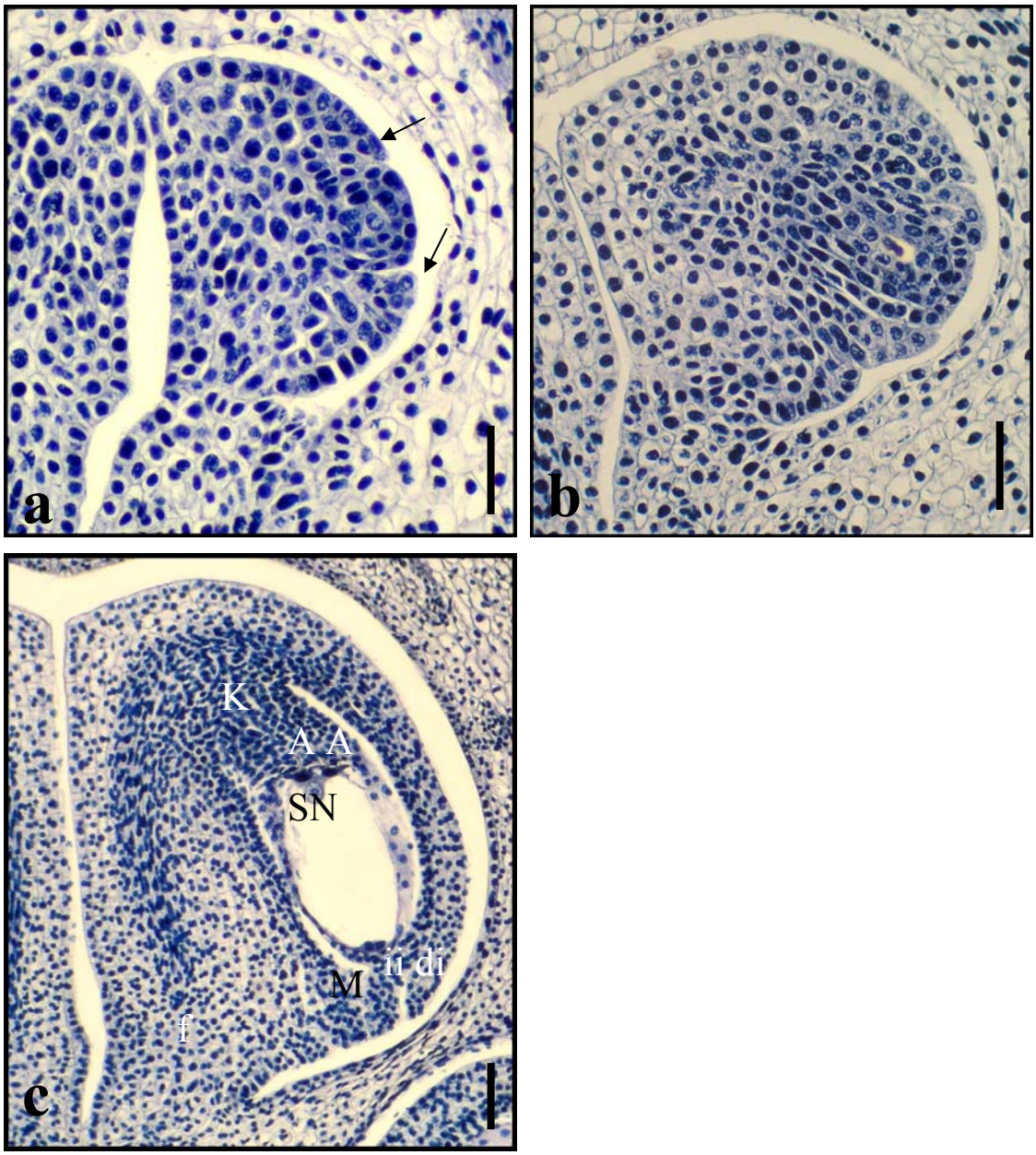
Leucojum aestivum'da bitegmik tohum taslakları gözlendi (Şekil 4.56c). Arkespor hücresinin farklılaştığı ilk evrelerde tohum taslaklarında integüment çıkıntıları görülür (Şekil 4.56a-oklar). Megaspor ana hücresi mayoz bölünmeye başlarken integümentler gelişir ve tohum taslağı hemianatrop duruma geçer (Şekil 4.56b). Megagametogenez evresinde integüment çıkıntıları daha fazla uzayarak şekillenmeye devam eder ve anatrop tohum taslağı şekillenir. Olgun embriyo kesesi taşıyan anatrop tohum taslaklarının iç integümenti mikropili oluşturur (Şekil 4.56c). Dış integümentte 5-6, iç integümentte 2-3 hücre sırası bulunur (Şekil 4.72a).

L. aestivum'da nusellus dokusu krassinusellat tiptedir. Nusellus dokusu içindeki hücrelerden biri diğer hücrelere göre farklılaşarak epidermisin 2-3 hücre sırası altında arkespor hücresini oluşturur (Şekil 4.58, 59a,b). Arkespor hücresi nusellus hücrelerinden daha büyük olduğu için kolaylıkla ayırt edilebilir. Arkespor hücresi doğrudan megaspor ana hücresi olarak farklılaşır. (Şekil 4.60a,b). Nusellus hücreleri megasporogenez evresinde normal mitoz bölünme geçirerek hücre sayısını arttırırlar (4.57a,b). Megagametogenez evresinde dejenere olmaya başlar, olgun gametofit evresinde ise nusellus hücrelerinin dejenerasyonu artar ve tek hücre tabakası şeklinde kalır.

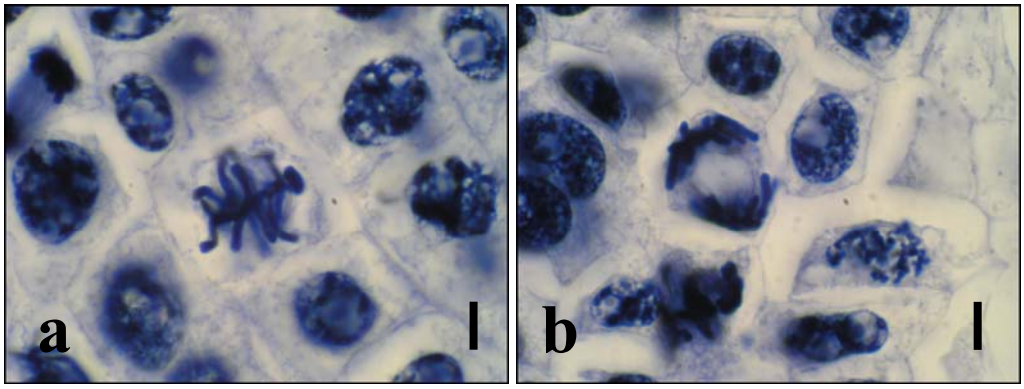
4.2.2.2. Megasporogenez

Leucojum aestivum'un krassinusellat tipte olan tohum taslaklarında gelişimin erken evresinde nusellus dokusundaki bir hücre farklılaşarak arkespor hücresini oluşturur (Şekil 4.58, 59a,b). Epidermisin 2-3 hücre sırası altında bulunan arkespor hücresinin farklılaşarak megaspor ana hücresini oluşturduğu gözlendi (Şekil 4.60a,b). Megaspor ana hücresinde mayoz bölünmenin düzenli olduğu görüldü. Zigoten (Şekil 4.61), diakinez (Şekil 4.62,63,64), metafaz I (Şekil 4.65,66), anafaz I (Şekil 4.67) evreleri düzenlidir. Diakinez evresinde, birbirini takip eden kesitlerde 11 bivalent sayıldı. Telofaz I evresinde karyokinezi sitokinez takip etti. (Şekil 4.68). Sitokinezi süksesif tipte olan mayoz bölünme ile oluşan diadın (Şekil 4.69) mikropil tarafındaki

körelirken, kalaza tarafındakinin aktif megasporu oluşturduğu saptandı. Aktif megasporda polarite görüldü. Vakuolün mikropil tarafında, nukleusun ise kalaza tarafında yer aldığı gözlendi (Şekil 4.70).



Şekil 4.56. *L. aestivum*'un anatrop tohum taslağının gelişim evreleri. a, Arkespor hücresinin farklılaştığı evre; b, Megasporogenez evresi; Barlar=50µm c, Megagametogenez evresi. Bar=120µm (A, antipod; di, dış integüment; f, funikulus; ii, iç integüment; K, kalaza; M, mikropil; SN, sekonder nukleus)



Şekil 4.57. *L. aestivum*'un nusellus hücrelerinde mitoz bölünme; a, metafaz; b, anafaz. Barlar=10µm

4.2.2.3.Megagametogenez

L. aestivum'un embriyo kesesi 8 nukleuslu bisporik *Allium* tiptedir. Mitoz bölünme başlamadan önce kalaza tarafındaki aktif megasporun hacminde bir artış görüldü (Şekil 4.71). Aktif megaspor ardışık 3 mitoz bölünme geçirerek önce 2 (Şekil 4.72,73a) sonra 4 (Şekil 4.73b), daha sonra 8 nukleuslu (Şekil 4.73c) hale geçer. Mikropil tarafına yönelen 4 nukleustan 3'ü yumurta aygıtını oluşturur. Kalaza tarafındaki 4 nukleustan 3'ü antipodları meydana getirir. Her iki kutuptaki 4. nukleuslar embriyo kesesinin ortasına doğru hareket ederek polar nukleusları oluştururlar. Böylece 8 nukleuslu embriyo kesesi oluşur (Şekil 4.74,75,80). İki polar nukleus fertilizasyondan önce birleşerek sekonder nukleusu oluştururlar (Şekil 4.83).

4.2.2.4. Olgun Embriyo Kesesi

Olgun embriyo kesesinin filiform aparatus içeren sinergid hücrelerinde nukleusun mikropil tarafında yer aldığı ve kalaza tarafında çok sayıda küçük vakuollerin bulunduğu gözlendi (Şekil 4.76). Yumurta hücresinin nukleusunun hücrenin kalaza tarafında olduğu ve mikropil tarafında ise büyük bir vakuol bulunduğu görüldü (Şekil 4.77,82). Embriyo kesesinin mikropil tarafında bulunan polar nukleusun (Şekil

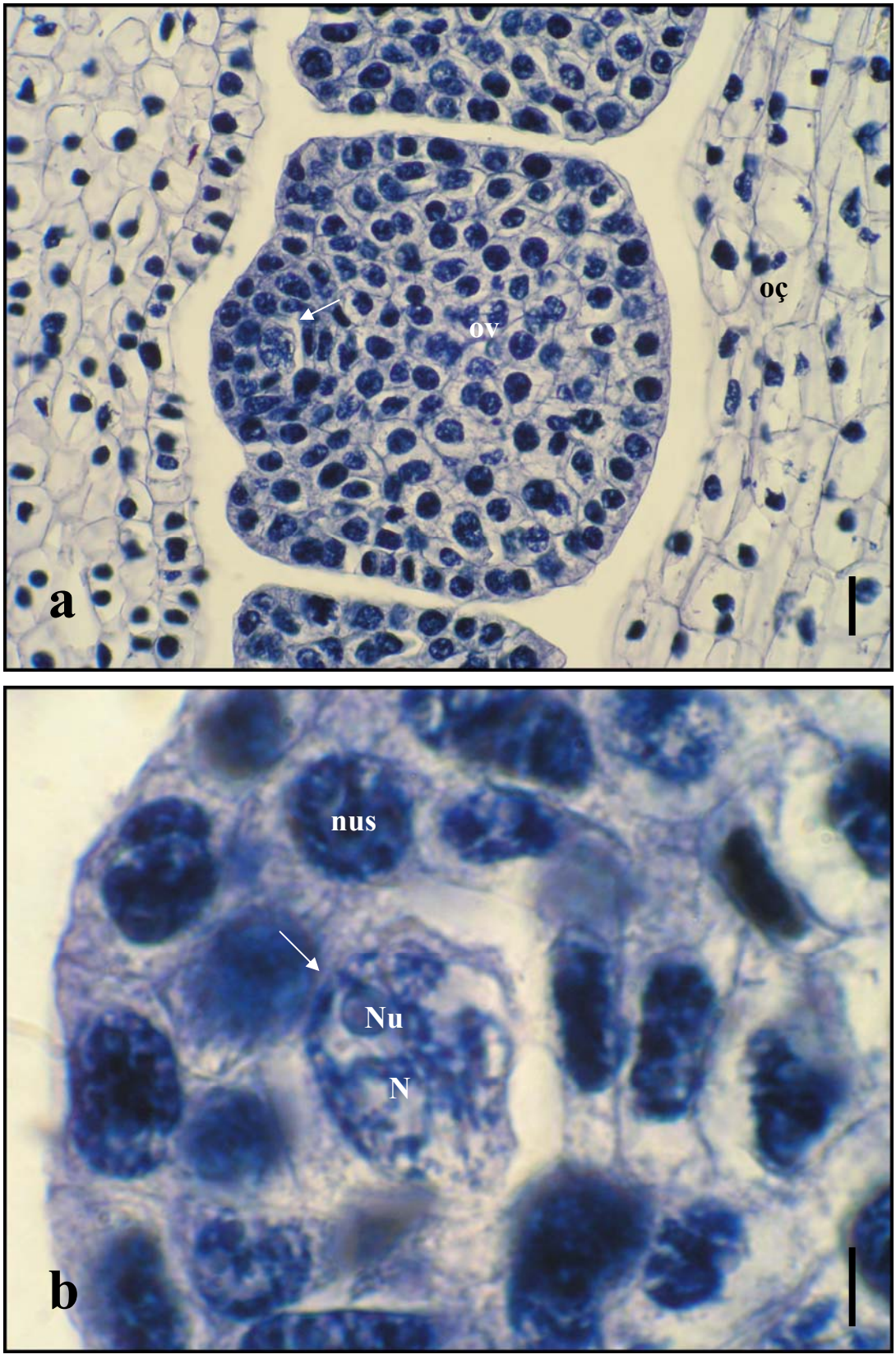
4.79,81) kalaza tarafına göç ederek antipodlara yakın bulunan diğer polar nukleus ile fertilizasyondan önce birleşerek sekonder nukleusu oluşturdukları (Şekil 4.83,84a,b) gözlendi. Büyük vakuoller içeren merkezi hücrede sitoplazma sekonder nukleus çevresinde yer alır (Şekil 4.84). Antipod hücrelerinin embriyo kesesindeki diğer hücrelerden daha büyük olduğu ve sekonder nukleus oluştuktan sonra da dejenerasyona uğramadıkları saptandı.

Olgun embriyo kesesinde iç integüment hücrelerinin mikropildeki iç integüment hücreleri 3-5 sıralı olduğu, embriyo kesesini çevreleyen iç integümentin iç epidermis hücrelerinin koyu boyandığı ve uzama göstererek endotelyum gibi farklılaştığı gözlendi (Şekil 4.85,86).

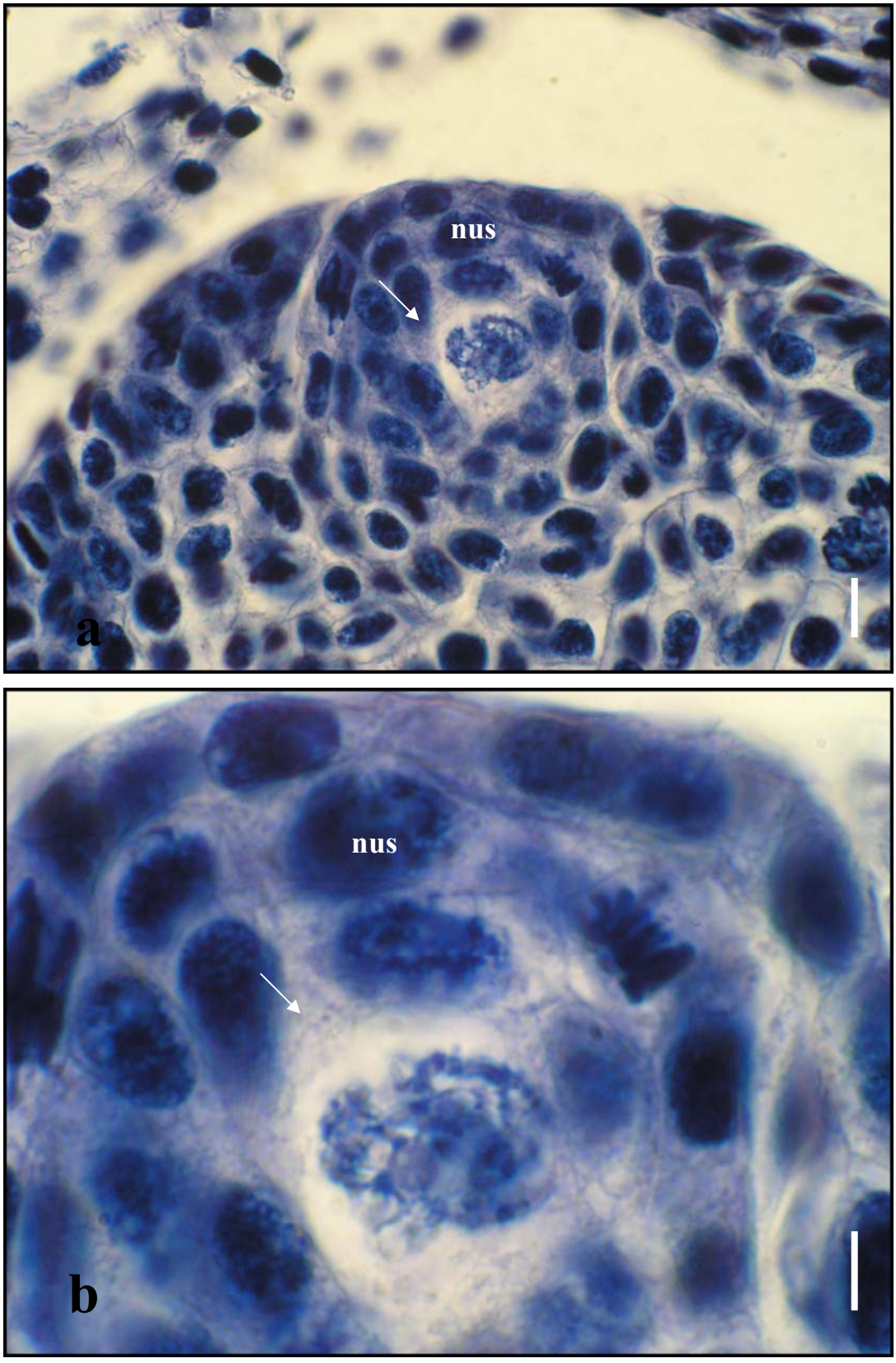
L. aestivum'da farklı gelişim evrelerindeki megasporangiyumun bazı histokimyasal özellikleri PAS ve toluidin mavisi ile boyanarak polisakkarit ve RNA içerikleri bakımından incelendi.

Megasporogenez evresindeki megasporangiyumda polisakkarit içeriğinin kalazada (Şekil 4.87a,d) ve nusellus (Şekil 4.87b,c) dokusu hücrelerinde, megagametogenez evresinde dış integüment (Şekil 4.88a,c) ve kalaza hücrelerinde (Şekil 4.88a,b), olgun embriyo kesesi evresinde de dış integüment (Şekil 4.89a,c) ve kalaza hücrelerinde (Şekil 4.89b,d) bulunduğu gözlendi.

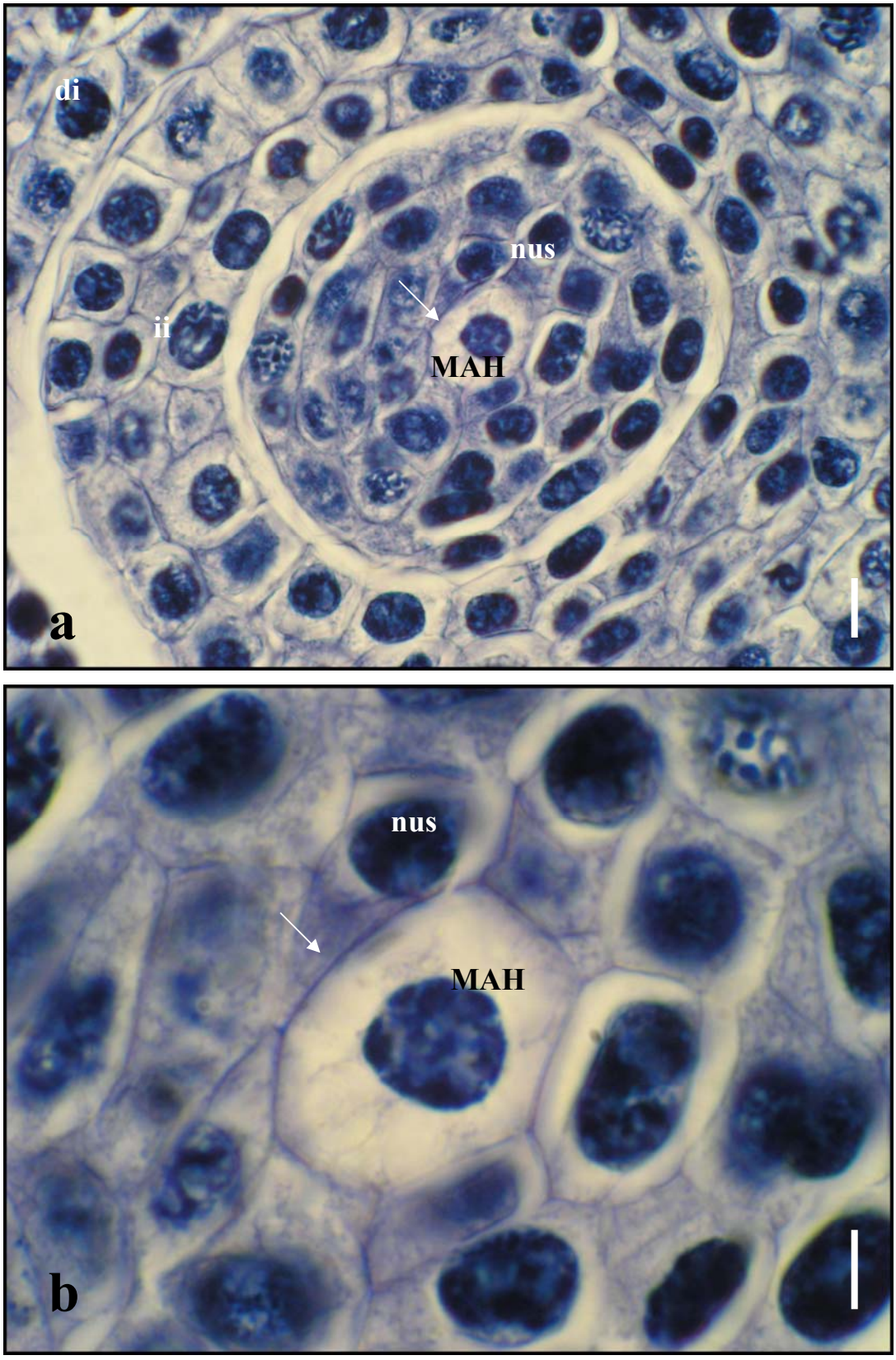
Megasporogenez evresinde nusellus dokusunun (Şekil 4.90a,b), megagametogenez evresinde iç integümentin ve kalaza hücrelerinin (Şekil 4.91a,b,c), olgun embriyo kesesi evresinde ise kalaza hücrelerinin RNA içeriği bakımından diğer hücrelere göre zengin olduğu gözlendi (Şekil 4.91d).



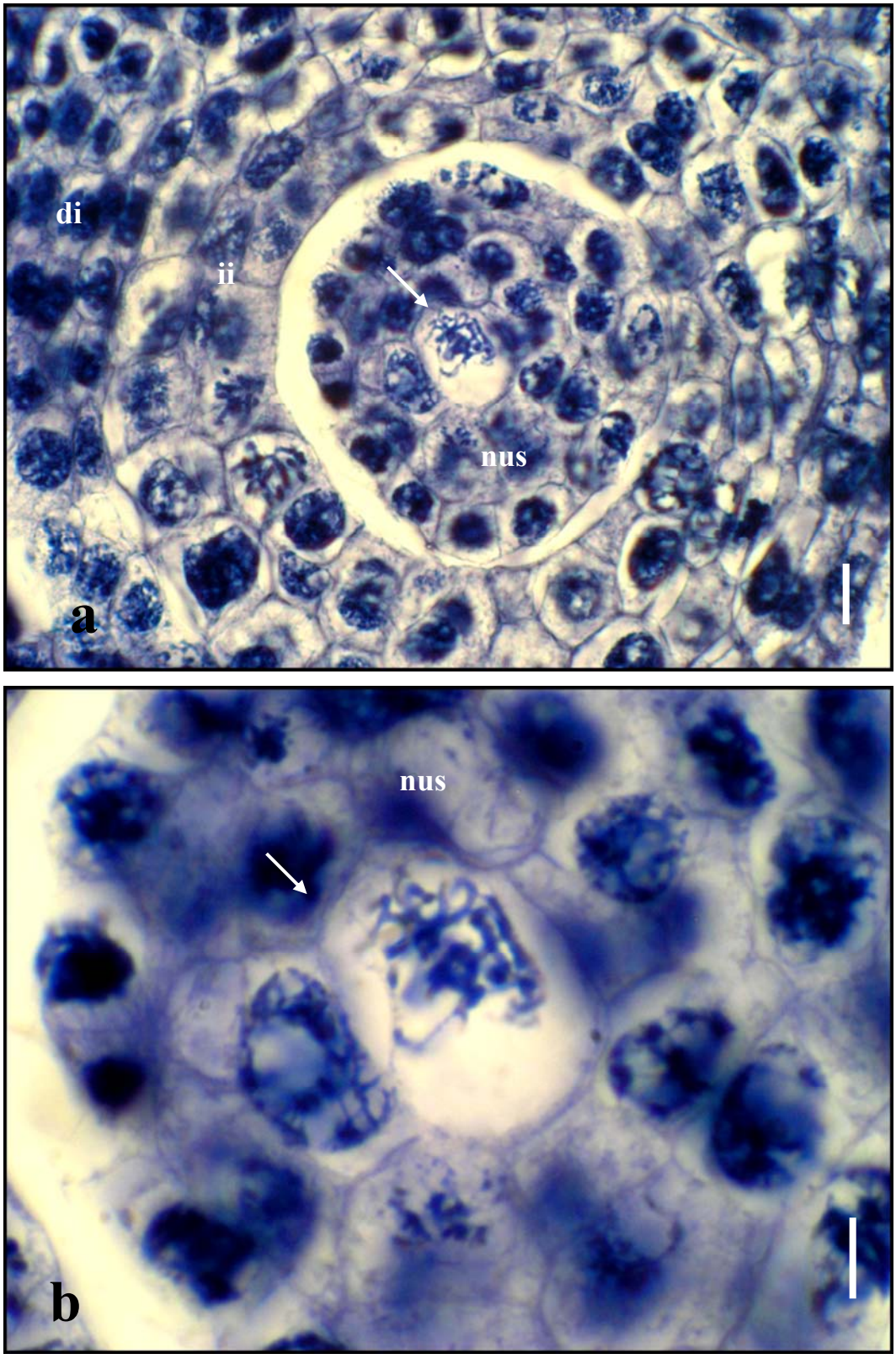
Şekil 4.58. Megasporangiyumda genç nusellus dokusu ve arkespor hücresi (oklar). a, Bar=30µm; b, Bar=10µm (N, nukleus; Nu, nukleolus; nus, nusellus; oç; ovaryum çeperi; ov, ovul)



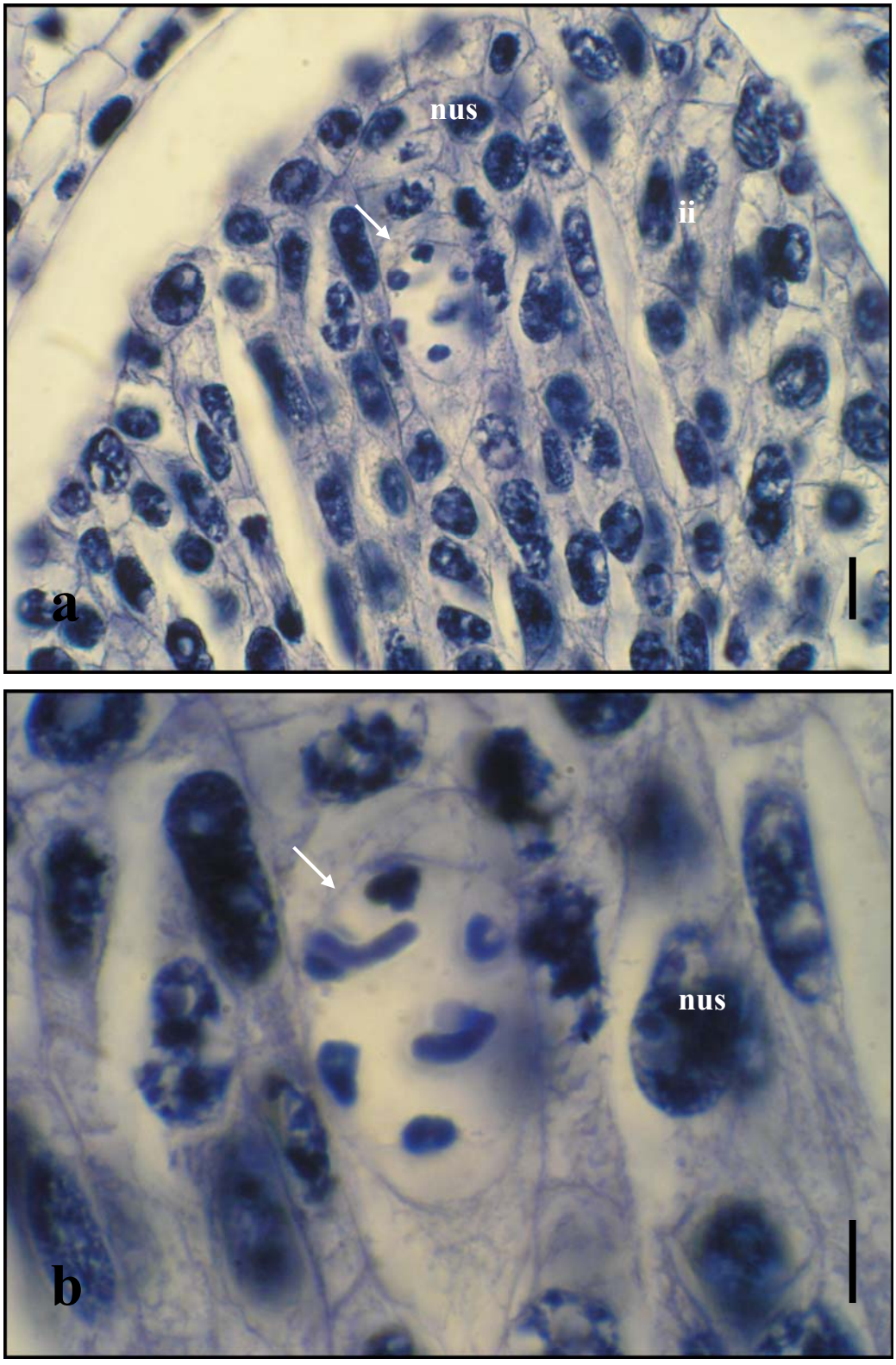
Şekil 4.59. Megasporangiyumda genç nusellus dokusu ve arkespor hücresi (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (nus, nusellus)



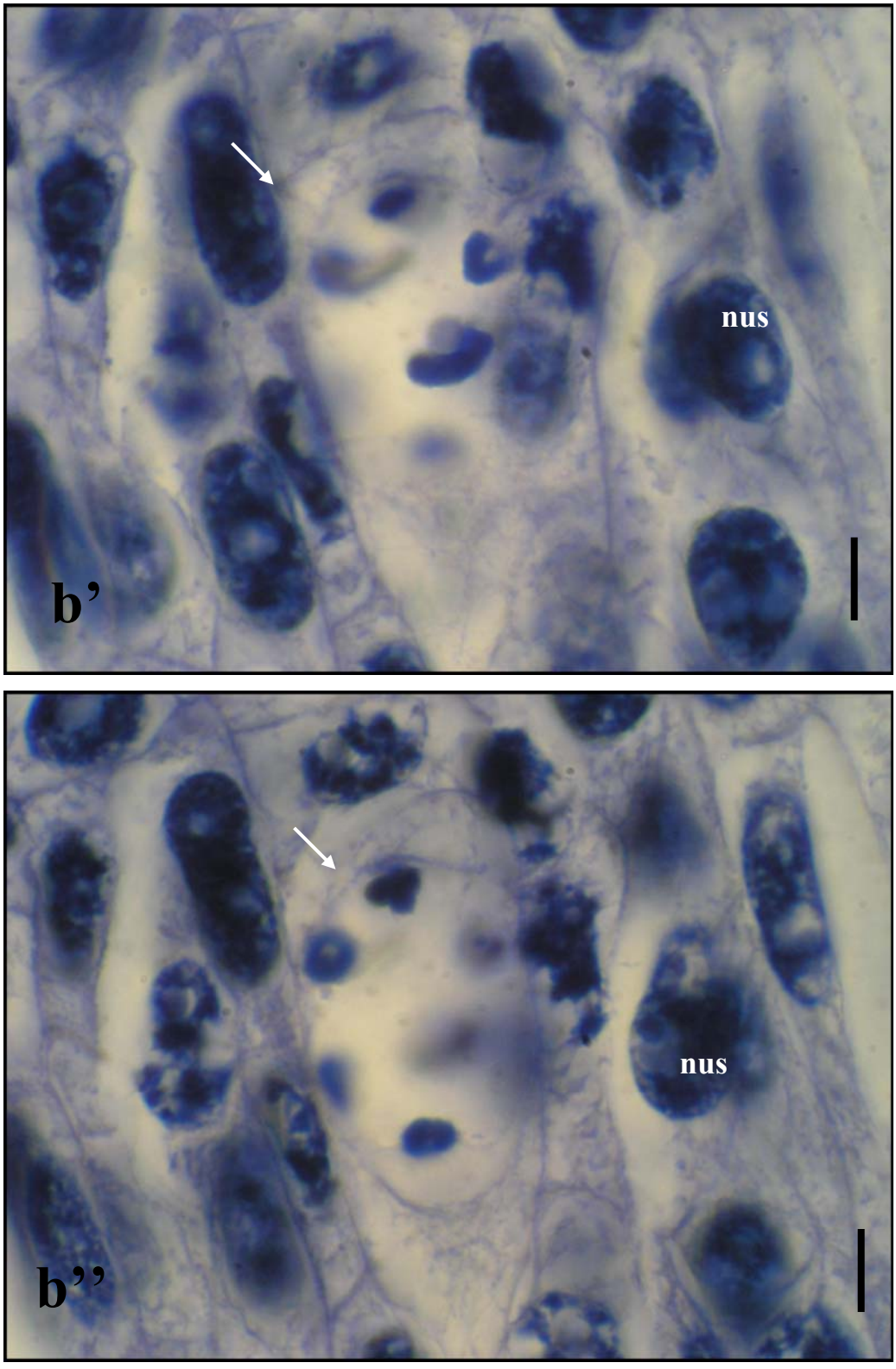
Şekil 4.60. Megasporangiyumda genç nusellus dokusu ve interfaz evresindeki megaspor ana hücresinin (oklar) üstten görünüşü. a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (MAH, megaspor ana hücresi; nus, nusellus)



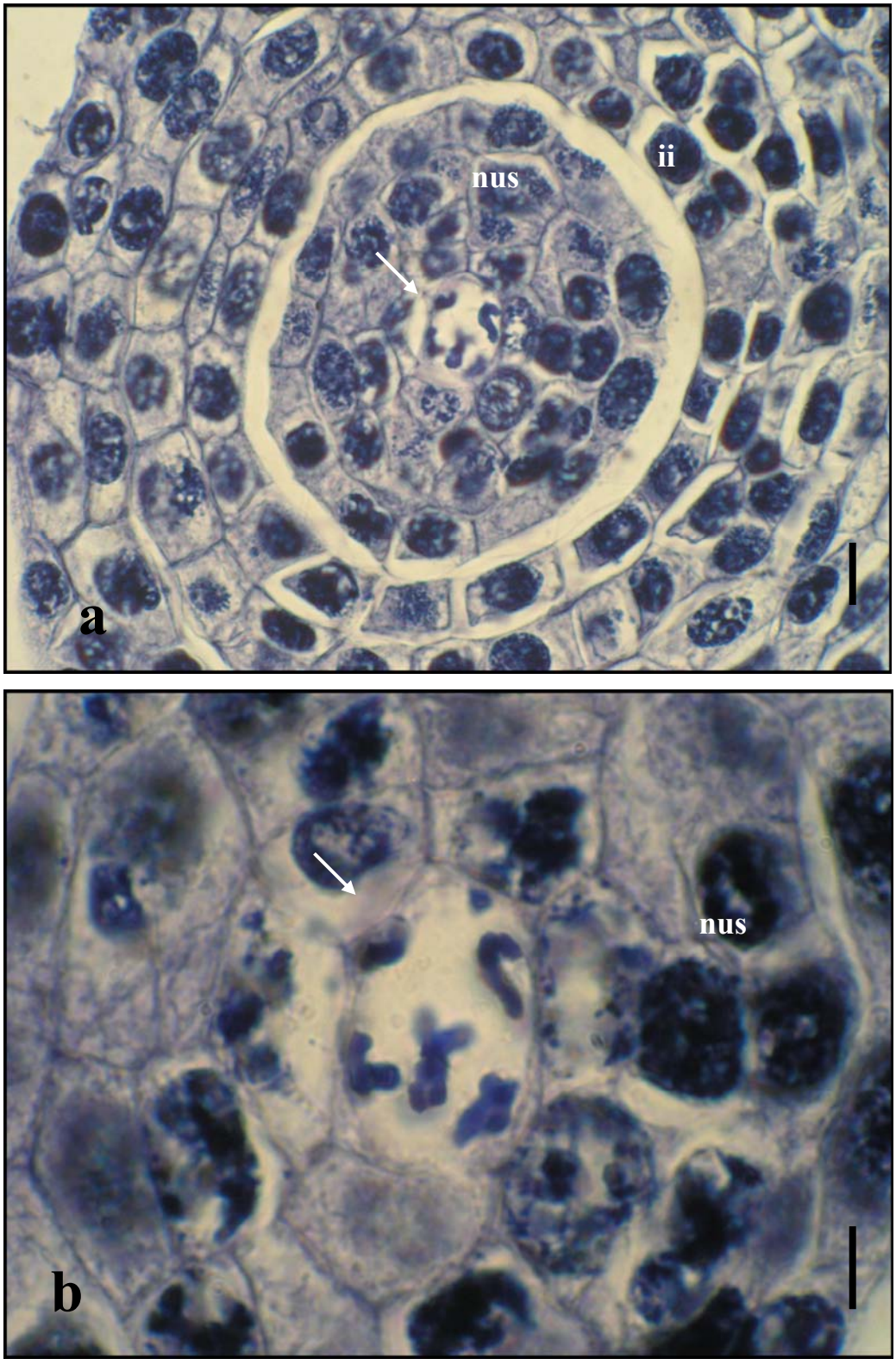
Şekil 4.61. Mayoz bölünmenin profaz I - zigoten evresindeki megaspor ana hücresinin üstten görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; nus nusellus)



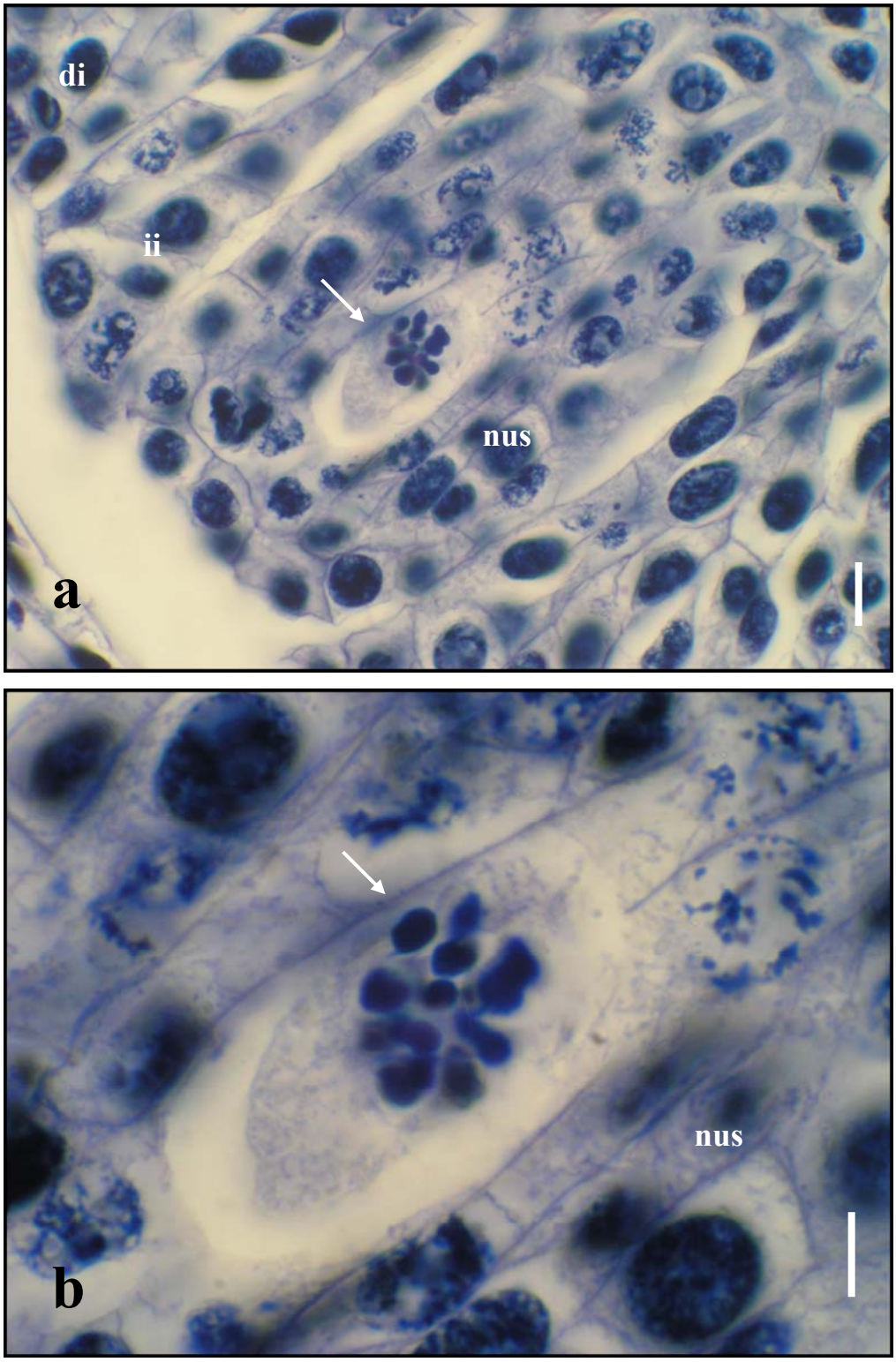
Şekil 4.62. Mayoz bölünmenin profaz I - diakinez evresindeki megaspor ana hücresinin yandan görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (ii, iç integüment; nus nusellus)



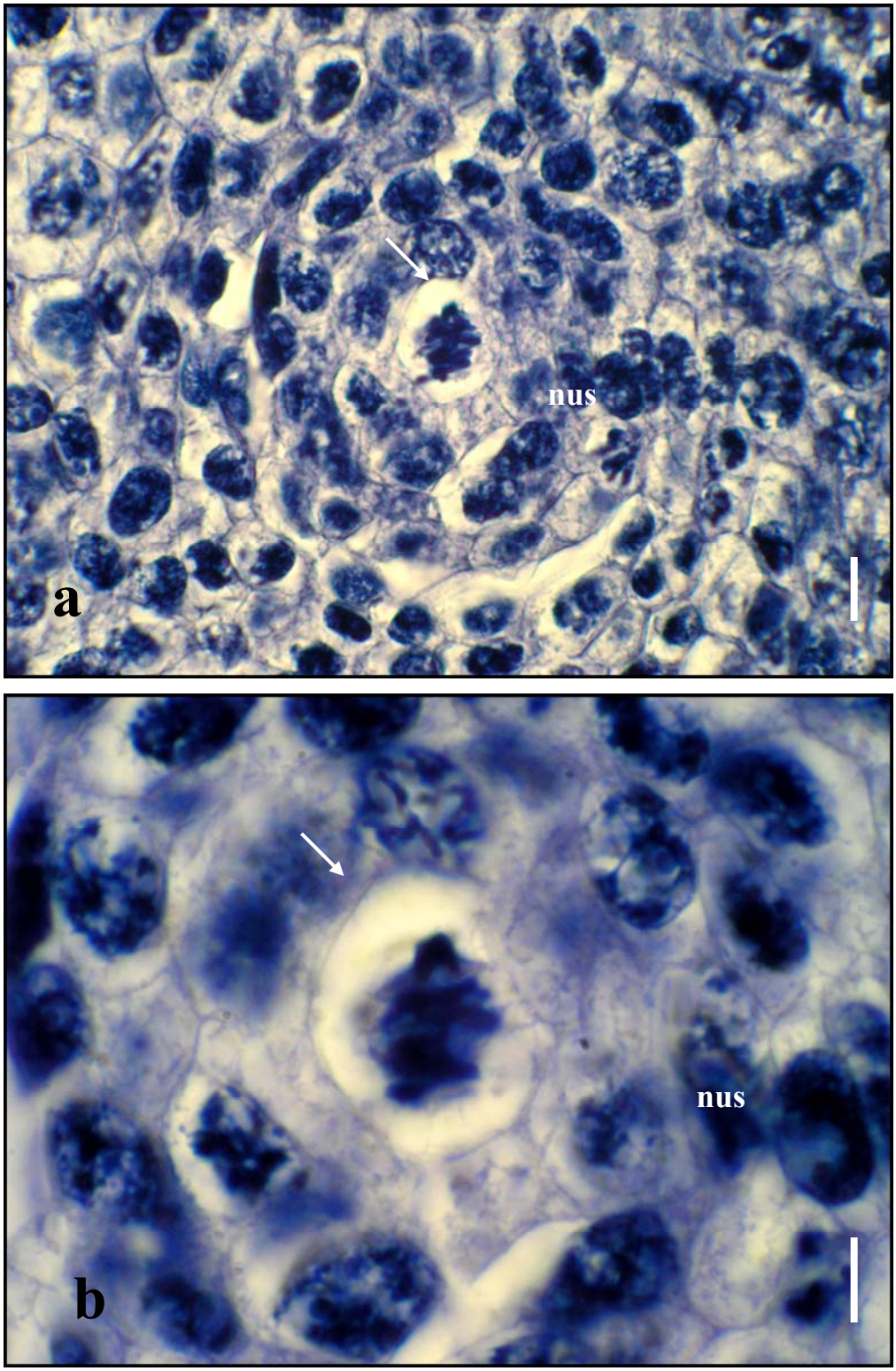
Şekil 4.63. Birbirini takip eden kesitlerde megaspor ana hücresinin mayoz bölünmesinin profaz I - diakinez evresinin yandan görünüşü (oklar). Barlar=10µm (nus nusellus)



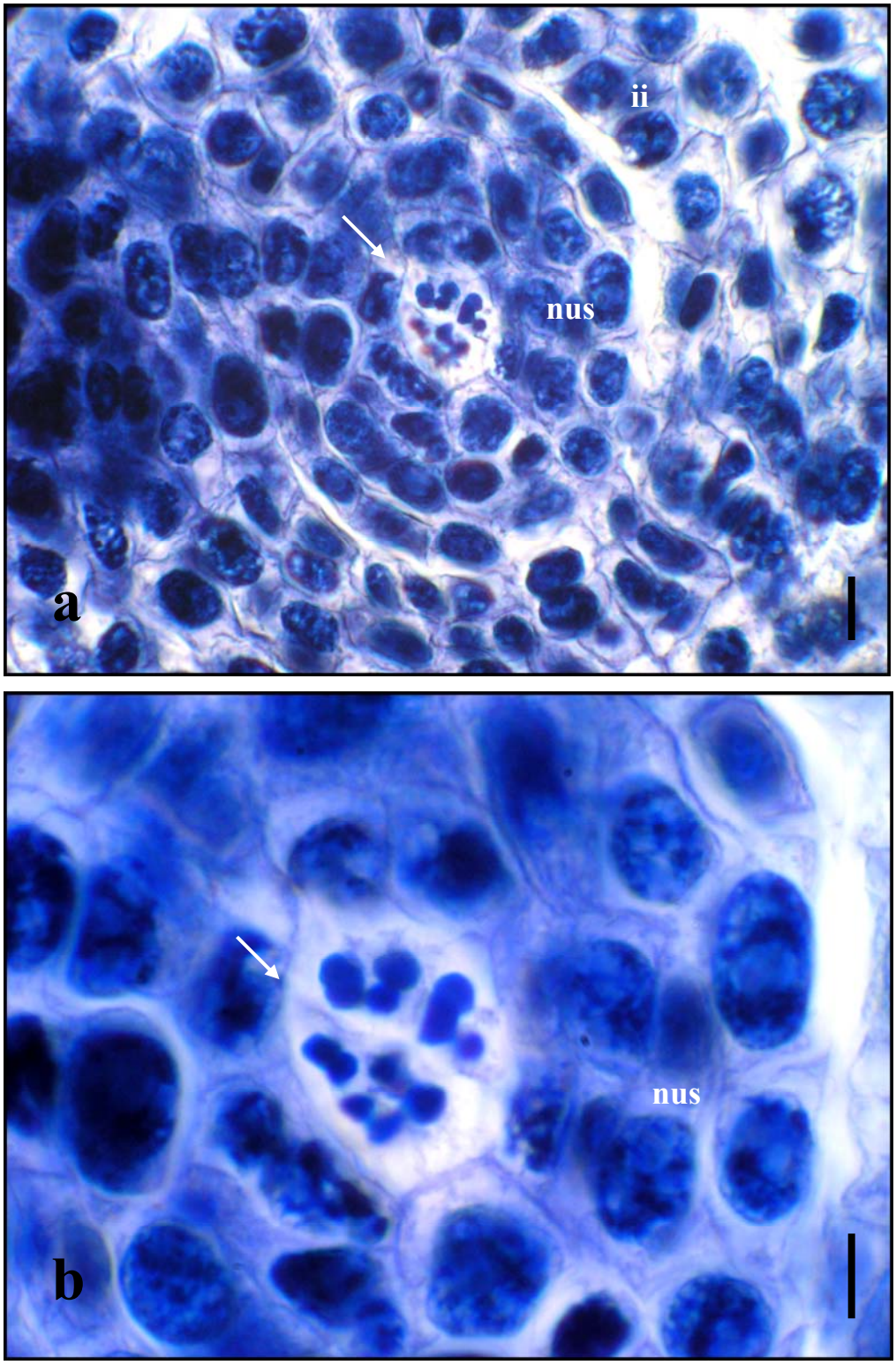
Şekil 4.64. Mayoz bölünmenin profaz I - diakinez evresindeki megaspor ana hücresinin üstten görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (ii, iç integüment; nus nusellus)



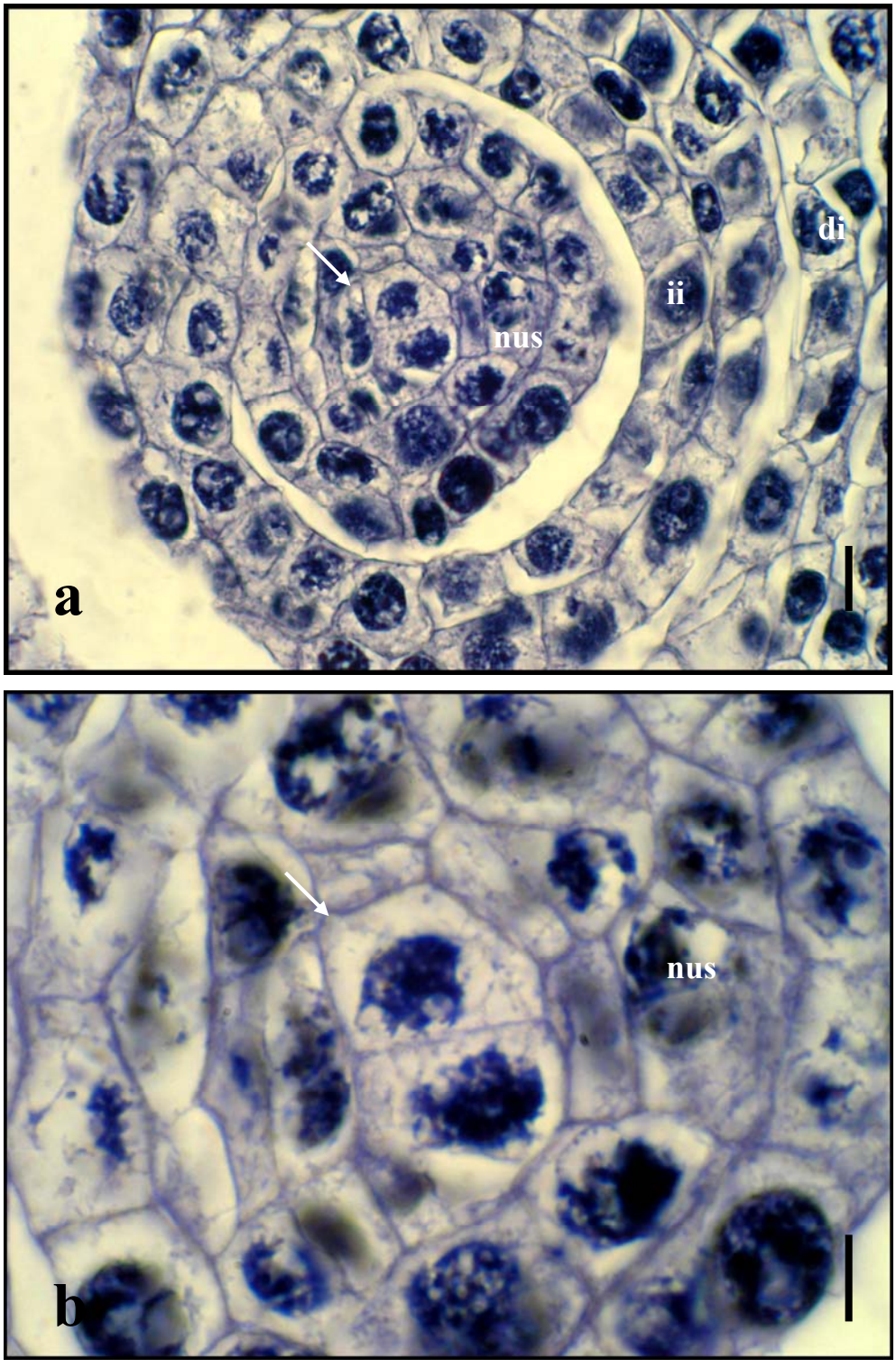
Şekil 4.65. Mayoz bölünmenin metafaz I evresindeki megaspor ana hücresinin yandan görünüşü (oklar). a, Bar=20µm b, Bar=10µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; nus, nusellus)



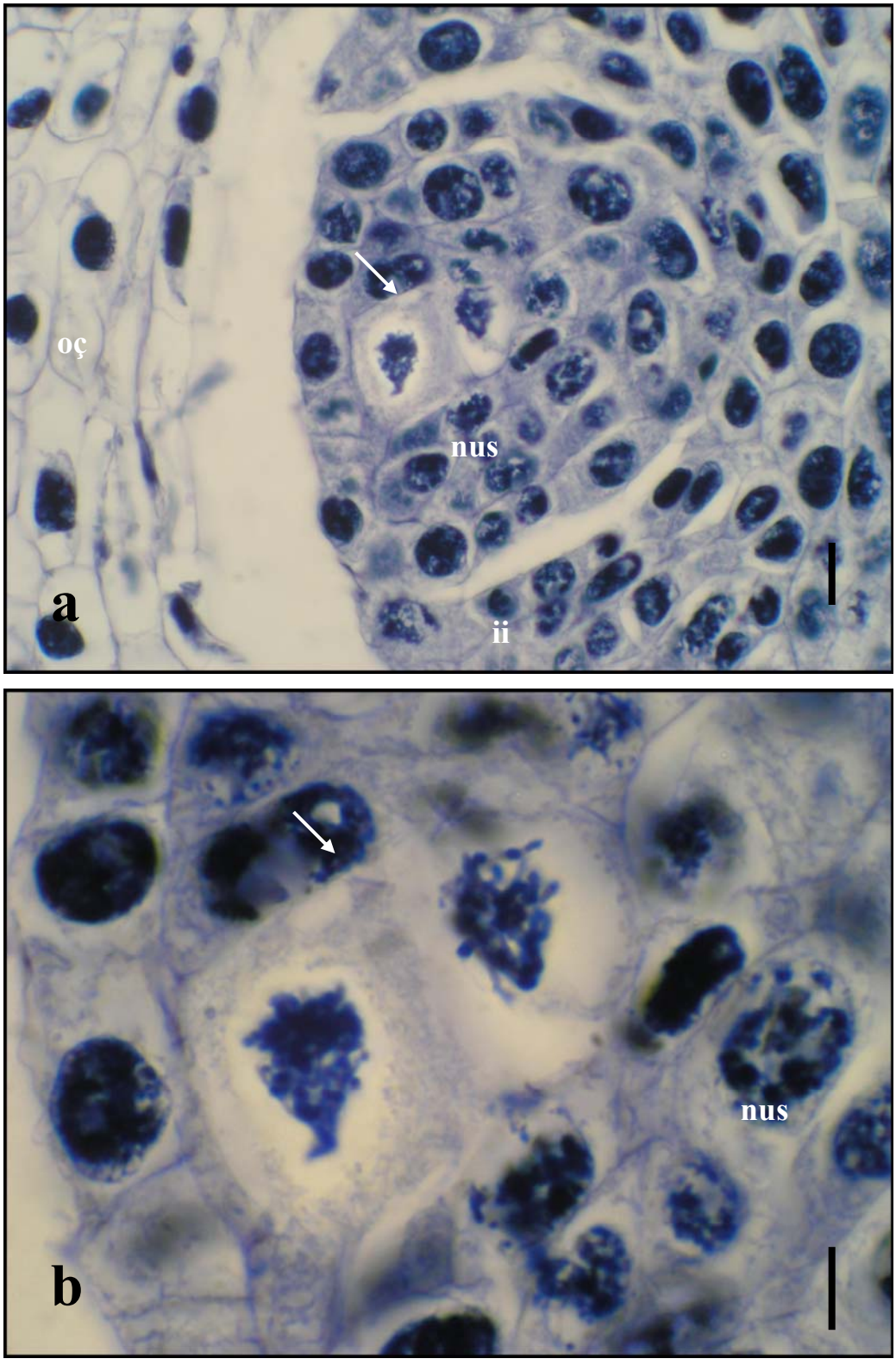
Şekil 4.66. Mayoz bölünmenin metafaz I evresindeki megaspor ana hücresinin üstten görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (nus, nusellus)



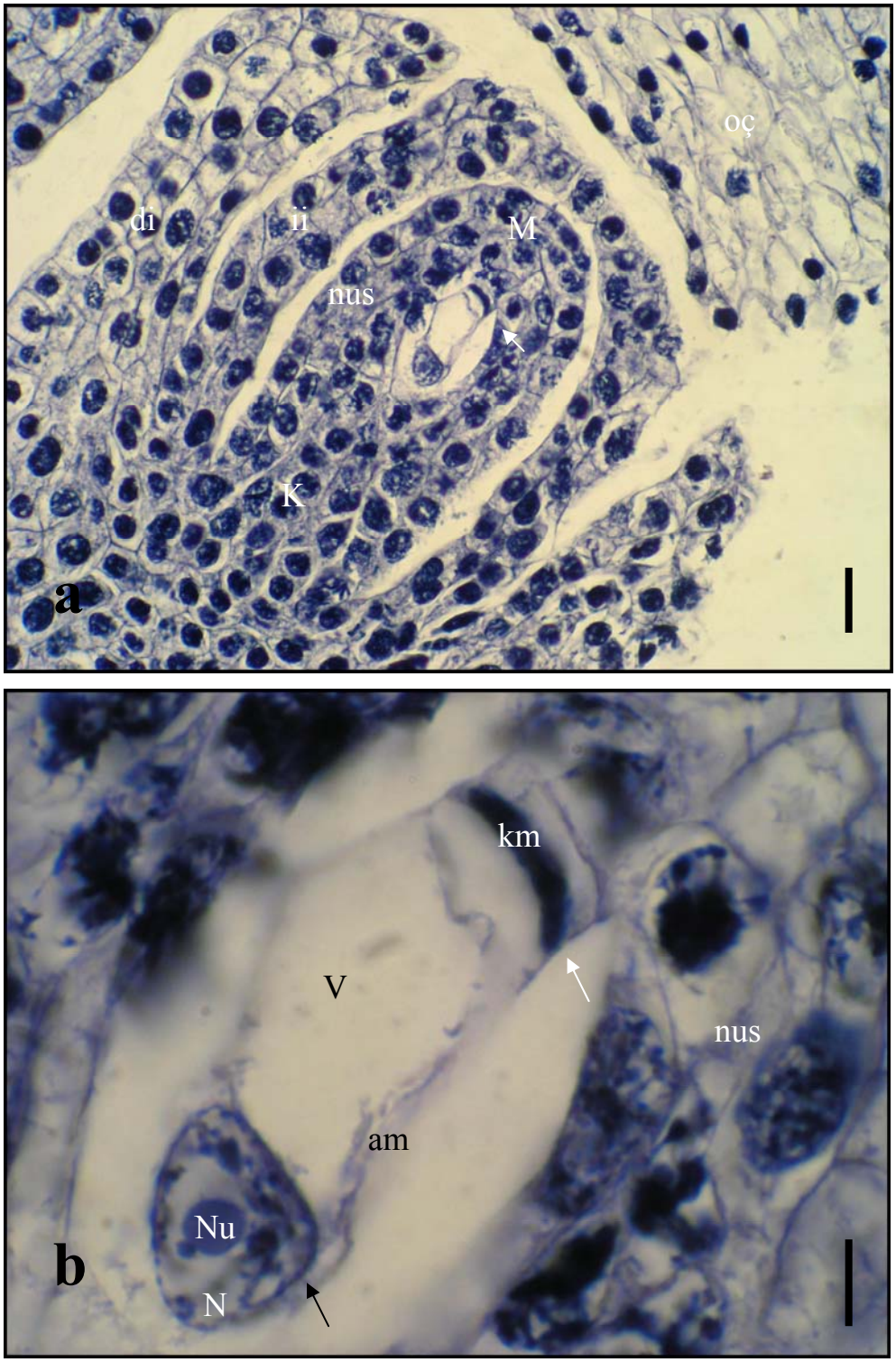
Şekil 4.67. Mayoz bölünmenin anafaz I evresindeki megaspor ana hücresinin üstten görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (ii, iç integüment; nus, nusellus)



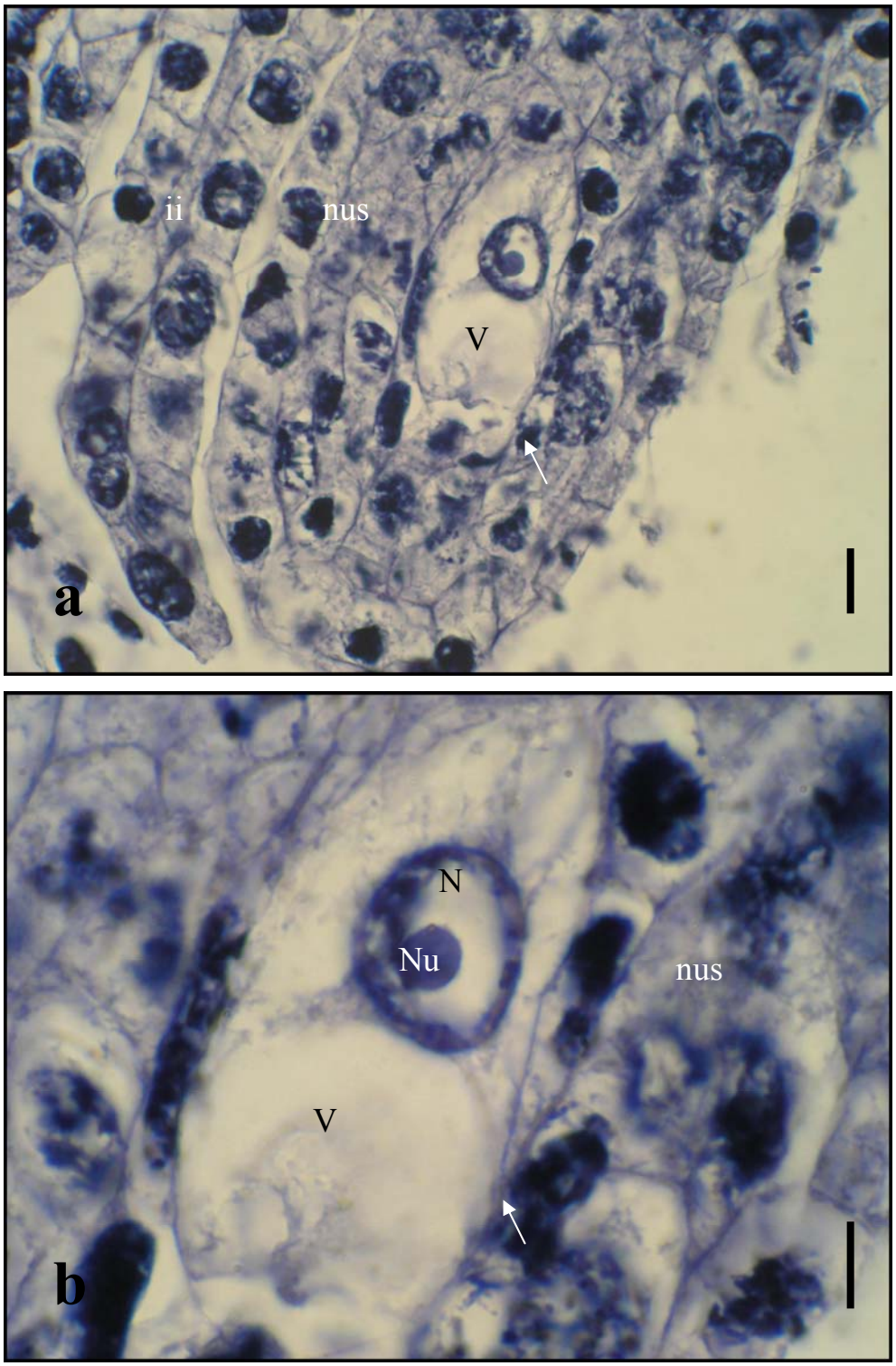
Şekil 4.68. Mayoz bölünmenin telofaz I evresindeki megaspor ana hücresinin yandan görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; nus, nusellus)



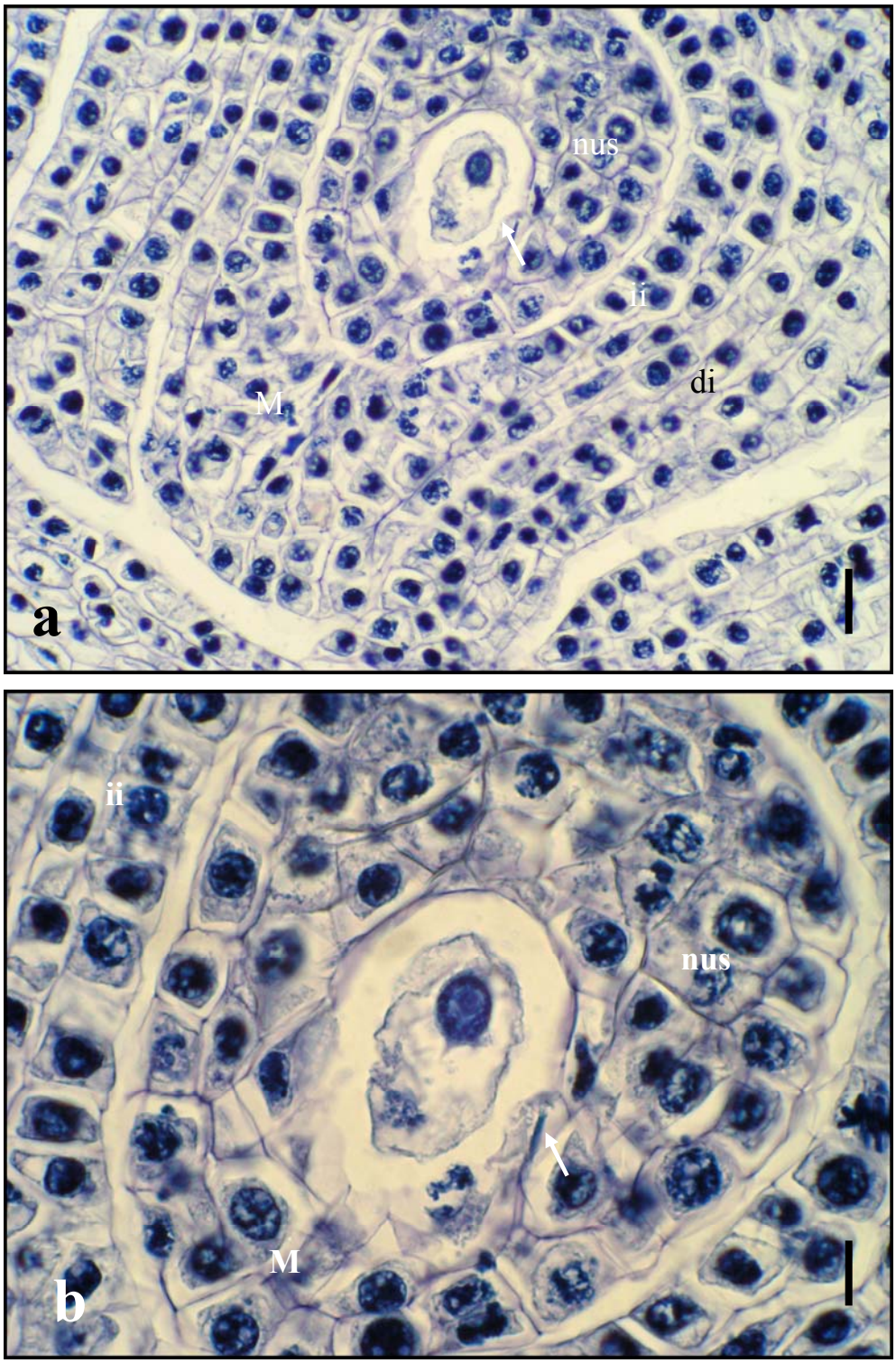
Şekil 4.69. Megasporogenezde oluşan diad evresinin yandan görünüşü (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (ii, iç integüment; nus, nusellus; oç, ovaryum çeperi)



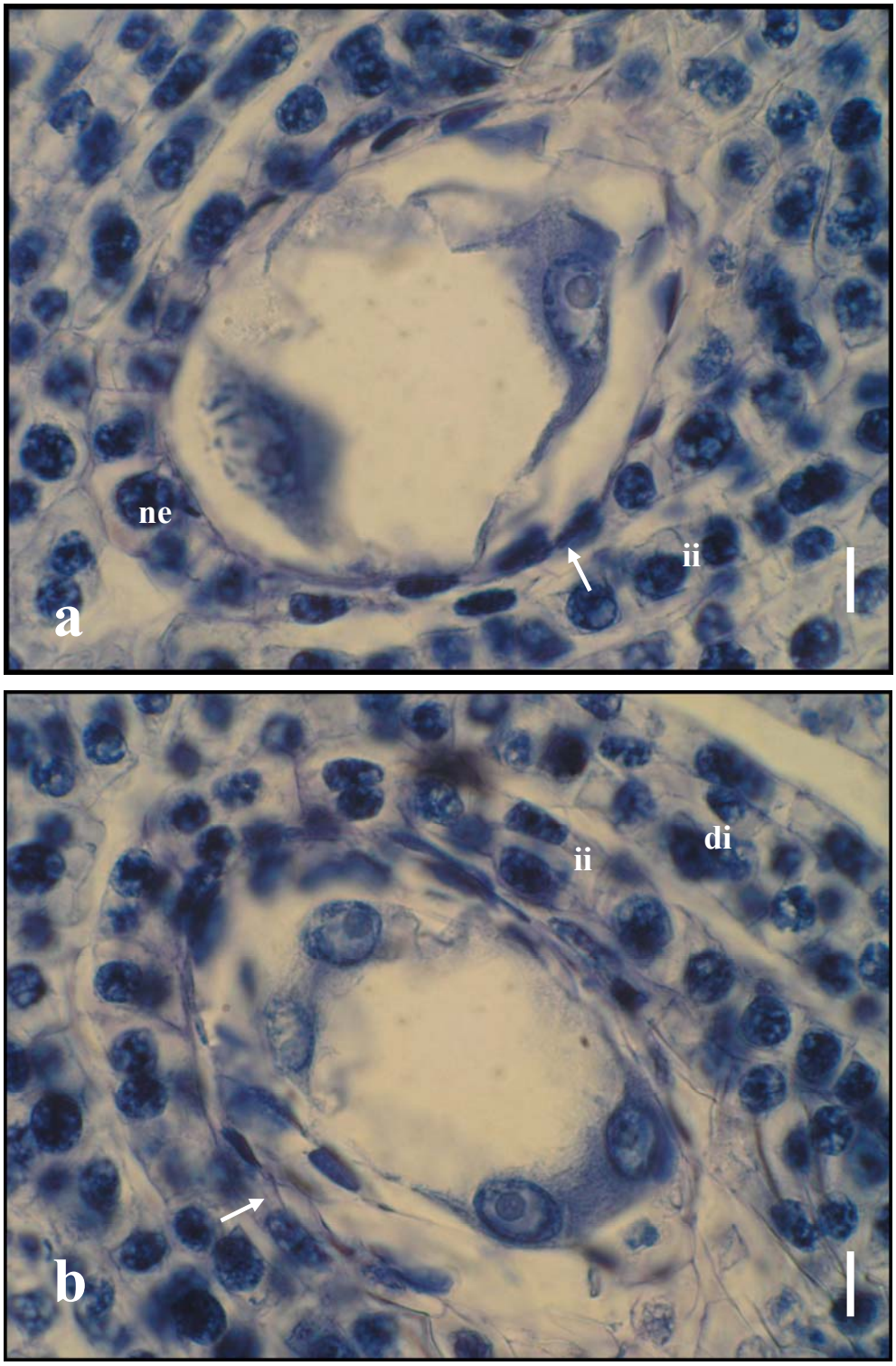
Şekil 4.70. Diadı oluşturan aktif ve körelen megasporun yandan görünüşü (oklar). a, Bar=30µm; b, Bar=10µm (am, aktif megaspor; di, dış integüment; ii, iç integüment; K, kalaza; km, körelen megaspor; M, mikropil; N, nukleus; Nu, nukleolus; nus, nusellus; oç, ovaryum çeperi; V, vakuol)



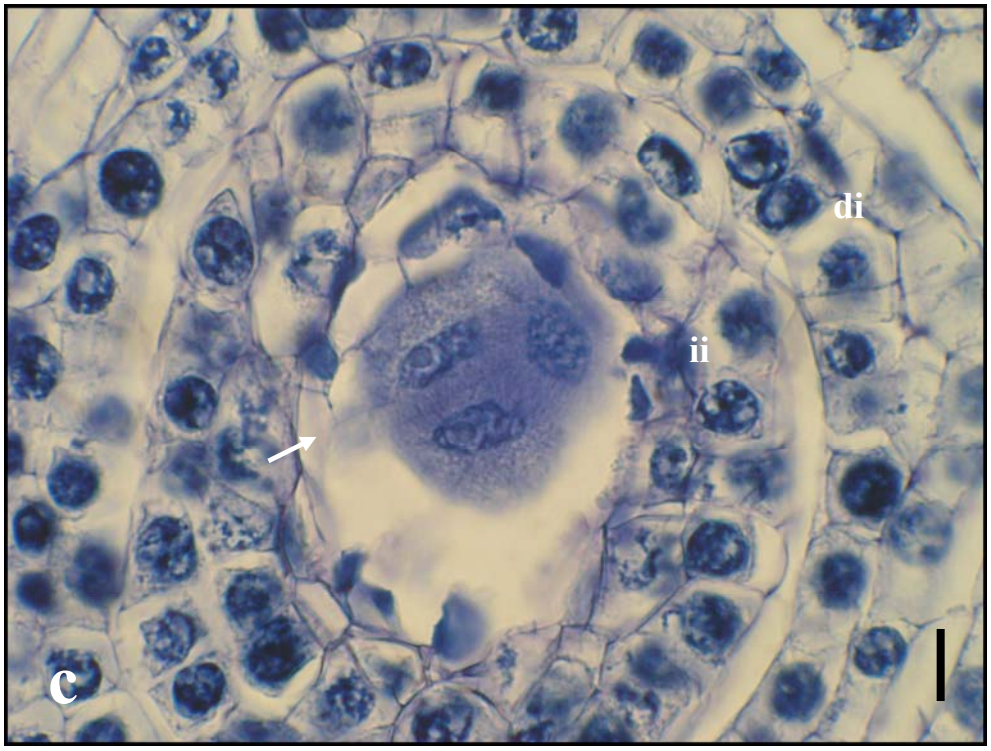
Şekil 4.71. Megagametogenezde, vakuolden dolayı polarite gösteren aktif megaspor hücresi (oklar). a, Bar=20µm; b, Bar=10µm (ii, iç integüment; N, nukleus; Nu, nukleolus; nus, nusellus; V, vakuol)



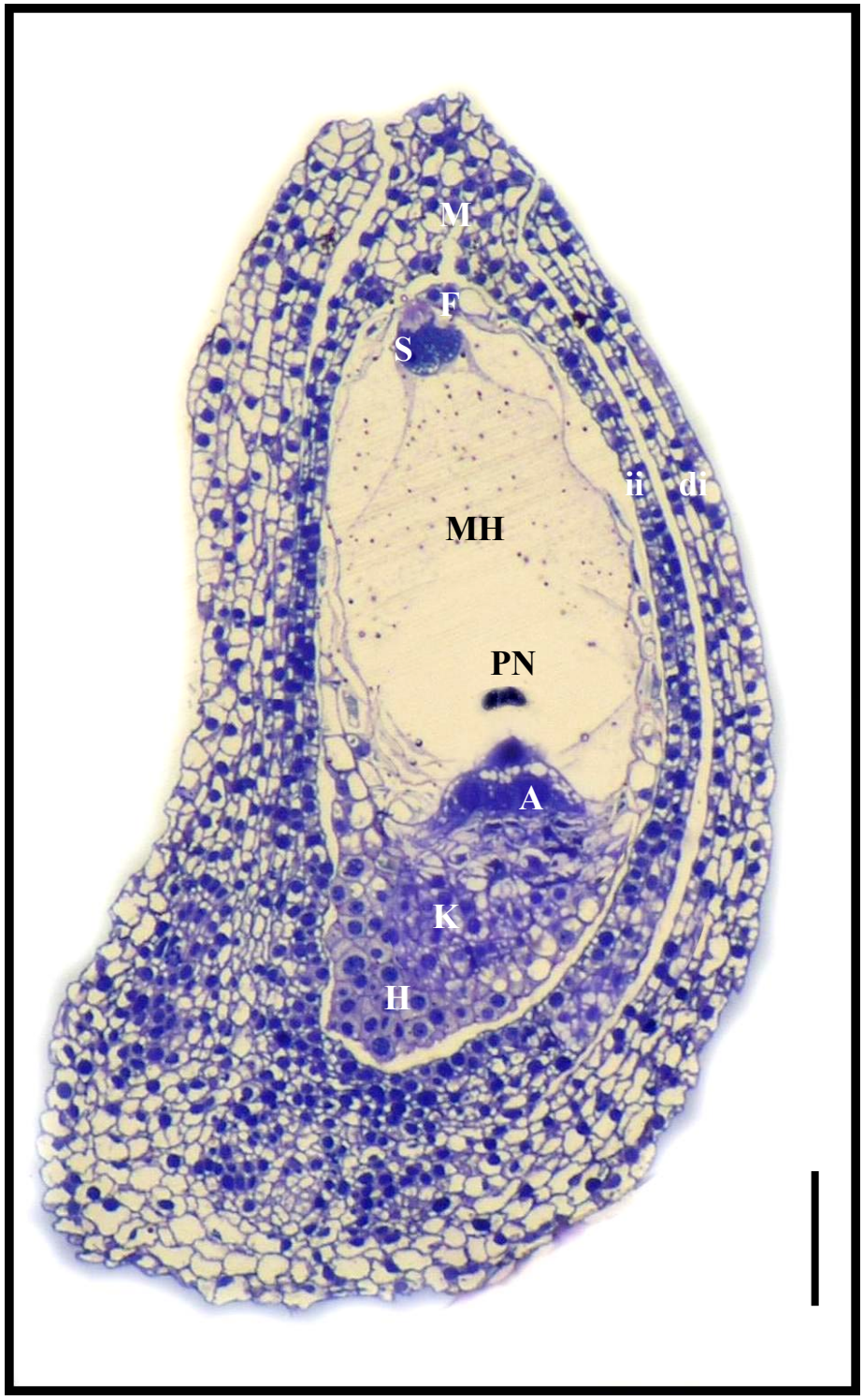
Şekil 4.72. Megagametogenezde iki nukleuslu evre (oklar). a, Bar=30µm; b, Bar=20µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; M, mikropil; nus, nusellus)



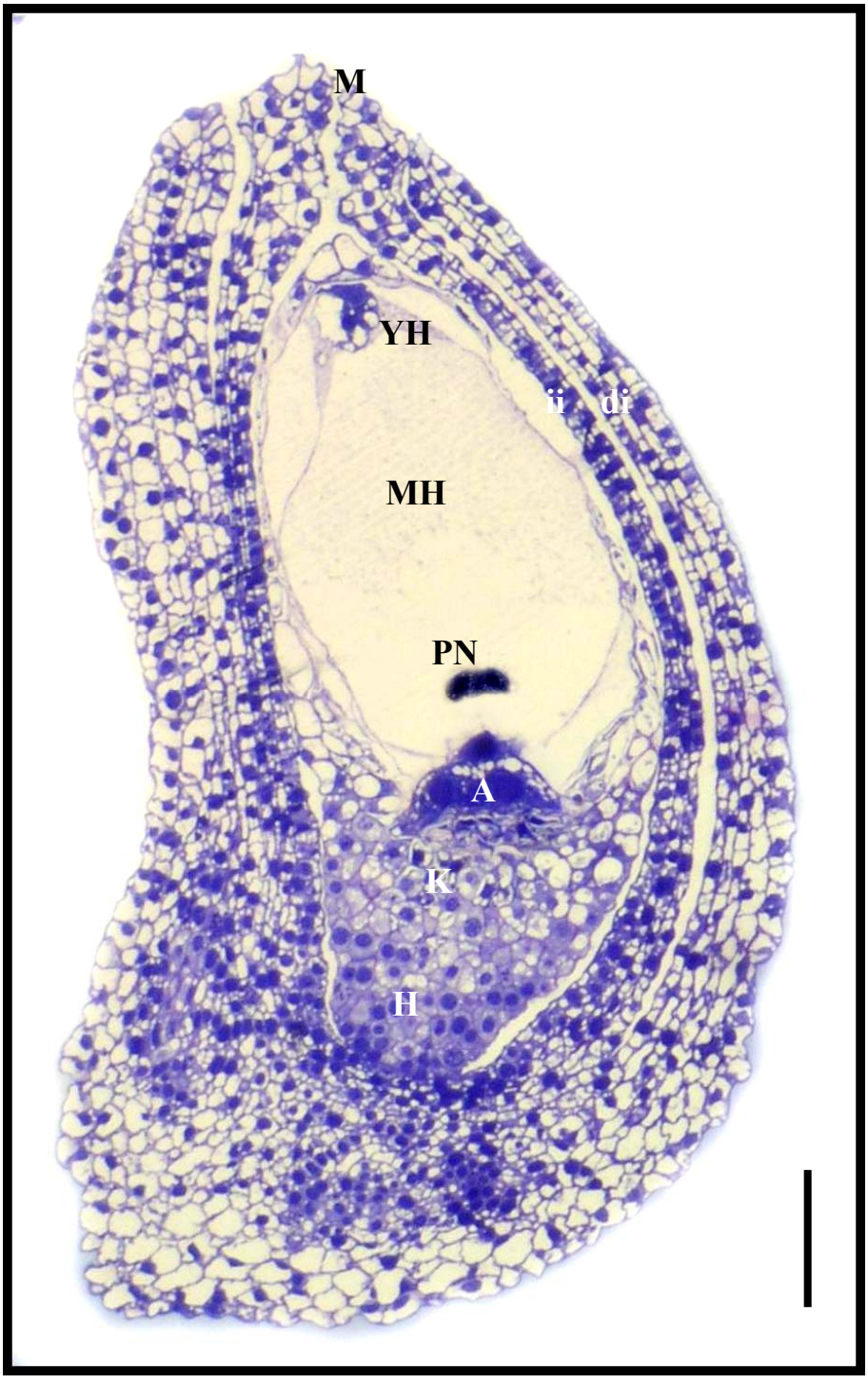
Şekil 4.73. Megagametogenezde a, iki nukleuslu evre; b, dört nukleuslu evre, (oklar) Barlar=20µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; ne, nusellar epidermis)



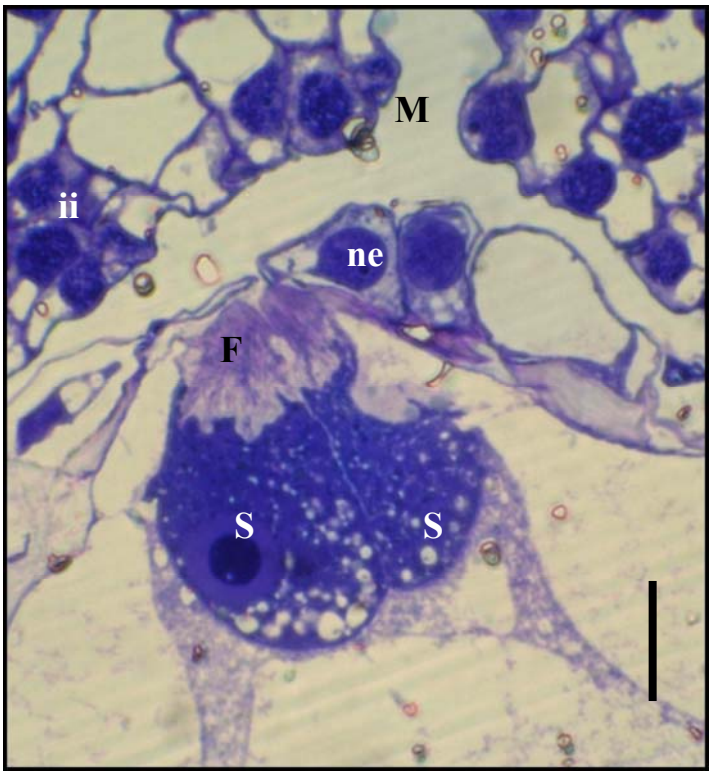
Şekil 4.73. (devam) Megagametogenezde c, sekiz nukleuslu evrenin üstten görünüşü. (ok) Barlar=20µm (di, dış integüment; ii, iç integüment)



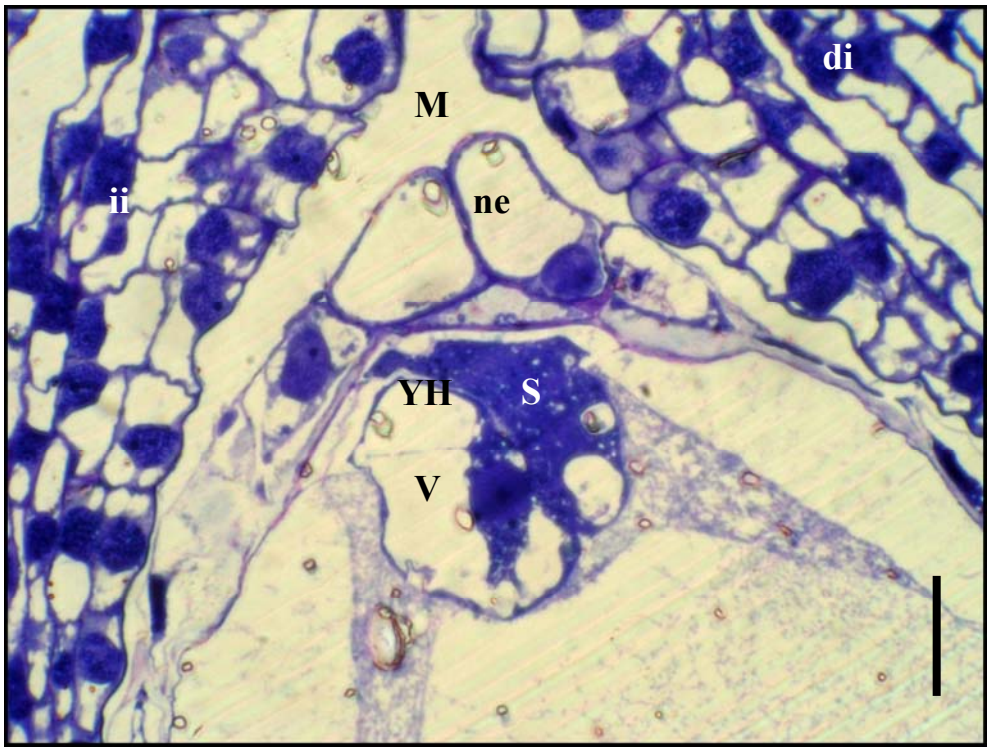
Şekil 4.74. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesi. Bar=120µm (A, antipod; di, dış integüment; F, filiform aparatus; H, hipostase; ii, iç integüment; K, kalaza; M, mikropil; MH, merkezi hücre; PN, polar nukleus; S, sinergid)



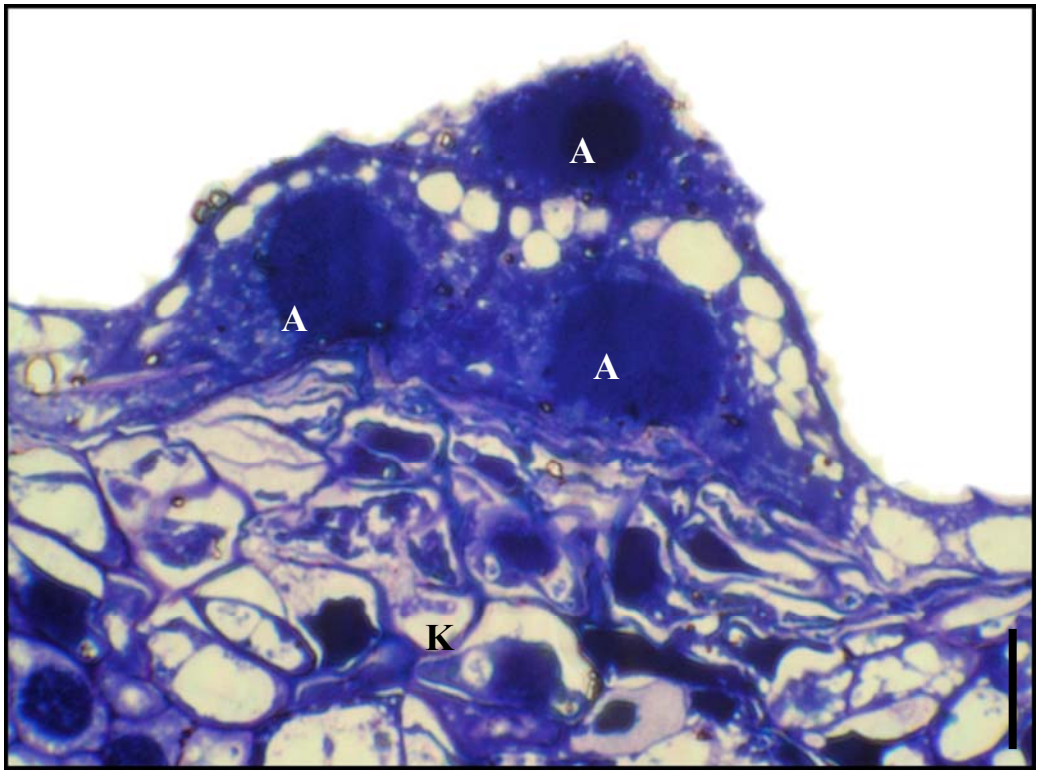
Şekil 4.75. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesi. Bar=120µm (A, antipod; di, dış integüment; H, hipostase; ii, iç integüment; K, kalaza; M, mikropil; MH, merkezi hücre; PN, polar nukleus; YH, yumurta hücresi)



Şekil 4.76. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinde, sinergid hücrelerinin yandan görünüşü. Bar=20µm (F, filiform aparatus; ii, iç integüment; M, mikropil; ne, nusellar epidermis; S, sinergid)



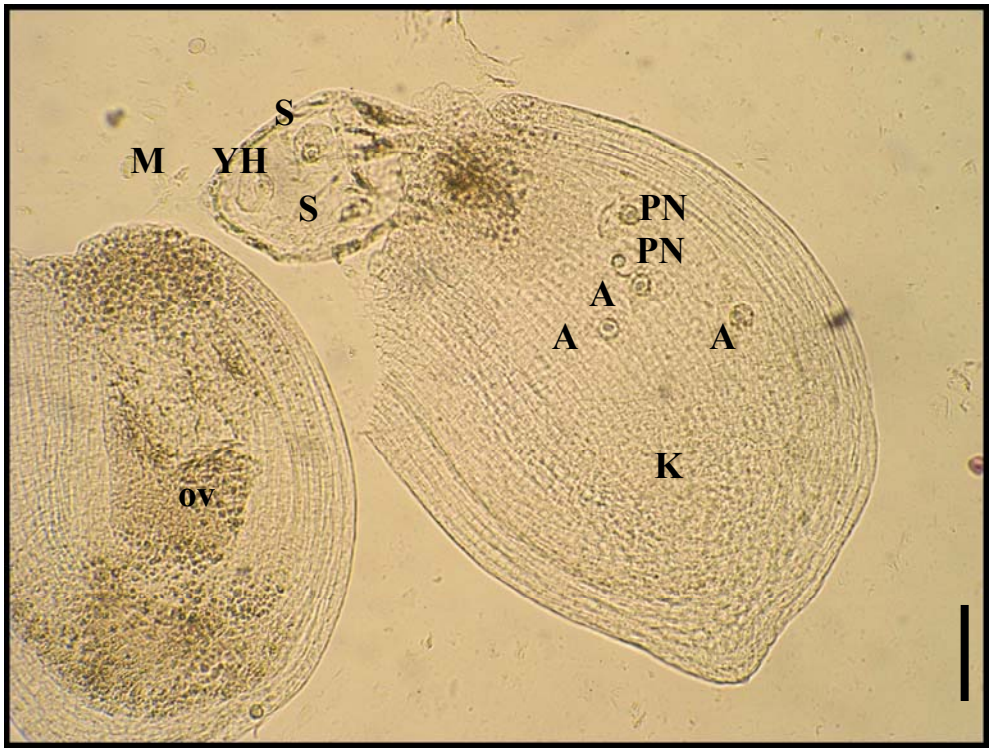
Şekil 4.77. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinde, yumurta ve sinergid hücrelerinin yandan görünüşü. Bar=20µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; M, mikropil; ne, nusellar epidermis; S, sinergid; V, vakuol; YH, yumurta hücresi)



Şekil 4.78. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinin kalaza tarafındaki antipod hücrelerinin yandan görünüşü. Bar=20µm (A, antipod; K, kalaza)



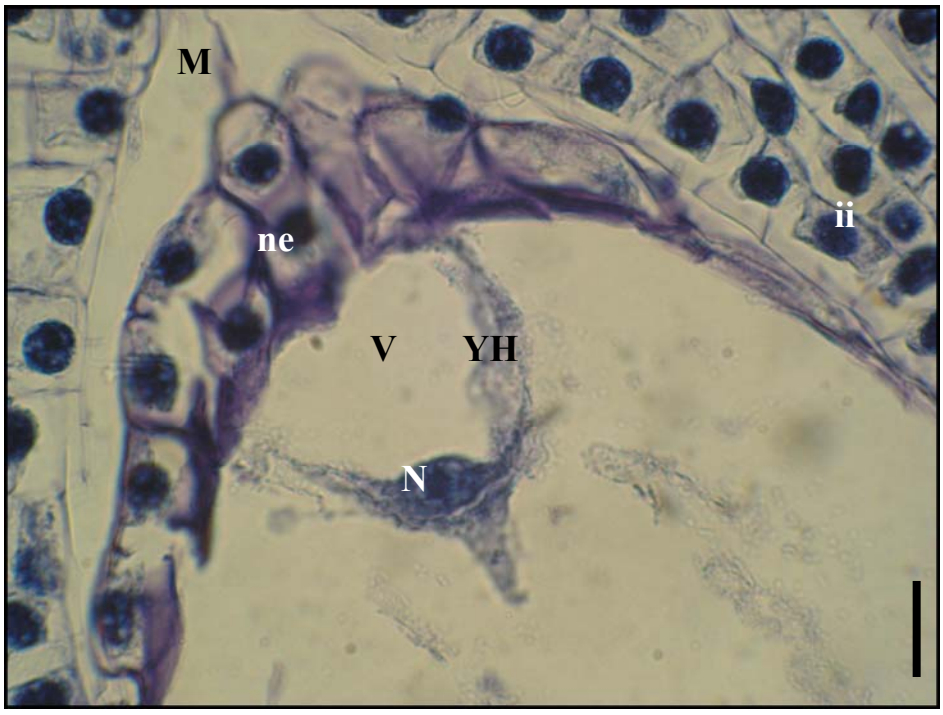
Şekil 4.79. Temizleme tekniği ile tohum taslağından dışarı çıkarılan olgun embriyo kesesinin mikropil kısmı. Bar=20µm (S, sinergid; PN, polar nukleus; YH, yumurta hücresi)



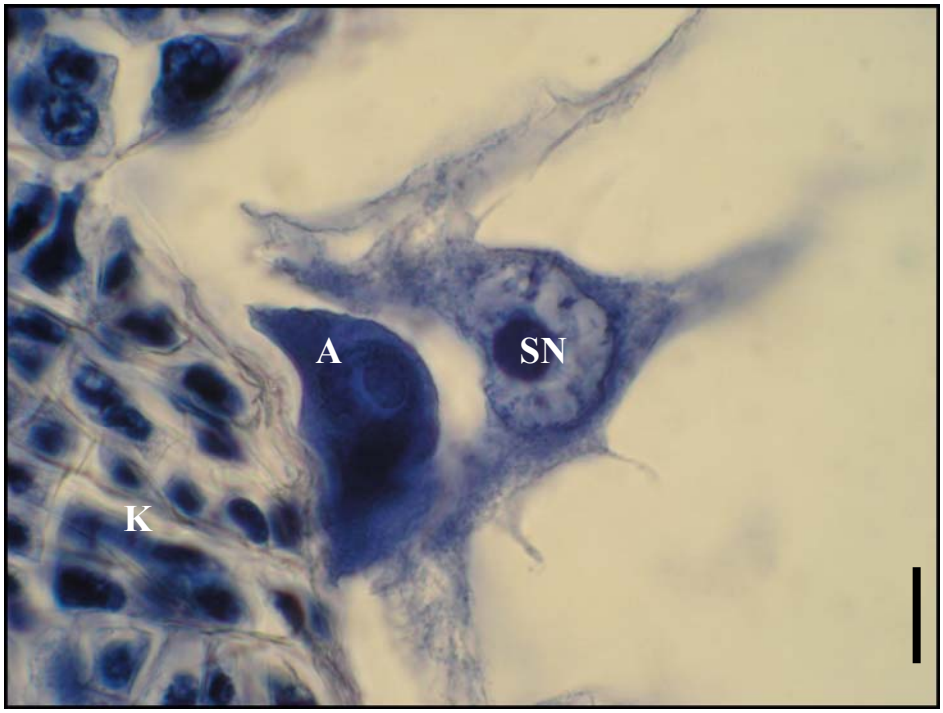
Şekil 4.80. Temizleme tekniği ile tohum taslağından dışarı çıkarılan olgun embriyo kesesi. Bar=150µm (A, antipod; K, kalaza; M, mikropil; ov, ovul; PN, polar nukleus; S, sinergid; YH, yumurta hücresi)



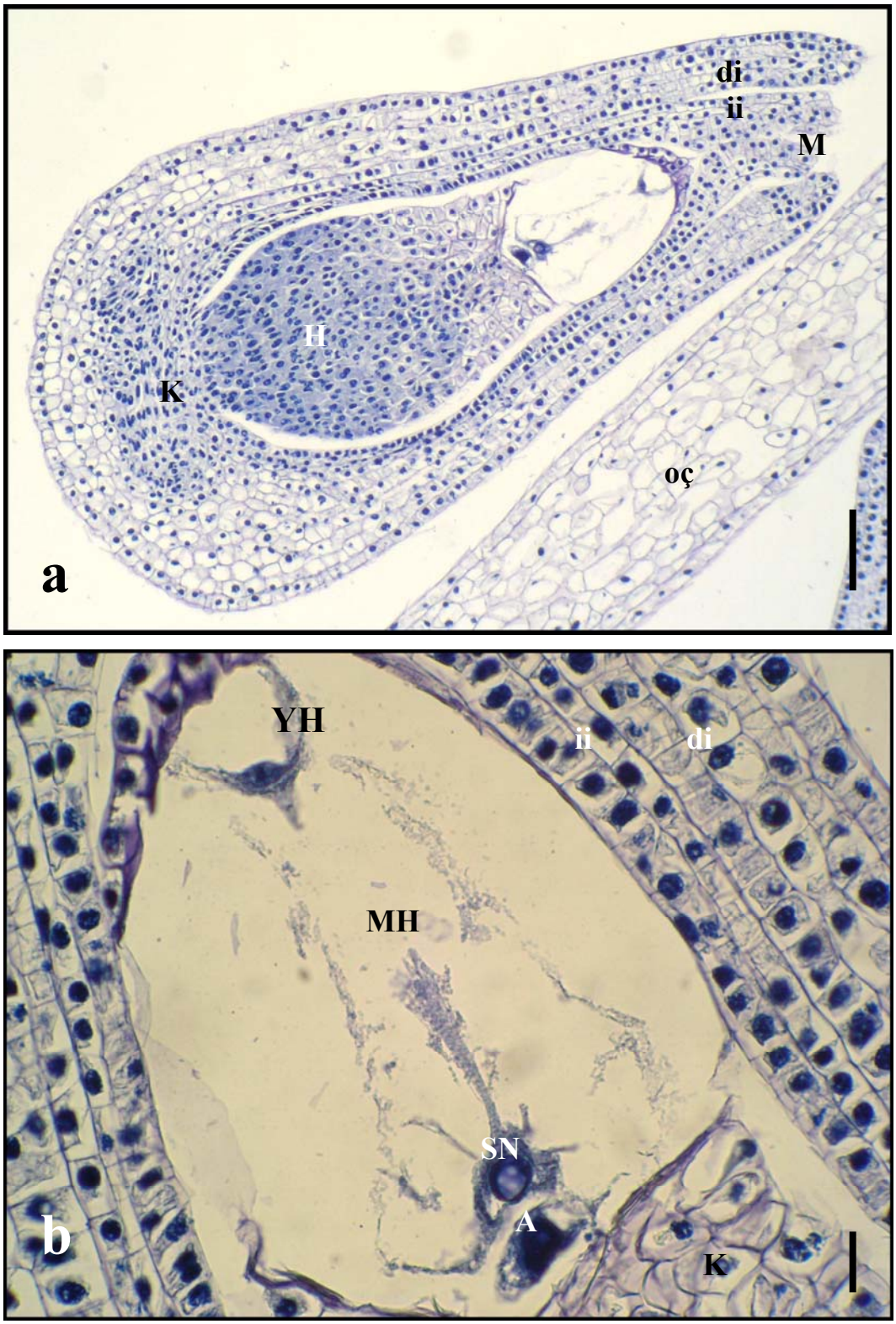
Şekil 4.81. Temizleme tekniği ile tohum taslağından dışarı çıkarılan olgun embriyo kesesi. Bar=50µm (K, kalaza; M, mikropil; ov, ovul; PN, polar nukleus; S, sinergid; YH, yumurta hücresi)



Şekil 4.82. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinin mikropil bölgesinde bulunan yumurta hücresi. Bar=20µm (ii, iç integüment; M, mikropil; N, nukleus; ne, nusellar epidermis; V, vakuol; YH, yumurta hücresi)



Şekil 4.83. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinde sekonder nukleus ve antipod hücresi. Bar=20µm (A, antipod; K, kalaza; SN, sekonder nukleus)



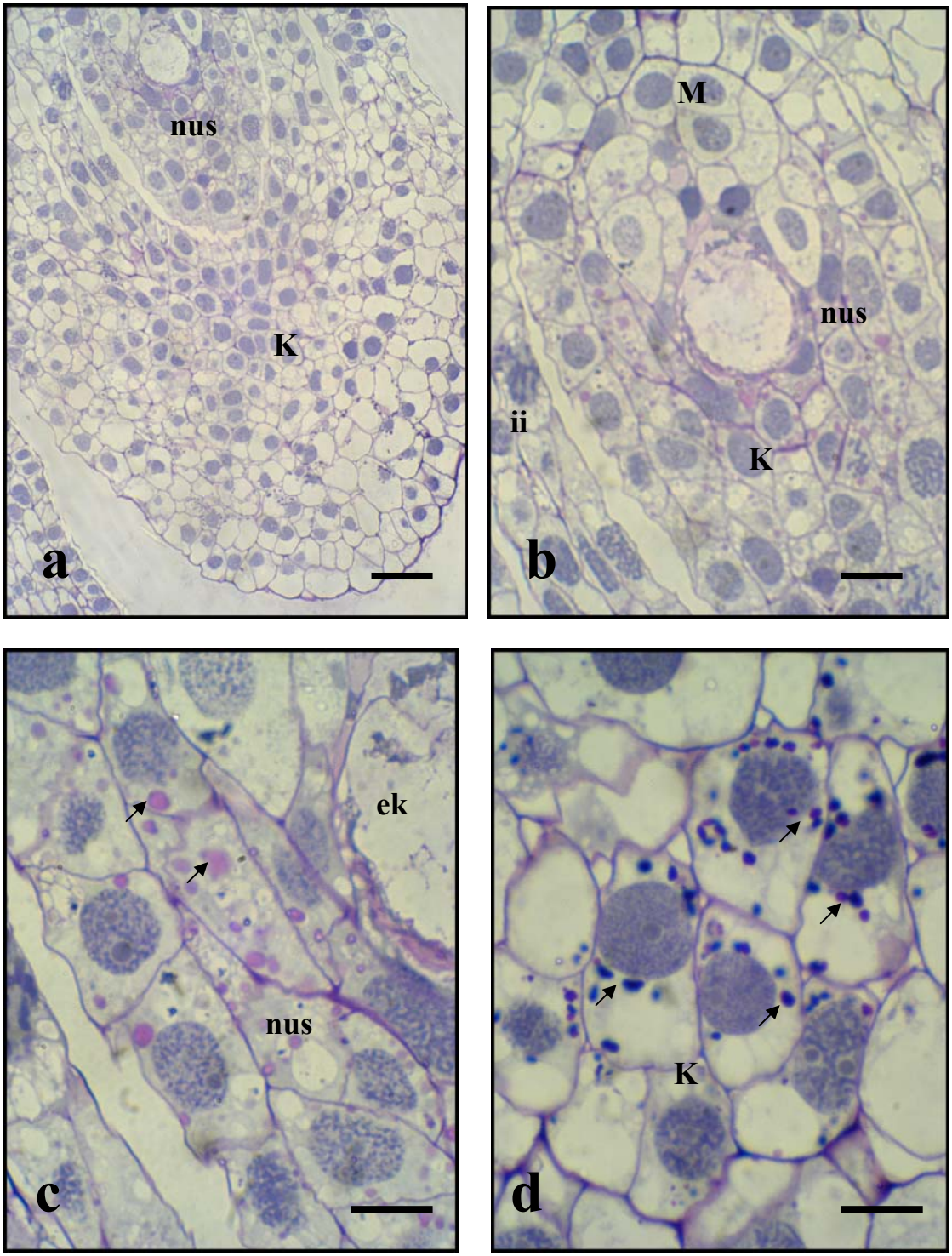
Şekil 4.84. *L. aestivum*'un olgun embriyo kesesinde; a, ovulun genel görünüşü Bar=150µm; b, olgun embriyo kesesi ve integümentler Bar=30µm (A, antipod; di, dış integüment; H, hipostase; ii, iç integüment; K, kalaza; M, mikropil; MH, merkezi hücre; ov, ovaryum çeperi; SN, sekonder nukleus; YH, yumurta hücresi)



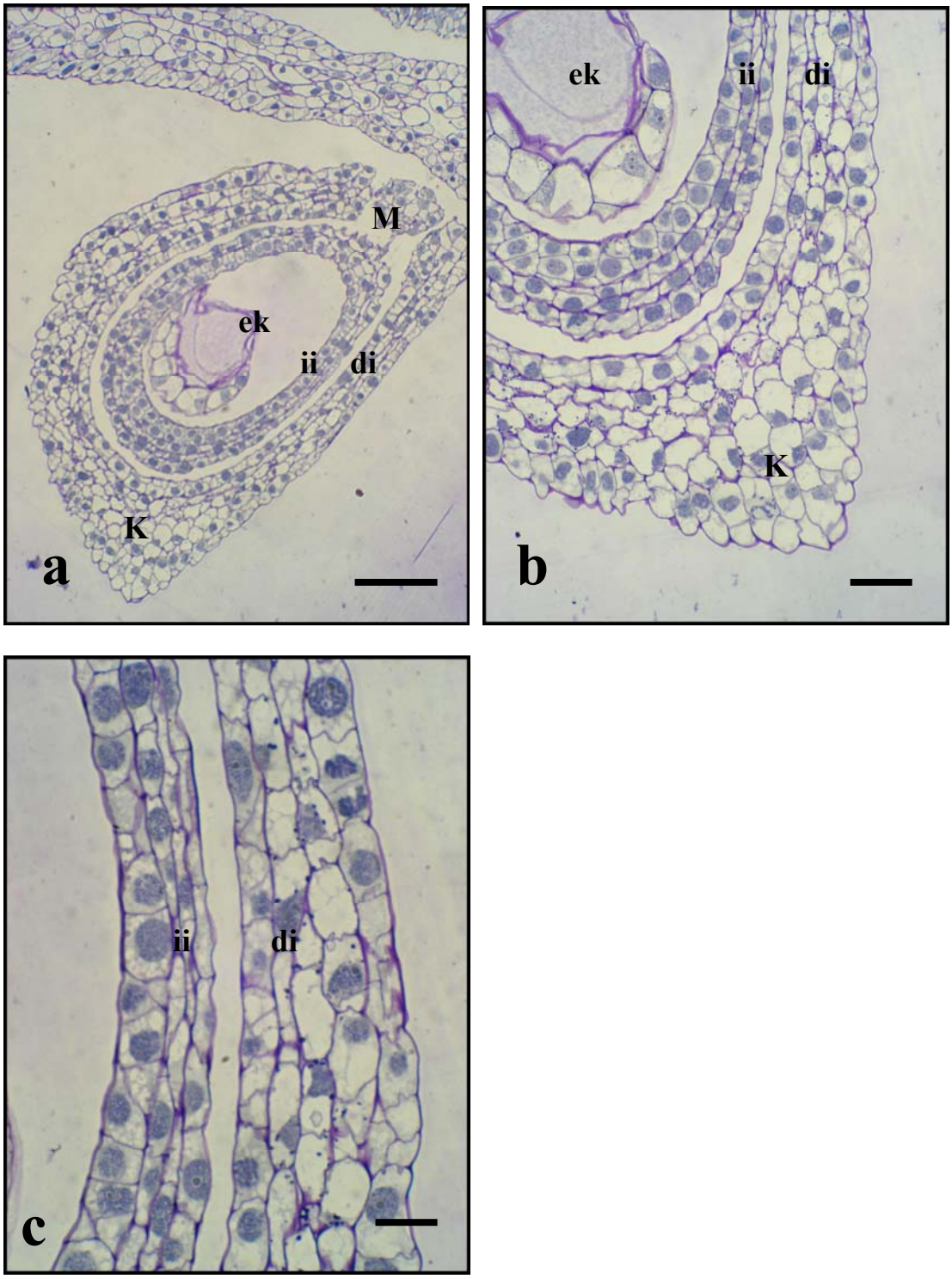
Şekil 4.85. Olgun embriyo kesesi evresinde merkezi hücre tarafında farklılaşan iç integüment hücreleri. Bar=10µm (ii, iç integüment; MH, merkezi hücre)



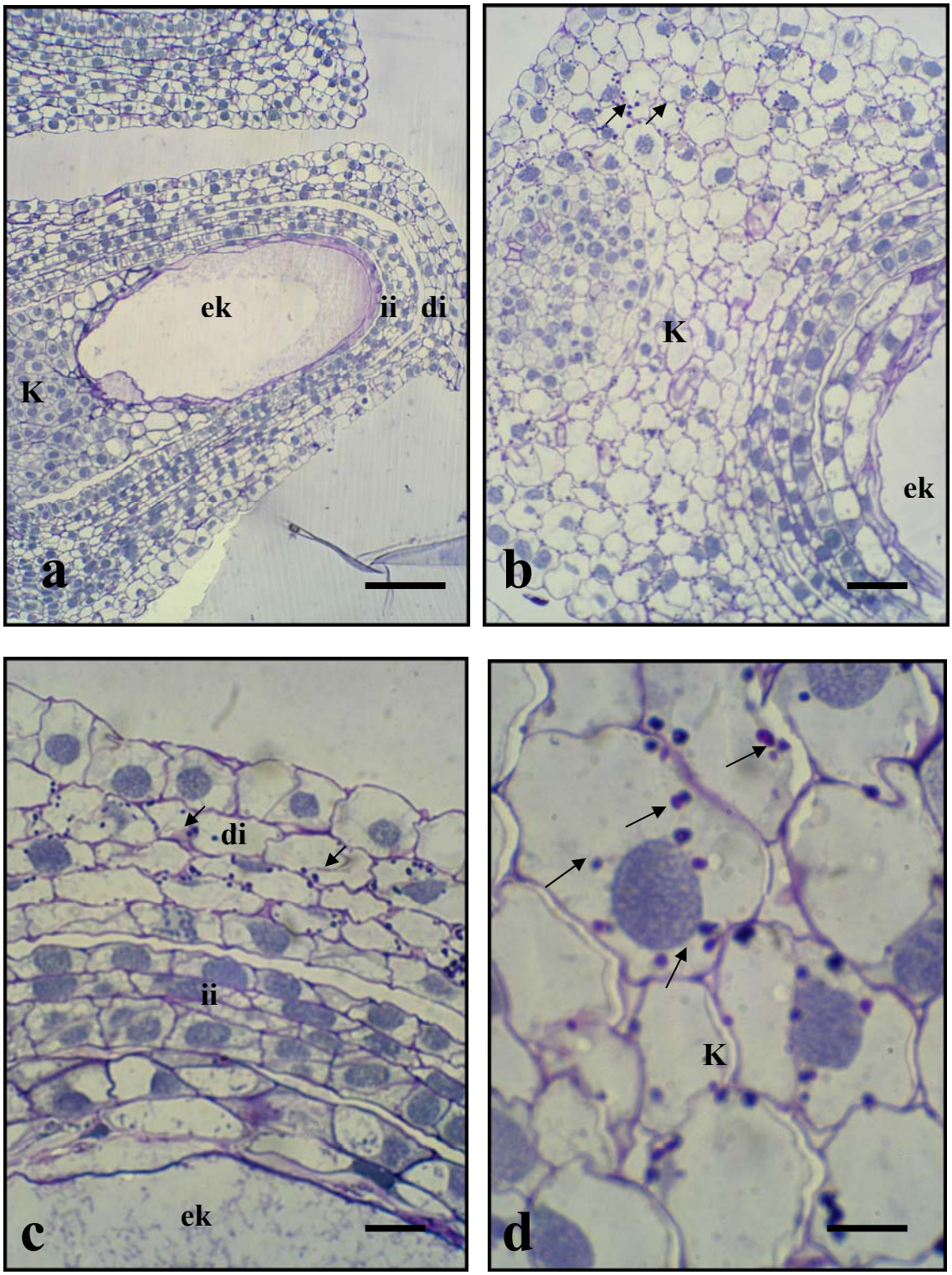
Şekil 4.86. Olgun embriyo kesesinde, kalaza tarafında farklılaşan iç integüment hücreleri. Bar=10µm (ii, iç integüment; K, kalaza)



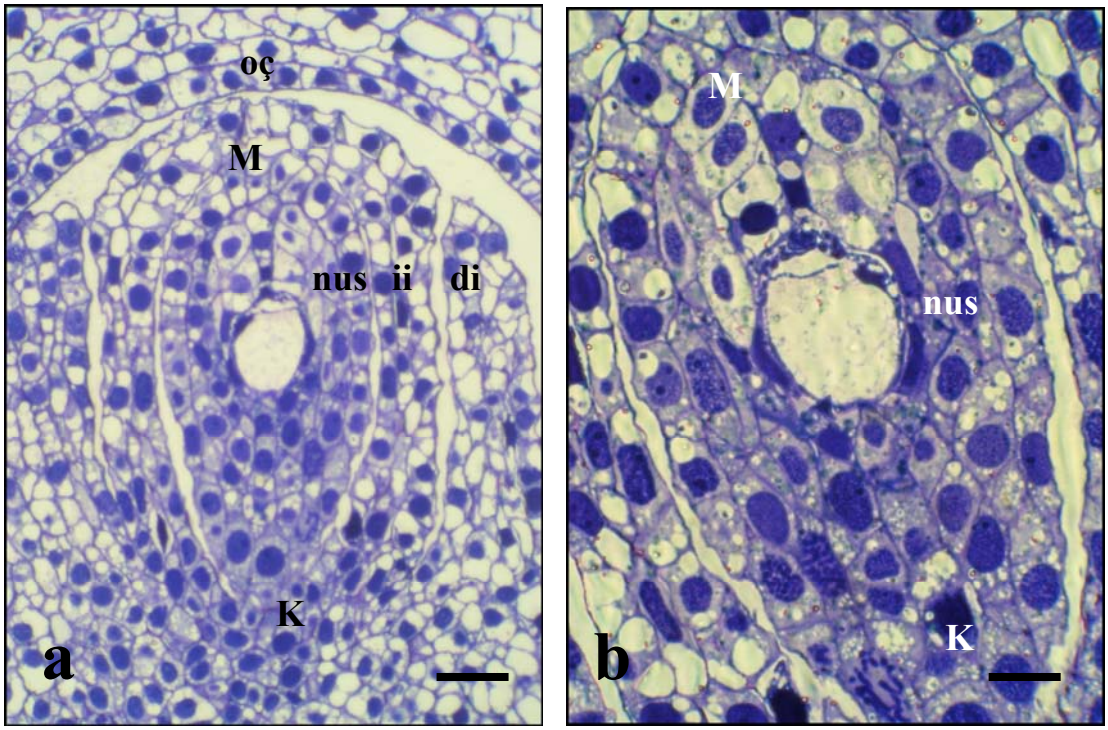
Şekil 4.87. *L. aestivum*'da megasporogenezin geç evresindeki megasporangiyumun polisakkarit içeriği a, genel görünüm, Bar=40µm; b,c, nusellus dokusu b, Bar=20µm; c, Bar=10µm; d, kalaza, Bar=10µm (ek, embriyo kesesi; ii, iç integüment; M, mikropil; nus, nusellus; K, kalaza)



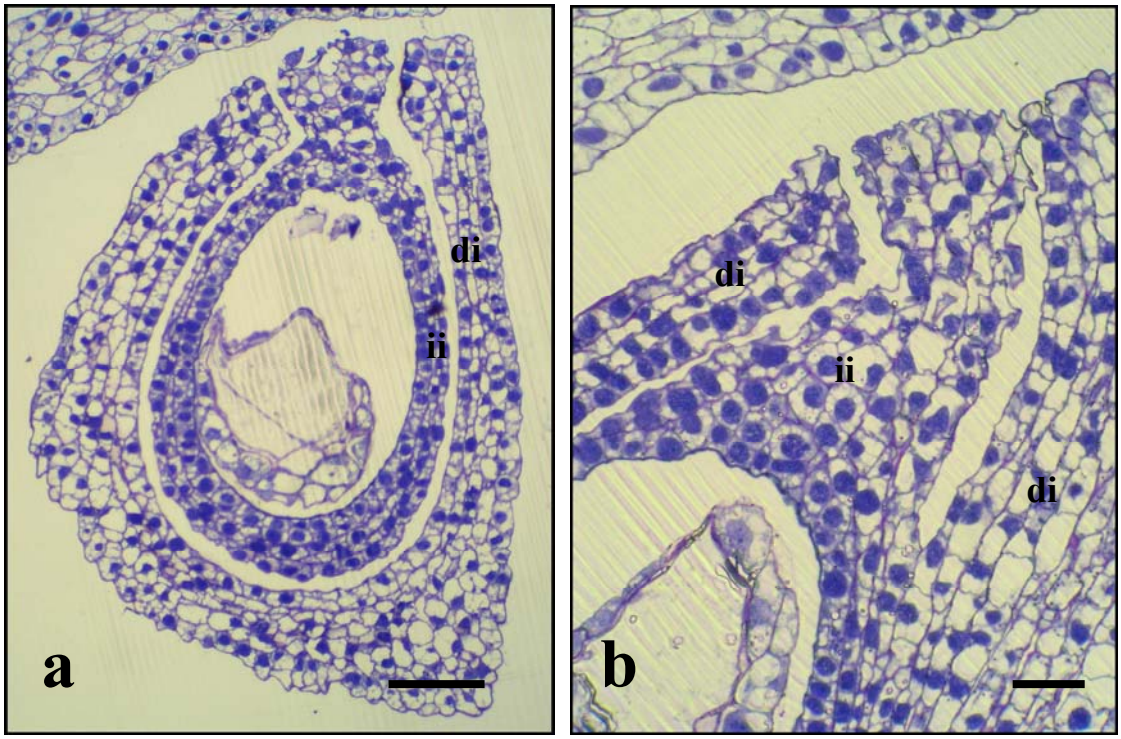
Şekil 4.88. *L. aestivum*'da megagametogenezin ileri evrelerindeki megasporangiyumun polisakkarit içeriği a, genel görünüm, Bar=100µm; b, kalaza, Bar=40µm; c, integümentler, Bar=20µm (di, dış integüment; ek, embriyo kesesi; ii, iç integüment; M, mikropil; K, kalaza)



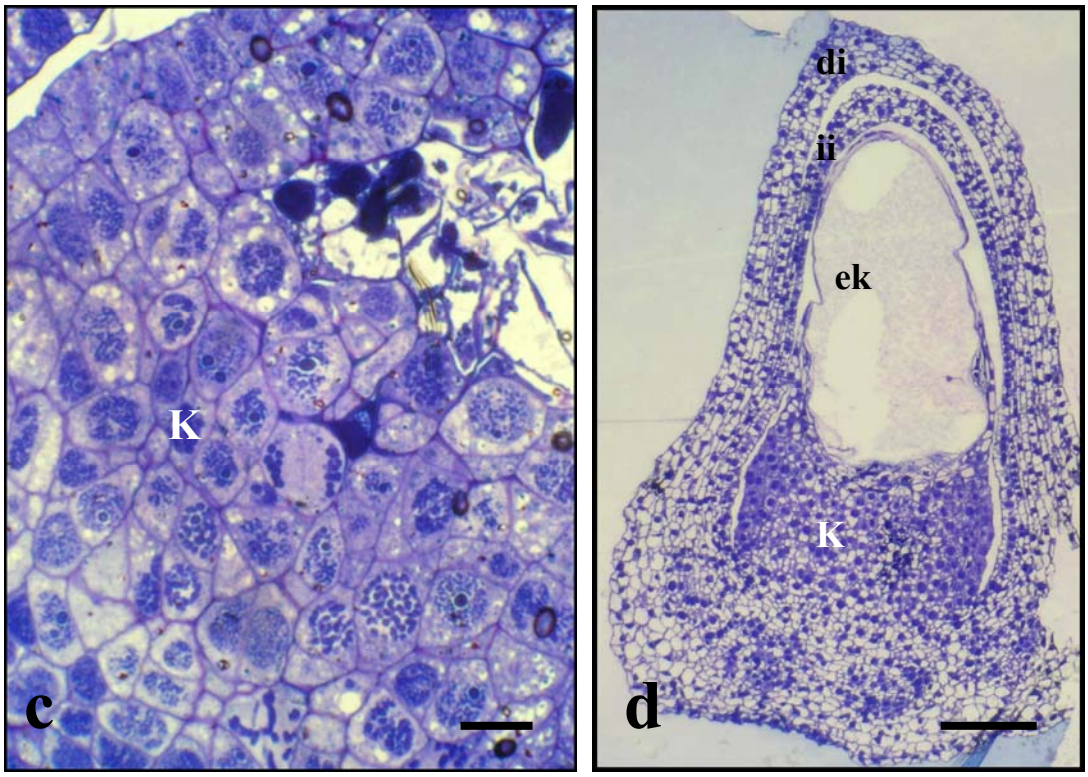
Şekil 4.89. *L. aestivum*'da olgun embriyo kesesi evresindeki megasporangiyumun polisakkarit içeriği a, genel görünüm, Bar=100µm; b,d, kalaza b, Bar=40µm; d, Bar=10µm; c, integümentler, Bar=20µm (di, dış integüment; ek, embriyo kesesi; ii, iç integüment; K, kalaza)



Şekil 4.90. *L. aestivum*'da megasporogenezin geç evresindeki megasporangiyumun RNA içeriği a, genel görünüm, Bar=40µm; b, nusellus dokusu, Bar=20µm (di, dış integüment; ii, iç integüment; M, mikropil; nus, nusellus; K, kalaza; oç, ovaryum çeperi)



Şekil 4.91. *L. aestivum*'da megagametogenez evresindeki megasporangiyumun RNA içeriği a, genel görünüm, Bar=100µm; b, mikropil bölgesi, Bar=40µm (di, dış integüment; ii, iç integüment)



Şekil 4.91. (devam) *L. aestivum*'da megagametogenezin ileri evrelerindeki megasporangiyumun RNA içeriği c, kalaza bölgesi, Bar=20µm; d, olgun embriyo kesesi evresindeki megasporangiyumun RNA içeriği; genel görünüm, Bar=150µm (di, dış integüment; ek, embriyo kesesi; ii, iç integüment; K, kalaza)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Edirne – Tavuk Ormanı'nda doğal olarak yetişen *Leucojum aestivum*'un karyolojik özellikleri, erkek ve dişi gametofitin oluşum evreleriyle, farklı gelişim evrelerindeki anter çeperinin ve sporogen dokunun ince yapısı ile bazı histokimyasal özellikleri incelendi.

Türkiye'de 8 ilde sınırlı alanlarda yayılış gösteren ve cinsin tek türü olan *L. aestivum*, subsp. *aestivum* ve subsp. *pulchellum* olmak üzere iki alt türe ayrılmıştır (Davis 1984, Crellin 2005). Trakya'da Edirne Tavuk Ormanı'nda tek populasyon olarak yayılış gösteren araştırma materyalimiz subsp. *pulchellum*'un özelliklerini göstermektedir.

L. aestivum ile karyolojik çalışmalar; La Cour (1931), Neves (1939), Kanisanlı (1974), Corriras vd. (1984), Dalgıç ve Başak (1996), Özhatay (2002) tarafından yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda *L. aestivum*'a ait kromozom sayısı La Cour (1931), Kanisanlı (1974), Corriras vd. (1984) tarafından 2n=24, Neves (1939), Dalgıç ve Başak (1996) tarafından 2n=22 ve Özhatay (2002) tarafından 2n=22, 24 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada *L. aestivum*'un kromozom sayısı Neves (1939), Dalgıç ve Başak (1996) ve Özhatay (2002)'ın bulgularında olduğu gibi 2n=22 olarak saptanmıştır. Dalgıç ve Başak'a (1996) göre *L. aestivum*'un ilk iki çift kromozomu metasentrik, onbirinci çift submetasenterik ve diğerleri ise akrosentriktir. Bizim bulgularımıza göre ise *L. aestivum*'un birinci kromozom çiftinin metasentrik, ikinci ve üçüncü çiftin submetasentrik, diğer sekiz kromozom çiftinin ise akrosentrik durumlu oldukları saptanmıştır.

L. aestivum ve Amaryllidaceae familyası ile yapılan embriyolojik çalışmalar oldukça kısıtlı olduğundan mikrosporogenez ve megasporogenez ile ilgili bulgularımız bu familyaya yakın taksonların özellikleriyle, histokimyasal ve ince yapı ile ilgili gözlem sonuçları ise uzak familyalara ait bitkilerin embriyolojik özellikleriyle tartışılmıştır.

L. aestivum'da andrekeum 6 stamenden oluşur. Anterler sarı renkli, bazifikstir. Filamentler beyaz renkli ve anterlerden daha kısadır. Bu özellikler türün daha önce saptanmış özellikleri ile uyumludur (Davis 1984, Kutbay vd. 1993). Anterler olgunlaştığında, Liliaceae üyelerinde (Davis, 1966) ve Amaryllidaceae üyelerinden *Crinum*'da (Watson ve Dallwitz, 2005) olduğu gibi mikrosporangiyumlar stomiyumlarından yarılarak açılırlar.

L. aestivum'da anterler diğer Amaryllidaceae üyelerinde olduğu gibi tetrasporangiattır (Davis, 1966). Genç anter çeperi, dıştan içe doğru diğer tabakalara göre daha büyük hücreli olan epidermis, tek sıralı hücrelerden oluşan endotesyum, 1-2 hücre sıralı ara tabaka ve yine 1-2 sıralı tapetumdan oluşmaktadır. Olgun anter çeperinin en dışında, yüzeyinde kutikula içeren epidermis hücreleri bulunur. Epidermis diğer Amaryllidaceae üyelerinde olduğu gibi gelişimin sonuna kadar parçalanmadan kalır (Davis, 1966). Olgun anterdeki kalıcı epidermis Araceae, Begoniaceae, Gramineae, Liliaceae, Magnoliaceae familyalarındaki taksonlarda da görülmüştür (Ünal, 2004).

L. aestivum'un olgun anter çeperinde epidermisin altında iyi gelişmiş bir endotesyum tabakası vardır. Endotesyum hücrelerinde, Poaceae familyasından *Puellia ciliata*'nın endotesyumunda olduğu gibi anastamos yapmış lifsi kalınlaşmalar görülür. (Manning ve Linder, 1990). Endotesyumdaki lifsi kalınlaşmalar Amaryllidaceae'den başka Liliaceae üyelerinden *Tulipa aitchisonii* L. (Koul ve Wafai, 1981), *Tulipa clusiana* (L.) DC. (Wafai ve Koul, 1982), *Gagea stipitata* Salisb.'da (Koul vd., 1976) ve Araceae (Davis, 1966) üyelerinde de görülmektedir. Hyacinthaceae familyasından olan *Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew'de ise endotesyumda at nalı şeklinde kalınlaşmaların olduğu saptanmıştır (Dane, 2006).

L. aestivum'un anter çeperinde ara tabaka Liliaceae familyasından *Gagea stipitata* (Koul vd., 1976), *Tulipa aitchisonii* (Koul ve Wafai, 1981) *Tulipa clusiana* (Wafai ve Koul, 1982) olduğu gibi 1-2 sıralıdır ve olgun anterde de görülür. Amaryllidaceae familyasında yer alan *Crinum defixicum*'da ise 4 sıralı olan ara tabaka olgun anterde fibrilsi kalınlaşmalar gösterir (Davis, 1966). Ara tabakanın Alliaceae familyasındaki *Allium textile* Nels. and Macbr.'de (Khaleel ve Mitchell, 1982) ise 2

sıralı ve Hyacinthaceae familyasından *Bellevalia edirnensis*'de (Dane, 2006) ise tek sıralı ve mikrosporlar gelişirken dejenere oldukları saptanmıştır.

L. aestivum'da tapetum, Amaryllidaceae familyasından *Crinum*'da olduğu gibi 1-2 sıralı ve salgı tipindedir (Davis, 1966). Fakat *Leucojum* cinsi ile yakın bağıntılı olan *Galanthus'*ta (Pankow, 1958) ise ameboid tip tapetum görülmüştür. Liliaceae familyasından *Tulipa aitchisonii* (Koul ve Wafai, 1981), *Tulipa clusiana* (Wafai ve Koul, 1982), *Gagea stipitata*'da (Koul vd., 1976) ve Hyacinthaceae familyasından *Bellevalia edirnensis*'de (Dane, 2006) ve Alliaceae familyasından *Allium textile'*de de (Khaleel ve Mitchell, 1982) tapetum salgı tipindedir. Araceae familyasında ise 2-4 sıralı olan ameboid tipte tapetum görülmüştür. *Tradescantia* L. (Liliaceae), *Alisma* L. (*Alismataceae*), *Butomus* L. (Butomaceae), *Typha* L.'da da (Typhaceae) tapetum ameboid tipindedir (Ünal,2004).

L. aestivum'un anter çeperinin tapetum hücrelerinde, normal mitoz bölünme, sekonder nukleus bölünmeleri ve nukleus birleşmeleri görüldü. Amaryllidaceae üyelerinde tapetumun bölünme tipleri konusunda bir bilgiye rastlamadık. *A. textile*'de (Alliaceae) tapetum hücreleri tek nukleusludur (Khaleel ve Mitchell, 1982). *L. aestivum*'da tapetum hücreleri genellikle Liliaceae familyasından *Tulipa clusiana*'da (Wafai ve Koul, 1982) ve Hyacinthaceae familyasından *Bellevalia edirnensis'*de (Dane, 2006) görüldüğü gibi 1-4 nukleusludur. Hücrelerin bazılarında nukleus birleşmeleri ile oluşan poliploid nukleuslar da görüldü.

Yapılan araştırmalara göre, anter tapetumunda görülen poliploidinin nedenleri; nuklear membranın kaybolmasından sonra profazda nukleusların birleşmesi (Smith, 1933), kromozom köprülerinin oluşması ve kalgın kromozomların iki nukleusu bağlaması (Cooper 1933, Witkus 1945) yada endomitozdur (Brown 1949, Greilhuber 1974, Turala 1958, Witkus 1945). Carniel (1962), oldukça sık görülen sekonder nukleus bölünmeleri sırasında iğ ipliklerinin birleşmesiyle poliploid nukleusların oluştuğunu ileri sürmüştür. *Nigella damascena* L.'da ise poliploid tapetum nukleusları endomitozla oluşan nukleusların birleşmesi sonucu oluşmaktadır (Bhandari vd., 1976). *L. aestivum'un* tapetum hücrelerinde normal mitoz ve sekonder nukleus bölünmelerinin

telofaz evresi sonunda bazı hücrelerin sitoplazmalarında kromozom parçacıkları görüldü. Bunlar, mitoz bölünme sırasında bazı kromozomların kırılması ile oluşan sentromersiz parçalar olabilir yada iğ ipliklerindeki düzensizlik sonucunda bazı kromozomların kutuplara çekilmemesinden kaynaklanabilir.

L. aestivum'da PAH'lerinde mikrosporogenez evrelerinin genellikle düzenli geçtiği görüldü. PAH'de mayoz sırasında sitokinez çoğu monokotilde (Furness ve Rudall, 1999) ve diğer Amaryllidaceae üyelerinde (Davis, 1966) olduğu gibi süksesif tiptedir. Birçok angiospermde olduğu gibi *L. aestivum*'un PAH'lerinde de leptoten evresinde oluşmaya başlayan kalloz çeper tetrad evresinde parçalanır. Rutaceae familyasından *Citrus limon*'da (Horner ve Lernsten, 1971) ise kalloz çeperin interfazda oluştuğu görülmüştür.

L. aestivum' da bir anter lokusunda PAH'nin mayoz bölünmesinin asinkronik olduğu görüldü. *Habenaria willd*'de (Orchidaceae) ise mikrosporogenez sinkronik ve sitokinez simulten tiptedir (Sharma ve Vij, 1987). *L. aestivum*'da bazı anterlerin tepe kısmındaki PAH'lerinin zigoten evresinde iken anterin taban kısmındakilerin pakiten evresinde oldukları gözlendi. İleri evrelerde anterin tepe ve taban kısmındaki evrelerin daha da farklı olduğu anterin tepe bölgesinde diakinez, orta bölgesinde diad, taban bölgesinde ise tetrad evresi görüldü. Aynı zamanda aynı tomurcuğun anterleri arasında da asinkronizasyon saptandı. Bir anterde tetrad evresi görülürken başka bir anterde mikrospor evresi görülebilmektedir. Bu özellik *Glicine max* (L.) Merr.'da (Fabaceae) (Albertsen ve Palmer, 1979) ve *Lilium longiflorum* L.'da da (Liliaceae) (Shull ve Menzel, 1977) saptanmıştır. *L. aestivum* ve diğer bitki türlerinin anterlerinin aynı lokusunda görülen asinkronizasyon besin materyallerinin tabandan tepe noktasına doğru dereceli olarak iletilmesinden kaynaklanabilir.

Coccina indica aut. Non. (L.) Cogn., *Momordica charantia* Linn. ve *Melothria maderaspatana* (L.) Cogn.'nın (Cucurbitaceae) (Desphande vd., 1986) anter lokusunda mayoz I'in genelde sinkronik geçtiği fakat mayoz II evresinde sinkronizasyonun bozulduğu görülmüştür. Bu durum mayoz I'de erken evrelerde sitoplazmik kanalların varlığıyla açıklanmıştır. *L. aestivum*'un anter çeperinin ince yapısında sporogen doku

hücreleri arasında görülmüştür. Daha sonra leptoten evresinde kalloz çeper oluşumuyla birlikte PAH arasındaki sitoplazmik kanallar kaybolmaktadır.

Çalışmamızda *L. aestivum*'da mikrosporogenez genellikle düzenli olduğu halde bazı düzensizlikler de görüldü. Bazı hücrelerde metafaz evresinde ekvator tablasında dizilmeyen kromozomlar, bazılarında anafaz I ve telofaz I'de kalgın kromozomlar ile bazı kromozomların köprü oluşturdukları ve tetrad ile mikrospor evrelerinde mikronukleuslar görüldü. Liliaceae familyasından *Tulipa clusiana* (Wafai ve Koul, 1982), *Gagea stipitata*'da (Koul vd., 1976), Hyacinthaceae familyasından *Bellevalia edirnensis*'de (Dane, 2006) ve Alliaceae familyasından *Allium textile*'de de (Khaleel ve Mitchell, 1982) anafaz II'de kalgın kromozomların mikronukleus oluşturdukları gözlenmiştir. Orkidelerin suni F_1 hibritlerinin (Silva Stort, 1984) tetradlarında ise 1-8 adet mikronukleus görülmüştür. Darlington ve Haldane (1932) ile Tören (1981) hem ilkel hem gelişmiş bitki gruplarında görülen mayotik düzensizliklerin genetik bozukluklar ve hibritleşmelerden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Çalışma materyalimizde görülen az sayıdaki mayotik düzensizlikler genetik dengesizlikten kaynaklandığı gibi çevresel faktörlerden de kaynaklanmış olabilir.

Mikronukleusların oluşmasında, iğ ipliklerinin oluşmaması yada düzensiz oluşması sonucunda kalgın kromozomların kutuplara ulaşamaması rol oynamaktadır. Bir başka durumda ise PAH'leri kromozom sayısı indirgenmeden mitotik olarak bölünürler, kromozomlar boyuna ayrılarak kutuplara doğru çekilirler ve kromozom sayısı indirgenmemiş diadlar oluştururlar. Çoğunlukla bu diadlar arasındaki kromozom dağılımı düzensizdir. Eşit kromozom sayısına sahip olmayan diadların nukleus boyutları da farklılık gösterir. Bazı kromozomların düzensiz eşleşmeleri onların kutuplara çekilmelerinde gecikmelere ve hücrenin ortasında kalmalarına neden olur. Bunların bazıları kaybolur ve sonuçta eşit büyüklükte nukleuslara sahip olmayan mikrosporlar oluşur. Bazıları ise kaybolmayarak mikronukleusları oluştururlar (Silva-Stort, 1984).

L. aestivum'da diğer Amaryllidaceae üyelerinde olduğu gibi isobilateral, dekusat tip tetradların (Davis, 1966) yanında nadiren linear ve T şeklindeki tetradlar da görüldü. *Aristolochia elegans* L. (Aristolochiaceae) ve *Sparganium erectum* L.'da

(Sparganiaceae) ise 5 farklı tipte tetrad görülmüştür (Ünal, 2004). Liliaceae familyasından *Tulipa clusiana* (Wafai ve Koul, 1982) ve *Gagea stipitata*'da (Koul vd., 1976) izobilateral ve tetrahedral tetradlar ile Hyacinthaceae familyasından *Bellevalia edirnensis*'de (Dane, 2006) ise izobilateral tetradlar görülmüştür.

L. aestivum'da polen mitozunda *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawler ex Sprengel (Dane, 1998) ve *Bellevalia edirnensis*'de (Dane, 1999b) olduğu gibi polarite gözlenmiştir. Polarizasyon sırasında nukleusun apertürün karşısındaki proksimal kutba göç ettiği ve distal kutupta ise büyük bir vakuol oluştuğu görülmüştür. Bu monokotillere özgü bir durumdur. Orchidaceae familyasından *Cypripedium fasciculatum*'da (Brown ve Lemmon, 1994) polen mitozu diğer monokotillerlerde olduğu gibi nukleus proksimal kutba göç ettiği halde diğer *Phalenopsis*'de (Brown ve Lemmon, 1992) ise nukleusun distal kutba göç ettiği saptanmıştır. Polen mitozu sırasında polarizasyonun oluşmasında nukleus göçü (Brown ve Lemmon 1994, Ekici ve Dane 2004) ile birlikte vakuolizasyon da (Ekici ve Dane, 2004) rol oynamaktadır. Tören (1981) ve Ünal'a (2004) göre polen mitozu sırasında nukleusun göç ettiği yer generatif hücrenin yerini tayin etmektedir. *L. aestivum*'un polen mitozundaki gözlemlerimiz bu görüşü desteklemiştir.

Diğer Amaryllidaceae üyelerinde olduğu (Davis, 1966) gibi çalışma materyalimizde de olgun polen taneleri anterden atılırken 2 hücrelidir. Generatif hücre nukleusu uzun ve mercek şeklinde, vegetatif hücre nukleus ise loplu görünüştedir. Olgun polen taneleri *Sternbergia lutea*'da (Amaryllidaceae) (Dane, 1998), *Bellevalia edirnensis* (Hyacinthaceae) (Dane, 1999b), *Tulipa clusiana* (Wafai ve Koul, 1982) ve *Gagea stipitata*'da (Koul vd., 1976) 2 hücreli, *Allium textile*'de (Alliaceae) (Khaleel ve Mitchell, 1982) ise 3 hücreli, Araceae familyasında ise bazı türlerde 2 hücreli, bazılarında ise 3 hücreli (Davis, 1966) iken anterden atılmaktadır.

L. aestivum'un olgun polen taneleri *Galanthus ikariae* Baker ve *G. rizehensis* Stern'de (Şahin, 1997) olduğu gibi monokolpattır. *L. aestivum*'un ve *G. rizehensis*'in polenleri prolat, *G. ikariae*'nin polenleri ise subprolattır.

Sporogen hücrelerde görülen mayotik düzensizlikler sporların canlılığını kaybetmelerine neden olmaktadır. Bu sporlar hızla büyüyememekte ve normalde tapetumdan sağlayabilecekleri besin materyallerini absorblayamamaktadırlar. Sonuç olarak steril polen taneleri oluşmaktadır. Fertil bitkilerde de çok küçük oranlarda polen kayıpları görülmektedir. Bu oran ortalama %15'tir ve %2 ile %20 arasında değişebilmektedir (Zenkteller, 1962). *L. aestivum*'da ise bu oran %1.77 olarak saptanmıştır. Horner'e (1977) göre polen sterilitesinin nedenlerinden biri de tapetum hücrelerindeki işlev bozukluğu nedeniyle besin maddelerinin ara tabakadan mikrosporlara aktarılmamasıdır. Kallozu parçalayan kallaz enziminin kaynağının tapetum olduğu ve tapetumun anormal gelişiminin mikrosporların tetradtan salınmasında problemlere neden olabileceği düşünülmektedir (Horner, 1977). Çalışma materyalimizde tapetum normal gelişim göstermiştir. Polen sterilitesinin nedeni mayotik düzensizliklerdir.

L. aestivum'un olgun polen tanelerinin *in vitro* temel çimlenme ortamında çimlendiği görüldü. Olgun polen tanelerinin çimlenme oranı %73 olarak saptandı. Polen tüpünün oluşumu sırasında tüp nukleusunun davranışlarında bazı farklılıklar gözlendi. İki hücreli polen tanelerinde tanenin içini dolduran sitoplazma vegetatif hücreye aittir ve polen tüpü oluştuktan sonra tüp içindeki sitoplazmayı oluşturur. Bu yüzden vegetatif hücreye tüp hücresi ve nukleusuna da tüp nukleusu denir (Ünal, 2004). Tüp oluşurken genellikle ilk olarak vegetatif nukleus polen tanesinden ayrılmaktadır. Bu hipotez birçok angiospermde gözlendiği halde *Triticum aestivum* L.'un (Chandra ve Bhatnagar, 1974) ve *Vicia* türlerinin (Dane ve Meriç, 1999) bazı polen tüplerinde vegetatif nukleus önce ilerlerken, bazı tüplerde ise generatif nukleusun önce ilerlediği görülmüştür. Bazı polen tüpü oluşumlarında ise her iki hücre nukleusunun tüp içinde ilerlemeyip, polen içinde kaldığı gözlenmiştir. Polen tüpü hücrelerinde gözlenen nukleus davranışlarındaki farklılıklar *L. aestivum* bitkisinde de saptanmıştır.

L. aestivum'un *in vitro* polen çimlenmesi sırasında *Vicia galileae* Plitm. & Zoh.'da (Fabaceae) (Dane ve Meriç, 1999) olduğu gibi normal tüplerin yanı sıra bazı anormal tüpler de görüldü. Bazı polen tüplerinin zayıf geliştiği, bazılarında ise tüp

ucunda şişkinlik oluştuğu gözlendi. Bu durum bazı mikrosporların nukleuslarında görülen anormalliklerden kaynaklanmaktadır (Ünal, 2004).

L. aestivum'da *in vitro* ortamda çimlenmiş polen tüplerinde kalloz tıpa oluşumu görülmediği halde *in vivo* ortamdaki polen tüplerinde ise kalloz tıpa oluşumu gözlendi. *Paeonia tenuifolia* L.'nın *in vitro* ortamda çimlenmiş polen tüplerinde ise kalloz tıpa oluşumu gözlenmiştir (Dane ve Olgun, 1994). Ayrıca çalışma materyalimizde *Prunus avium* L.'da (Ciampolini vd., 1982) olduğu gibi *in vivo* ortamdaki polen tüplerinin boyunun *in vitro* ortamdakilere göre daha uzun olduğu görüldü. *In vivo* polen tüplerinin daha uzun olması stigma, stilüs ve ovaryumdan salgılanan besin ve kemotropik maddelerden ileri gelmektedir (Tilton ve Horner 1980, Tilton vd. 1984). *In vivo* ortamdaki polen tüpü büyümesi iki fazdan oluşmaktadır. Birinci faz tamamen polen ve polen tüpünün içeriğine bağlıdır. İkinci faz ise stilus ve ovaryuma bağımlı fazdır. *İn vitro* ortamda bu ikinci faz gerçekleşmemektedir. *Nicotiana alata* L. ve *Petunia hybrida* Hort. ile yapılan çalışmada polen tüplerinin büyüdüğü stilusler ovaryumdan ayrılmıştır. Bunlarda polen tüplerinin stilusun sonuna kadar ulaşamadığı ve stilusun 1/3 ile 2/3 uzunluğunda tüp büyümesinin durduğu görülmüştür. Ovaryumdan ayrılmayan stilüslerde ise polen tüplerinin ovaryumun içine kadar uzadıkları gözlenmiştir. Fakat mekanizma henüz açıklanamamıştır (Bergamini-Mulcahy ve Mulcahy, 1985).

Bu çalışmada *L. aestivum* anterinin bütün gelişim evrelerinde anter çeperi hücrelerinin polisakkarit ve RNA içeriği araştırıldı. Anter çeperinin erken gelişim evresinde sitoplazmada PAS(+) reaksiyon görülmedi. *Carica papaya*'nın (Sheel ve Bhandari, 1990), *Zea mays*'ın (Panchaksharappa ve Rudraminuyappa, 1974) ve *Triticale*'nin (Bhandari ve Khosla; 1982) anter çeperlerinin erken gelişim evresinde çeper tabakalarında çok sayıda nişasta granülü görülmüştür. Çalışma materyalimizde ise *Calatropis procera*'da (Vijayaraghavan ve Cheema, 1978) olduğu gibi anter çeperinin erken gelişim evresinde hücre çeperleri dışında PAS(+) reaksiyon görülmemiştir. Bunun nedeni Vijayaraghavan ve Cheema'ya göre (1978) sporogen doku hücrelerinin farklılaşması, PAH'nin kalloz sentezi, mayoz bölünme ve kallozun parçalanması için enerjiye ihtiyaç olmasıdır. Suda çözünmeyen polisakkaritlerin parçalanması ile RNA ve

protein sentezinde kullanılmak üzere ATP oluşur. Ayrıca protein olmayan bileşikler, protein sentezi için kaynak olarak kullanılabilir.

L. aestivum'un olgun anter çeperleri polen mitozu evresinde polisakkarit içeriği yönünden erken evrelere göre daha zengindir. Bu farklılık özellikle epidermis hücrelerinde dikkati çekmektedir. Endotesyum hücrelerindeki fibröz kalınlaşmaların oluşması daha geç evrelerde başlar. Bu durum epidermis hücrelerindeki polisakkaritlerin endotesyum kalınlaşmalarının farklılaşmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca *L. aestivum*'un epidermis hücrelerinde de kutikula oluşumu görülmüştür. Cheng vd.'ne göre (1979) depo nişastası epidermal ve spinöz kutikula oluşumunda kullanılmaktadır. *Carica papaya*'da (Sheel ve Bhandari, 1990), *Zea mays*'da (Panchaksharappa ve Rudraminuyappa, 1974) ve *Triticale*'de (Bhandari ve Khosla, 1982) de benzer durumlar görülmüştür.

Taylor (1959) *Lilium*'un PAH'lerine C^{14}-işaretli glisin vererek yaptığı gözlemlerde aktif protein sentezinin preleptoten ile leptotende ve az miktarda geç profazda, mayoz II ve tetrad evresinde olduğunu göstermiştir. Çalışma materyalimiz olan *L. aestivum*'da anterin erken gelişim evresinde sporogen doku hücreleri RNA içeriği bakımından oldukça zengindir. Fakat PAH'leri çevresinde kalloz çeper oluşumundan önce RNA miktarında azalma, kalloz çeper sentezi tamamlandıktan sonra ise artış görülmektedir. Mayozun başlangıcında mayositlerdeki RNA miktarındaki artış *Calatropis procera*'da (Vijayaraghavan ve Cheema, 1978), *Lilium longiflorum*'da (Taylor, 1959) *Zea mays*'da (Moss ve Heslop-Harrison, 1967), *Taxus baccata*'da (Pennell ve Bell, 1987) ve *Nigella*'da da (Bhandari vd., 1976) görülmüştür.

L. aestivum'da mikrosporogenezin tetrad evresinde tetrad ve tapetum hücreleri RNA içeriği bakımından zengindir. Buruşuk mikrospor evresinde ise hem mikrosporların hem de tapetum hücrelerinin RNA içeriğinin azaldığı görüldü. Profaz ve tetrad evrelerinde *Nigella damascena*'da (Bhandari vd., 1976) ve *Lilium*'da (Taylor, 1959) tapetumun RNA bakımında zengin olduğu gösterilmiştir. Tetrad evresinden sonra ise RNA birikimi görülmemiştir.

L. aestivum'da tek nukleuslu mikrospor ve olgun polen evrelerinde mikrosporların ve bozulmaya başlayan tapetum hücrelerinin RNA içeriği bakımından zengin oldukları ve ayrıca bu evrede anter çeperinin epidermis dışındaki endotesyum ve ara tabaka hücrelerinde de yer yer RNA miktarında artış görülmüştür.

L. aestivum'da, erken mikrosporogenez, tetrad, tek nukleuslu mikrospor ve olgun polen evrelerinde anter çeperinin ve mikrosporların ince yapısı incelendi.

L. aestivum'da mikrosporogenez öncesinde sporogen doku hücrelerinde nukleusun hücrenin bir tarafında yer aldığı ve organellerin dağılımında polarite görüldü. Hücre organellerinin daha çok nukleus çevresinde toplandığı, diğer tarafta ise polizomların daha yoğun olduğu gözlendi. *Solanum nigrum*'da (Bhandari ve Sharma, 1987) ise sporogen doku hücrelerinde polar bir dağılım görülmemiştir. Nukleus çevresinde az sayıda plastid ve mitokondri, GER ve birkaç diktiyozom ile farklı büyüklükte birkaç vakuol yeralır. GER'in ve diktiyozomların az geliştiği, vakuollerin genellikle çepere yakın olduğu, plastidlerin bölündüğü ve mitokondrilerin kristalarının da çok fazla gelişmediği görüldü. *Solanum nigrum*'da (Bhandari ve Sharma, 1987) sporogen hücreler az sayıda farklılaşmamış plastid ve mitokondri ile kısa, düz endoplazmik retikulum içermektedirler. Benzer evrede *Helleborus foeditus*'ta (Echlin ve Godwin, 1968) ise hiç plastid görülmemiştir.

L. aestivum'da mayoz bölünmenin erken profaz I evresinde de *Stangeria eriopus*'ta (Rodkiewicz vd., 1988) olduğu gibi büyük bir vakuolden dolayı PAH'lerinde hücre organelleri polar dağılım gösterir. Hücre organelleri nukleus ve hücre çeperi arasında yeralır. Çok sayıda mitokondri ile az sayıda plastid ve az gelişmiş GER görülür. Plastid ve mitokondriler nukleusun bir tarafında toplanmışlardır. *Lavatera* L. ve *Malva* L.'da (Kudlicka ve Rodkiewicz, 1990) ise erken profaz I evresinde organellerin dağılımında polar bir durum gözlenmemiştir. Geç profaz evresinde mitokondri ve plastidler, çok sayıdaki vesiküller ile birlikte perinuklear bölgede toplanırlar. Organellerin yoğun bir tabaka oluşturarak nukleusu çevreledikleri görülmüştür. *Lavatera* ve *Malva*'da (Kudlicka ve Rodkiewicz, 1990), *Ginkgo biloba* L.'da (Wolniak, 1976) ve *Solanum nigrum* L.'da (Bhandari ve Sharma, 1988) telofaz I'de organellerin

iki nukleus arasında ekvator bölgesinde toplandığı görülmüştür. Organellerin bu şekilde organizasyonunun, hücre içeriğinin yavru hücrelere eşit bir şekilde dağılımına neden olduğu ve sitokinezin simultane olarak gerçekleştiği, mayoz I' den sonra hücre plağı oluşmayan mayositlerde mayoz II iğ ipliklerinin birleşmesini engellediği düşünülmüştür (Kudlicka ve Rodkiewicz, 1990).

L. aestivum'da profaz I evresinde nukleus zarının çok sayıda por içerdiği ve çevresinde polizomların yoğun olduğu ve nukleolus içeren nukleusların eukromatince zengin olduğu görüldü. Bu durum PAH'lerinin oldukça aktif olduğunu RNA ve protein sentezinin yapıldığını göstermektedir. Ayrıca PAH'leri arasında sitoplazmik kanallar erken profaz I evresinde görüldü.

Sitoplazmik kanallar, salgı tapetumuna sahip bütün türlerin mayositlerinde yaygın olarak görülmüştür (Heslop-Harrison 1966, Pacini ve Cresti 1978, Pacini vd. 1986). Fakat ameboid tapetuma sahip türlerde bu özellikten bahsedilmemiştir. Angiospermlerde sitoplazmik kanallar her zaman aynı evrede gözlenmeyebilir. Örneğin *Lycopersicum peruvianum* (Pacini ve Cresti, 1978), *Olea europea* L. (Pacini vd., 1985) ve *Prunus avium'da* (Pacini vd., 1986) mayoz I ve mayoz II arasında, *Helloborus*'ta (Echlin ve Godwin, 1968) ise mayoz I'in başında sitoplazmik kanallar gözlenmiştir. Gimnospermlerde ise sitoplazmik kanallar sadece tapetum hücreleri arasında saptanmıştır. Mayositler arasında sitoplazmik kanal görülmemiştir (Dickinson ve Bell, 1966). Bizim yaptığımız bu çalışmada *L. aestivum*'da sitoplazmik kanallar *Helloborus*'ta (Echlin ve Godwin, 1968) olduğu gibi mayoz I'in erken evrelerinde görüldü.

Sitoplazmik kanallar, eğrelti otları ve angiospermlerde mayoz bölünme evresinde görüldüğü halde gimnospermlerden *Ceratozamia mexicana*'nın (Audran, 1979) PAH'de mayoz sırasında sitoplazmik kanallara rastlanmamıştır. Heslop- Harrison (1966) ve Audran'a (1979) göre bu kanallar mikrosporangiyum içerisinde hücreler arasında madde alışverişinde rol oynamakta ve anter lokusunda görülen sinkronisazyondan sorumlu olmaktadırlar.

L. aestivum'da mayoz sonunda, tetradı oluşturan mikrosporlarda hücre çeperinde ekzin oluşumu başlar ve hücre çeperi buruşuk bir görünümdedir. Bu evrede mikrosporlar büyük bir nukleus içerirler. Tetradtan ayrıldıktan sonra anter lokusundaki sıvıyı alarak şişen mikrosporların tapetuma yöneldikleri dikkati çekti. Benzer durum Poaceae familyasından *Sorghum bicolor*'da (Christensen vd., 1972), *Oryza sativa*'da (Dane ve Meriç, 2005) ve Gramineae familyasından *Triticale* cv Tri-1'de de (Bhandari ve Khosla, 1982) görülmüştür.

Citrus limon'da (Horner ve Lernsten, 1971) mikrosporlar tetrad evresindeyken tapetumda aktif sekresyon yapıldığı ve tapetum duvarlarında dejenerasyonun başladığı görülmüştür. Bu evrede diktiyozom ve ER miktarında artış görülmektedir. *Zea mays*'ın (Moss ve Heslop-Harrison, 1967) tapetum hücrelerinde ribozom miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Bu özellikler *L. aestivum*'da da saptanmıştır. *Ceratozamia mexicana*'da (Audran, 1979) tapetum hücrelerinde plazmalemma ile hücre duvarı arasında proorbiküllerin bulunduğu görülmüştür.

Citrus limon'da (Horner ve Lernsten, 1971) mikrosporlar vakuollü evrede iken tapetum hücrelerinde dejenerasyon görülmüştür. Tapetum içeriğinin anter lokusuna geçmesiyle mikrosporların hacimlerinde gözle görülür bir artış olmuştur. Vakuoller kaybolmuş ve vakuollerin yerini nişasta ve lipid granülleri almıştır.

L. aestivum'da tek nukleuslu mikrospor evresinde nukleus çevresinde vesikül oluşumu görüldü. Vakuolizasyon, hücresel uzamada rol oynamaktadır. (Willemse, 1981). Bu evrede tapetum hücrelerinden salgı granüllerinin mikrospor ile tapetum hücresi arasındaki alana salındığı görüldü. Mikrospor hücresindeki mitokondrilerin mikrosporun tapetuma bakan yüzünde daha çok toplandıkları gözlendi. Bu durum tapetumdan salgılanan maddelerin mikrospor tarafından aktif taşıma ile alındığını göstermektedir. Benzer şekilde *Crinum*'da da (Davis, 1966) tapetum hücrelerinde Ubish granüllerinin meydana geldiği görülmüştür.

Lilium longiflorum ile yapılan bir çalışmada genç anterlerde myoinositol-2-^{3}H'ün metabolize olmasıyla meydana gelen bileşiklerin dağılımı otoradyografi

yöntemiyle incelenmiştir. Mikrosporlarda karyoplazmada, lipid damlaları ile intin tabakasında, anter çeperi hücrelerinde, karyoplazmada ve nişasta tanelerinde, anter lokusunda lipid damlalarında ve orbiküllerde işaretli maddeler bulunmuştur. Bu çalışma mikrosporogenezde tapetumun etkin rol oynadığını net bir şekilde ortaya koymuştur. Tapetum tarafından salgılanan maddeler mikrosporlar tarafından sitoplazmik kanallar vasıtasıyla içeri alınmaktadır. Daha sonra ise dejenere olan tapetum hücrelerinden türevlenen diğer materyaller doğrudan mikrosporun dış yüzeyine yapışmaktadır. Böylece *Lilium*'da (Miki-Hirosige ve Nakamura, 1982) mikrospor çeperinin hem içeriden hem de dışarıdan yapıldığı anlaşılmıştır.

Polen oluşumu tamamlanırken polen tanelerinde, generatif hücre nukleusu mercek şeklinde, vegetatif hücre nukleusu ise lobludur. Generatif hücre nukleusu heterokromatin bakımından zengin, vegetatif hücre nukleusu ise eukromatince zengin ve sitoplazmasında çok sayıda nişasta tanesi vardır. Polen çevresinde çok sayıda lipid damlaları ve ubish granülleri görüldü ve dejenerasyonu artan tapetum hücreleriyle polen taneleri arasında madde alışverişi bu evrede de devam etmektedir. Bu gözlemler daha önceki yapılmış çalışma sonuçlarıyla benzerdir (Horner 1977, Bhandari ve Khosla 1982). Tapetum hücreleri dejenere olurken diğer anter çeperi hücreleri en faal dönemlerindedir. Hücreler organel içeriği bakımından daha zengindir. Nukleus, mitokondri, lipid granülleri ve nişasta taneleri içermektedirler. Bu özellikler anter çeperinin geç evrelerde de aktif olduğunu göstermektedir. Anter çeperi hücrelerinin bu evredeki ince yapısı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

Bu çalışmada incelenen *L. aestivum*' un ovulleri birçok Amaryllidaceae (Davis, 1966) taksonlarında olduğu gibi anatrop, bitegmik ve krassinusellat tiptedir. *Allium textile*'de (Khaleel ve Mitchell, 1982) ve *Galanthus nivalis'*te (Chudzik ve Sniezko, 2003) ovuller, anatrop, bitegmic ve teninusellar tiptedir, *Sternbergia lutea*'da (Dane, 1999a) ise hemianatrop, bitegmik ve pseudokrassinusellattır. Themidaceae'de (Berg, 2003) de ovuller anatrop ve krassinusellattır. *Zephyranthes* Herbert'te (Davis, 1966), *Allium textile*'de (Khaleel ve Mitchell, 1982) *Sternbergia lutea*'da (Dane, 1999a) ve Themidaceae'de (Berg, 2003) görüldüğü gibi *L. aestivum'*da da mikropil iç integümentten oluşmaktadır.

Hymenocallis occidentalis'te (Amaryllidaceae) integümentler yoğun klorofil ve stoma içermektedir ve fotosentez yapma yeteneğindedirler. Klorofil varlığı *Amaryllis belladona* L. (Amaryllidaceae), *Gladiolus* L. (Iridaceae) ve *Lilium martagon* L.'da da (Liliaceae) gösterilmiştir (Bouman 1974, Ünal 2004). Çalışma materyalimizde ise böyle bir özellik görülmedi.

L. aestivum'da *S. lutea*'da (Dane, 1999a) olduğu gibi arkespor hücresi doğrudan megaspor ana hücresini verir. Megaspor ana hücresinin süksesif tipte mayoz bölünmesi ile oluşan diadın mikropil tarafındaki dejenere olur ve kalaza tarafındaki diad hücresi ard arda mitoz bölünmeler geçirerek *Allium textile*'de (Khaleel ve Mitchell, 1982) olduğu gibi 8 nukleuslu *Allium* tip embriyo kesesini oluşturur. Amaryllidaceae üyelerinin çoğunda *Allium* tip embriyo kesesi gözlenmekle birlikte *Allium mutabile, Crinum* spp., *Nothoscordum fragrans, N. Striatum*, *Pancratium maritimum* L. (Davis, 1966) ve *Galanthus nivalis* L.' te (Chudzik ve Sniezko, 2003) *Polygonum* tip embriyo kesesi de görülmüştür. *S. lutea*' da (Dane, 1999a) ise embriyo kesesinin *Endymion* tip olduğu gözlenmiştir.

L. aestivum'un sinergid hücrelerinde *S. lutea*'nın (Dane, 1999a) ve *Galanthus nivalis'*in (Chudzik ve Sniezko, 2003) sinergidlerinde olduğu gibi filiform aparatus görülmüştür.

L. aestivum'da yumurta hücresinin nukleusu hücrenin kalaza tarafındadır ve mikropil tarafında büyük bir vakuol bulunur. Embriyo kesesinin mikropil tarafında bulunan polar nukleus *Fumaria* L.'da (Saksena 1954, Sehgal ve Tiwari 1977) ve *S. lutea*'da (Dane, 1999a) olduğu gibi kalaza tarafına göç ederek antipodlara yakın bulunan diğer polar nukleus ile fertilizasyondan önce birleşerek sekonder nukleusu oluşturmaktadır. Antipod hücrelerinin *Fumaria*'da (Saksena 1954, Sehgal ve Tiwari 1977) olduğu gibi koyu boyandığı gözlenmiştir. Amaryllidaceae familyasından *Notoscordum*'da antipod hücrelerinin sekonder bölünmeler geçirdiği görülmüştür (Davis, 1966). Aynı familyada yer alan *Zephyranthes*'te ise antipod hücrelerinin endospermanın ilk nuklear bölünmelerinin başlamasında etkili olduğu düşünülmektedir (Malik ve Vermani, 1975).

Allium ve *Zephyranthes'*te (Davis, 1966) olduğu gibi *L. aestivum*'da da hipostaz bulunmaktadır. *Gasteria verrucosa*'daki (Willemse, 1981) gibi fincan şeklindedir ve nusellus hücrelerinin farklılaşması ile oluşmuştur. *Paeonia tenuifolia* L.'da (Dane ve Olgun, 1998) ise hipostase disk şeklindedir. Bazı bitkilerde hipostase hücrelerinin çeperleri kütin, süberin, lignin gibi maddelerden dolayı kalınlaştığı halde bazı bitkilerde ince çeperli kalır ve salgı hücresi yapısındadırlar (Johri vd. 1992, Ünal 2004). *L. aestivum*'da da hipostase hücreleri ince çeperli ve bol sitoplazmalıdır. Ünal (2004) embriyo kesesi altındaki nusellus hücrelerinden gelişen hipostasenin embriyo büyümesinin engellenmesinde, iletim demetlerinden embriyo kesesine besin iletiminde ve bazı taksonlarda ise olgun tohumlarda su dengesinin korunmasında rol oynadığını bildirmiştir. *Allium* ve *Zephyranthes'*te (Davis, 1966) funikulusun kıvrılmasıyla oluşan obturator *L. aestivum*'da görülmemiştir.

Çalışma materyalimizde, megasporogenez evresindeki megasporangiyumda, kalazanın ve nusellus dokusu hücrelerinin, megagametogenez evresinde ve olgun embriyo kesesi evresinde ise dış integüment ile kalaza hücrelerinin az miktarda polisakkarit içerdiği görüldü. *Paspalum orbiculare* L. ve *P. longiflorum* L. (Chao, 1977) ile yapılan çalışmalarda ise nusellus ve iç integüment, iç ve dış integüment ile dış integüment ve ovaryum duvarı arasındaki boşluklarda ve mikropilde suda çözünmeyen polisakkaritlerin varlığı PAS (+) reaksiyon ile görülmüştür. *Stellaria media* (L.) Vill.'da (Pritchard, 1964) sinergidler ve nusellus hücrelerinde polisakkaritler saptanmıştır. *Galanthus nivalis*'te (Chudzik ve Sniezko, 2003) çiçeklenme evresinde ovullerin somatik hücrelerinde ve embriyo kesesinde PAS ile boyama sonucunda polisakkaritlere rastlanmamıştır. Fertil ovullerde ise iç integümentin mikropilar kısmında pektinlerin ve polisakkaritlerin varlığı saptanmıştır.

L. aestivum'da megasporogenez evresinde nusellus dokusu, megagametogenez evresinde iç integüment ve kalaza hücreleri, olgun embriyo kesesi evresinde ise kalaza hücreleri RNA içeriği bakımından diğer hücrelere göre daha zengindir. *Stellaria media*'da (Pritchard, 1964) arkespor hücresinde RNA miktarı yüksek, megaspor ana hücresinde azalmakta, megasporda ve 2, 4 ve 8 nukleuslu kese oluşurken tekrar RNA miktarı artmaktadır. RNA miktarının yumurta hücresinde yüksek, sinergid ve

antipodlarda ise düşük olduğu bildirilmiştir. *Fumaria*'da (Sehgal ve Tiwari, 1977) endosperm oluşumunun erken evrelerinde antipod hücrelerinde RNA konsantrasyonu artmıştır. Sehgal ve Tiwari (1977) antipod hücrelerinin endosperm gelişiminde aktif rol oynadığını ve endospermde nişasta oluşumu sırasında antipod hücrelerinin besin sağladığını açıklamışlardır. Çalışma materyalimizde de *Fumaria*' da (Sehgal ve Tiwari, 1977) olduğu gibi olgun embriyo kesesindeki antipod hücreleri RNA bakımından oldukça zengindir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile yayılış alanları tehdit altında bulunduğu için koruma altına alınan *L. aestivum*'un bazı sitolojik ve embriyolojik özellikleri ilk defa açıklanmaya çalışıldı. Dişi gametofitin gelişimi normal iken erkek gametofitin gelişimi sırasında bazı düzensizlikler saptanmıştır. Bu düzensizlikler bitkinin fertilitesini etkileyecek düzeyde değildir. *Leucojum* ile kardeş cins olan *Galanthus*'un anter tapetumu, nusellus ve embriyo kesesi tipleri farklılık göstermektedir. Sınıflandırma yapılırken bu çalışmada saptanan özellikler göz önüne alınmalıdır.

Genç anter çeperinde polisakkaritler görülmemiş, olgun anter çeperinde ise görülmüştür. Erken gelişim evrelerinde görülmemesi suda çözünmeyen polisakkaritlerin metabolik olaylarda kullanıldığını düşündürmektedir. Geç evrelerde gözükmesi ise polisakkaritlerin epidermis tabakasının kutikula oluşumunda ve endotesyum hücrelerinin çeper farklılaşmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Anter çeperinin ince yapısı histolojik gözlem sonuçlarını doğrular niteliktedir. Ayrıca sporogen doku hücrelerinin, MAH'lerinin ve polen mitozuna hazırlanan mikrosporların ince yapısında organellerin dağılımında, dişi gametofitin sinergid ve yumurta hücreleri ile aktif megasporda polarite saptanmıştır. Bu sonuçlar erkek ve dişi gametofitin gelişimi sırasında polaritenin varlığı ile ilgili görüşlere katkı sağlamıştır (Ekici ve Dane, 2004).

Ovullerin bütün gelişim evrelerinde ise RNA ve polisakkarit içeriği ile ilgili gözlem sonuçları, erken evrelerde embriyo kesesinin gelişimine daha çok nusellus hücrelerinin, geç evrelerde ise kalaza tarafındaki nusellus dokusundan oluşan hipostasenin ve integümentlerin katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler, son yıllarda revizyonu yapılan Amaryllidaceae familyasının (Meerow vd., 1999) taksonomisinde kullanılan embriyolojik özelliklere katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Albertsen, M.C., Palmer, R.G., 1979, A comperative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male sterile (MS1) and male fertile soybeans. *(Glycine max (L.) Merr.)*. American Journal of Botany, 66(3): 253-265.

Alexander, M.P., 1969, Differential staining of aborted and non-aborted pollen. Stain Tech., 44: 117-122.

Audran, J.C., 1979, Microspores, pollen grains and tapetum ontogeny in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceae): an ultrastructural study. Phytomorphology, 29(3-4): 350-362.

Bajon, C., Horlow, C., Motamayor, J.C., Sauvanet, A., Robert D., 1999, Megasporogenesis in *Arabidopsis thaliana* L.: an ultrastructural study. Sexual Plant Reproduction, 12(2) : 99-109.

Bannikova, V.P., Plyushcs, T.A., Gvilava, M.N., 1987, Ultrastructure of different types of embryo sacs. Phytomorphology, 37(4) : 291-298.

Berg, R.Y., 2003, Development of ovule, embryo sac and endosperm in *Triteleia* (Themidaceae) relative to taxonomy. American Journal of Botany, 90 (6): 937-948.

Bergamini-Mulcahy, G., Mulcahy, D.L., 1985, Ovarian influence on pollen tube growth, as indicated by the *semivivo* technique. American Journal of Botany, 72(7): 1078-1080.

Bhandari, N.N., Kishori, R., Natesh, S., 1976, Ontogeny, cytology and histochemistry of anther tapetum in relation to pollen development in *Nigella damascena*. Phytomorphology, 26(1): 46-59.

Bhandari, N.N., Khosla, R., 1982, Development and histochemistry of anther in *Triticale* cv Tri-1. I. Some new aspects in early ontogeny. Phytomorphology, 32(1): 18-27.

Bhandari, N.N., Sharma, M., 1987, Histochemical and ultrastructural studies during anther development in *Solanum nigrum* Linn. I. early ontogeny. Phytomorphology, 37(2,3): 249-260.

Bhandari, N.N., Sharma, M., 1988, Histochemical and ultrastructural studies during anther development in *Solanum nigrum* Linn. II. Distribution of organelles in the meiocytes during microsporogenesis. Phytomorphology, 38(1): 1-8.

Bouman, F., 1974, Developmental studies of the ovule, integüments and seed in some angiosperms. Thesis Univ. Amsterdam.

Brown, S.W., 1949, Endomitosis in the tapetum of tomato. American Journal of Botany, 36:703-716.

Brown, R.C., Lemmon, B.E., 1992, Pollen development in Orchids 4. Cytoskeleton and Ultrastructure of the unequal pollen mitosis in *Phalaenopsis*. Protoplasma, 167: 183-192.

Brown, R.C., Lemmon, B.E., 1994, Pollen mitosis in the slipper orchid *Cypripedium fasciculatum*. Sexual Plant Reproduction, 7: 87-94.

Canberk, Y., 1997, Uygulamalı Elektron Mikroskopi Teknikleri Kursu. 11-13 Haziran, İstanbul, 3-22.

Carniel, K., 1962, Die Entwickwlung des Anterentapetums der cyperaceen und Endomitosis an Kernen mit diffus-centromerischen Chromosomen. Öst. Bot. Z. 109: 168-173.

Cass, D.D., 1972, Occurence and development of a filiform apparatus in the egg of *Plumbago capensis*. American Journal of Botany, 59: 279-283.

Cass, D.D., Karas I., 1974, Ultrastuctural organization of the egg of *Plumbago zeylanica*. Protoplasma, 81: 49-62.

Chao, C.Y., 1977, Further cytological studies of a periodic acid-Schiff's substance in the ovules of *Paspalum orbiculare* and *P. Longifolium*. American Journal of Botany, 64(8): 921-930.

Cheng, P.G., Greyson, R.L., Welden, D.B., 1979, Comparison of anter development in genic male sterile (MS 10) ve male fertile corn (Zea mays) from light microscopy and scanning electron microscopy. Can. J. Bot., 57: 578-596.

Chandra, S., Bhatnagar, P., 1974, Reproductive Biology of *Triticum.* II. Pollen germination, pollen tube growth and its entry into the ovule. Phytomorphology, 24(3&4): 211-217.

Christensen, J., Horner, H., Lernsten, N., 1972, Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor* (Gramineae). American Journal of Botany, 59(1): 43-58.

Christman, S., 2003, http://www.floridata.com/ref/l/leuc_aes.cfm

Chudzik, B. ve Sniezko, R. 2003, Calcium ion presence as a trait of receptivity in tenuinucellar ovules of *Galanthus nivalis* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45/1: 133-141.

Ciampolini, F., Cresti, H., Kapil R.N., 1982, Germination of cherry pollen grains *in vitro* – An ultrastructural study. Phytomorphology, 32(4) : 364-373.

Cooper, D.C., 1933, Nuclear divisions in the tapetal cells of certain angiosperms. American Journal of Botany, 20. 358-364.

Corriras, D.S., 1984, Numeri chromosomıcı. 16 (2-3): 219-241.

Crellin J., 2005, www.amaryllidaceae.org/Leucojum.

Çakıcı, I., Uluğ, H.Y., İnci, S., Tunçtan, B., Abacıoğlu, N., Kanzik, I., Şener, B., 1997, Antinociceptive effect of some Amaryllidaceae plants in mice. J. Pharmacol., Aug; 48(8): 828-830.

Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T., Yeo, P.F., 1985, The families of monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, New York.

Dal-Bianco, P., Maly, J., Wöber, C., Lind, C., Koch, G., Hufgard, J., Marschall, I., Mraz, M. and Deecke, L., 1991, J. Natural Transm. 33 (Suppl.), 59.

Dalgıç, G., Başak, N., 1996, Chromosome numbers of some petaloid monocots from European Turkey in Öztürk, M., Seçmen, Ö., Görk, G., Plant Life In Southwest and Central Asia. Ege University Press, İzmir-Türkiye, 54-62.

Dane, F., 1998, Mitotic divisions in root tip cells and pollen grains of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel (Amaryllidaceae). M.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 14: 1-10.

Dane, F., 1999a, *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel (Amaryllidaceae) üzerinde sitoembriyolojik inceleme. Tr. J. of Biology, 23: 9-22.

Dane, F., 1999b, Hekzaploid (2n=24) *Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew'in polen mitozu ve polen morfolojisinin incelenmesi. Tr. J. of Biology, 23: 357-368.

Dane, F., 2006, Cytological and Embryological Studies of Bellevalia edirnensis Özhatay & Mathew (Hyacinthaceae). Acta Botanica Hungarica, 57: 3 Baskıda.

Dane, F., Meriç, Ç., 1999, *Vicia* L.'nin üreme biyolojisi II. *V. galileae* Plitm. & Zoh.'de anter çeperi, mikrosporogenez, polen mitozu ve erkek gametofitin gelişiminin sitolojik ve sitoembriyolojik yönden incelenmesi. Tr. J. of Biology, 23: 269-281.

Dane, F., Meriç, Ç., 2005, Cytological and embryological studies of anther in rice (*Oryza sativa*) ´Rocca´. Acta Botanica Hungarica, 47(3-4): 257-272.

Dane, F., Olgun, G., 1994, *Paeonia tenuifolia* L. 'de Polen Çimlenmesinin *in Vitro* Olarak İncelenmesi, Kongre Kitabı (XI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz), Edirne. 12-19.

Dane, F., Olgun, G., 1998, *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae)'da tohum taslağının yapı ve fonksiyonunun ışık ve elektron mikroskopu ile incelenmesi. M.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 14: 11-38.

Darlington, C.D., Haldane, J.B.S., 1932, Recent advances in cytology. London.

Darlington, C.D., Amal, E.K.J., 1945, Chromosome Atlas of Cultivated Plants. London. 305-307.

Davis, L.G., 1966, Systematic Embryology the Angiosperms. London. 40-41.

Davis, P.H., 1984, Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, 8: 364-365.

Deshpande, P.K., Bhuskute, S.M., Makde, K.H., 1986, Microsporogenesis and male gametophyte in some *Cucurbitaceae*. Phytomorphology, 36(1,2): 145-150.

Diboll, A.G., Larson, D.A., 1966, An electron microscopic study of the mature megagametophyte in *Zea mays*. American Journal of Botany, 53(4): 391-402.

Dickinson, H.G., Bell, P.R., 1966, The changes in the tapetum of *Pinus banksiana* accompanying the formation and maturation of pollen. Ann. Bot. 40: 1101-1109.

Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y., Zenk M.H., 1998, Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. Phytochemistry, 49(4): 1037-1047.

Echlin, P., Godwin, H., 1968, The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helloborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and Ubish bodies. J. Cell Sci. 3: 161-179.

Ekici, N., Dane, F., 2004, Polarity during sporogenesis and gametogenesis in plants. Biologia, Bratislava 59(6): 687-696.

Franke, W.W., Seib, E., Herth, W., Osborn, M., Weber, K., 1977, Reaction of the anastral mitotic apparatus of endosperm cells of the plant *Leucojum aestivum* with antibodies to tubulin from porcine brain as revealed by immunofluorescence microscopy. Cell biol Int Rep. Jan, 1(1): 75-83.

Furness, C.A., Rudall, P.J., 1999, Microsporogenesis in monocotyledons. Annals of Botany, 84: 475-499.

Gabe, M., 1968, Détection histochimique des glucides. Techniques histologiques. Paris; Mason et Cie, 409-411.

Garcia, M.T.A., Galati, B.G., Anton, A.M., 2003, Development and ultrastructure of megagametophyte in *Passiflora caerulea* L. (*Passifloraceae*). Botanical Journal of the Linnean Society, 142: 73-81.

Gray, P., 1964, Handbook of basic microtechnique, third edition, London.

Greilhuber, J., 1974, Uncommon karyological features in the anther tapetum of some Pedicularie (Scrophulariaceae). Caryologia, 27: 169-182.

Gussev, C., Berkov, S., Pandova, B., Bosseva, Y., Bogdanova, Y., Yanev, S., Burrus, M., Stanilova, M., 2003, Galanthamine content in Bulgarian *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae) populations. Third International Balkan Botanical Congress, Plant resources in the creation of new values, Sarajevo, Bosna, Hercegovina. 287.

Heinrich M., 2004, Snowdrops: the heralds of spring and a modern drug for Alzheimer's disease. The Pharmaceutical Journal 273: 905-906

Herr, J.M.JR., 1971, A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. American Journal of Botany, 58(8): 785-790.

Heslop-Harrison, J., 1966, Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes. Ann. Bot. 30: 221-240.

Horner, Jr.H.T., 1977, A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). American Journal of Botany, 64(6): 745-759

Horner, Jr.H.T., Lernsten, N.R., 1971, Microsporogenesis in *Citrus limon* (Rutaceae). American Journal of Botany, 58(1): 72-79.

Huang, B.Q., Russel, S.D., Strout, G.W., Mao, L.J., 1990, Organization of isolated embryo sacs and eggs of *Plumbago zeylanica* (*Plumbaginaceae*) before and after fertilization. American Journal of Botany, 77(11): 1401-1410.

Huang, B.Q., Sheridan, W.F., 1994, Female gametophyte development in Maize: Microtubular organization and embryo sac polarity. Plant Cell. Jun; 6(6): 845-861.

İnce, H., 1989, Bitki preperasyon teknikleri. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 127, 73-76.

Irwin, R.L., Smith, H.J., 1960, Biochem, Pharmacol., 3: 147.

Ito, M., Kawamoto, A., Yukawa, T., Kurita, S., 2005, Phylogeny of Amaryllidaceae based on matK sequence data. http//www.science.uts.adu.au/sasb/monocotsIIAb2.html.

Jalouzot, M.F., 1979, Electron microscope study of twin embryo sacs derived from one *Oenothera* tetrad. Phytomorphology, 29(3,4): 267-272.

Jensen, W.A., 1962, Botanical Histochemistry. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Jensen, W.A., Schulz, P., Ashton, M.E., 1977, An ultrastructural study of early endosperm development and synergid changes in unfertilized cotton ovules. Planta, 133: 179-189.

Johansen, D. A., 1940, Plant Microtechnique. Mc Graw-Hill Book Company, New York & London.

Johri, B.M., Ambegaokar, K.B., Srivastava, P.S., 1992, Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.

Kanisanlı, M., 1974, Chromosome numbers of some monocotyledons. Ege Üniv. Fen Fak. İlmi Rap. Ser. 176 (Biol.118): 1-12.

Kapil, R.N., Bhatnagar, A.K., 1981, Ultrastructure and biology of female gamethophyte in flowering plants. International Review of Cytology, 70:291-339.

Khaleel, T.F., Mitchell, B.B., 1982, Cytoembryology of *Allium textile* Nels. and Macbr. American Journal of Botany, 69(6): 950-956.

Koul, A.K., Wafai, B.A., 1981, Analysis of Breeding Systems in the Genus *Tulipa*. I. sporogenesis, gametogenesis and Embryogeny in diploid *T. aitchisonii*. Phytomorphology, 31 (1,2): 11-17.

Koul, A.K., Wafai, B.A., Wakhlu, A.K., 1976, Studies on the genus *Gagea*. III. Sporogenesis. Early embryogeny and endosperm development in hexaploid *Gagea stipitata*. Phytomorphology, 26(3): 255-263

Kudlicka, K., Rodkiewicz, B., 1990, Organelle coatings of meiotic nuclei during microsporogenesis in *Malvaceae.* Phytomorphology, 40(1-2): 33-41.

Kutbay, H.G. ve Kılınç M., 1993, *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae) üzerinde otoekolojik bir çalışma. Doğa-Tr. J. of Botany, 17: 1-4.

Kutbay, H.G., Kılınç, M., Karaer, F., 1993, *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae)'nin morfolojisi ve anatomisi üzerinde bir araştırma. Doğa-Tr. J. of Botany, 17: 215-219.

Kutbay, H.G., Karaer, F., Kılınç M., 1994, Göl soğanı (*Leucojum aestivum* L.)'nın soğanlarındaki alkoloid miktarı ve populasyon yoğunluğu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Dergisi, 5(1): 182-187.

La Cour, L., 1931, J.R. Micr. Soc. 51: 49.

Malik, C.P., Vermani, S., 1975, Physiology of sexual reproduction. I. A histochemical study of embryo sac development in *Zephyranthes rosea* and *Lagenaria vulgaris*. Acta Histochem. 53: 244-280.

Manning, J.C., Linder, H.P., 1990, Cladistic analysis of patterns of endothecial thickennings in the Poales/Restionales. American Journal of Botany, 77(2): 196-210.

Mclean, R.C., Cook, W.R.I., 1941. Plant Science Formulae. Macmillan and Co., Limited, London.

Meerow, A., 2005, Extant seed plants www.mobot.org/mobot/research/APweb /orders/asparagalesweb.htm.

Meerow, A.W., Fay, M.F., Guy, C.L., Li, Q., Zaman, F.Q., Chase, M.W., 1999, Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbc*L and* trn*L-F* sequence data. American Journal Of Botany 86(9): 1325–1345.

Miki-Hirosige, H., Nakamura, S., 1982, Incorporation of label from myoinositol-2-^{3}H by young anther of *Lilium longiflorum*. Phytomorphology, 32(1): 85-94.

Milloning, G., 1962, Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. In Breese SS (ed): Fifth International Congress In Electron Microscopy, New York; Academic Press, 2: 8.

Moss, G.I., Heslop-Harrison, J., 1967, A Cytochemical study of DNA, RNA and protein in the developing maize anther. II. Observations. Ann. Bot. 31: 555-572.

Naranjo, A.C., Poggio, L., 1986, A new template for direct morphological classification of chromosomes. Darwiniana, 27(1-4): 39-41.

Neves, B., 1939, Bol. Soc. Brot., Coimbra, 13, 547.

Olgun, G., 1981, *Penstemon gentianoides* Poir. (Scrophulariaceae) megagametofitinin döllenmeden önceki ince yapısı. Doçentlik Tezi, İst. Üniv. Fen Fak. Botanik ve Genetik Kürsüsü, İstanbul.

Olgun, G., Dane, F., 1993, *Paeonia tenuifolia* L.'nin erken embriyogeni evresindeki integument hücrelerinin ultrasütrüktürü. Kongre Kitabı (XI. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 6-10 Eylül), 142-143, Edirne.

Olgun, G., Dane, F., 1994, Ultrastructural studies of hypodermal cells of seed coat *Paeonia tenuifolia* L., Electron Microscopy 1994 (ICEM 13, 17-22 July), Vol 3B : 1033-1034, Paris.

Ozban, N., Özmutlu, Ö., 1991, Mikropreperasyon Yöntemleri. İstanbul Üniv. Fen Fakültesi Yayınları, No: 221. İ. Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.

Özhatay, N., 2002, Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers, Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 4, 547–555.

Pacini, E., Bellani, L.M., ve Lozzi R., 1986, Pollen, tapetum and anther development in two cultivars of sweet cherry (*Prunus avium*). Phytomorphology; 36 (3-4) : 197-210.

Pacini, E., Cresti, M., 1978, Ultrastructural characteristics of the tapetum and microspore mother cells in Lycopersicum peruvianum during meiotic prophase. Bull. Soc. Bot. Fr., Actualites botaniques; 1-2: 121-128.

Pacini, E., Franchi, G.G., Bellani, L.M., 1985, Pollen grain development in the olive (*Olea europaea* L.) ultrastructure and anomalies. In sexual reproduction in seed plants, Ferns and Mosses 25-27 campilers M.T.M. Willemse and J.L. Van Went (Wageningen: Pudoc).

Panchaksharappa, M.G., Rudramuniyappa, C.K., 1974, Localization of nucleic acids and insoluble polisaccharides in the anther of *Zea mays* L. A histochemical study. Cytologia 39: 153-160.

Pankow, H., 1958, Über den pollenkitt bei *Galanthus nivalis*. Flora 146: 240-253.

Pennell, R.I., Bell, P.R., 1987, Intracellular RNA during meiosis in microsporangia of *Taxus baccata*. American Journal of Botany, 74(3): 444-450.

Polunin, O., 1987, Flowers of Greece and the Balkans a field guide. Oxford University Press, New York, 501.

Pritchard, H.N., 1964, A cytochemical study of embryo sac development in *Stellaria media*. American Journal of Botany, 51(4): 371-378.

Riley, H.P., 1948, Genetics and Cytogenetics. New York, 408.

Rodkiewicz, B., Bednara, J., Kuras, M., Mostowska, A., 1988, Organells and cell walls of microsporocytes in a cycad *Stangeria* during meiosis I. Phytomorphology, 38(2,3): 99-110.

Saksena, H.B., 1954, Floral morphology and embryology of *Fumaria parviflora* Lamk. Phytomorphology, 4: 409-417.

Scribailo, R.W., Barret S.C.H., 1991, Pollen-pistil interactions in tristylous *Pontederia sagittata* (*Pontederiaceae*). II. Patterns of pollen tube growth. Amer. J. Bot. 78(12): 1662-1682.

Sehgal, A., Tiwari, S.C., 1977, Antipodals in *Fumaria*- A histochemical study. Phytomorphology, 27(4): 347-350.

Sharma, M., Vij, S.P., 1987, Embryological studies in Orchidaceae VI: *Habenaria willd*. Phytomorphology, 37(4): 327-335.

Sheel, K., Bhandari, N.N., 1990, Ontogenic and histochemical studies on the anther development of *Carica papaya* L. Phytomorphology, 40(1-2): 85-94.

Shen, Z.W., Fisinger, U., Poulev, A., Eisenreich, W., Werner, I., Pleiner, E., Bacher, A., Zenk, M.H., 2001, Tracer studies with 13C-labeled carbohydrates in cultured plant cells. Retrobiosynthetic analysis of chelidonic acid biosynthesis. Phytochemistry, 57(1): 33-42.

Shull, J.K., Menzel, M.Y., 1977, A study of reliability of synchrony ın the development of pollen mother cells of *Lilium longiflorum* at the first meiotic prophase. American Journal of Botany, 64(6): 670-679.

Schulz, S.P., Jensen, W.A., 1968, *Capsella* embryogenesis: The egg, zygote, and young embryo. American Journal of Botany, 55(7): 807-819.

Schulz, S.P., Jensen, W.A., 1969, *Capsella* embryogenesis: The Suspensor and the Basal Cell. Protoplasma, 67: 139-163.

Silva-Stort, M.N., 1984, Sterility barriers of some artificial F1 Orchid hybrids. I. Microsporogenesis and pollen germination. American Journal of Botany, 71(3): 309-318.

Smith, T.H., 1933, Nuclear divisions in the tapetal cells *Galtonia candicans*. American Journal of Botany, 20: 341-347.

Şahin, N.F., 1997, An investigation on pollen morphology of *Galanthus ikariae* Baker and *Galanthus rizehensis* Stern (Amaryllidaceae). Tr. J. of Botany, 21: 305-307.

Şener, B., 1994, Recent results in the search for bioactive compounds from Turkish medicinal plants. Pure & Appl. Chem., 66(10/11): 2295-2298.

Şener, B., Orhan I., Satayavivad J., 2003, Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. Phytother. Res. Dec. 17(10): 1220-1223.

Taylor, J.H., 1959, Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in *Lilium longiflorum*. American Journal of Botany, 46: 477-484.

Tilton, V.R., Horner, H.T., 1980, Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. American Journal of Botany 67(7): 1113-1131.

Tilton, V.R., Wilcox, L.W., Palmer, R.G., Albertsen, M.C., 1984, Stigma, style and obturator of soybean, Glycine max (L.) Merr (Leguminosae) and their function in the reproductive process. American Journal of Botany, 71(5): 676-686.

Tören, J., 1981, Bitki Embriyolojisi. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.

Turala, K., 1958, Endomitosis in the tapetal cells of *Cucurbita pepo* L. Acta Biol. Cracov. 1: 25-34.

Ünal, M., 1982, *Petunia hybrida* bitkisi üzerinde döllenme engellerinin sito-embriyolojik yönden incelenmesi. Doçentlik Tezi. 72. İstanbul Üniv. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.

Ünal, M., 1983, Correletion between pollen stainability and pollen viability. Doğa Seri A, 7(3): 572-574.

Ünal, M., 2004, Bitki (Angiosperm) Embriyolojisi. İstanbul, 137.

Van Went, J.L., 1970, The ultrastructure of fertilized embryo sac of *Petunia*. Acta Bot. Neerl. 19(4): 468-480.

Vijayaraghavan, M.R., Cheema, K., 1978, Cytochemistry of microspore mother cells in *Calotropis procera*. Phytomorphology, 28(2): 137-141.

Wafai, B.A., Koul, A.K., 1982, Analysis of Breeding Systems in *Tulipa*. II. sporogenesis, gametogenesis and Embryogeny in tetraploid *T. clusiana*. Phytomorphology, 32: (4): 289-301.

Watson, L., Dallwitz, M.J., 2005, The Families of Flowering Plants. http://delta-intkey.com/angio/www/amaryllidaceae.htm.

Willemse, M.T.M., 1981, Polarity during megasporogenesis and megagametogenesis. Phytomorphology, 31: 124–134.

Witkus, E.R., 1945, Endomitotic tapetal cell divisions in *Spinacia*. American Journal of Botany, 32: 326-330.

Wolniak, S.M., 1976, Organelle distribution and apportionment during meiosis in the microsporocyte of *Ginkgo biloba* L. American Journal of Botany, 63(2): 251-258.

Yakar-Tan, N., 1982, Bitki Mikroskopisi Kılavuz Kitabı, I. ve II. Bölüm. İst. Üniv. Yayınları No: 2947 İstanbul, 51.

Zenkteler, M., 1962, Microsporogenesis and tapetal development in normal and male-sterile carrots (*Daucus carota*). American Journal of Botany, 49(4): 341-348.

07. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Nuran EKİCİ
Doğum yeri, tarihi: Edirne, 1974
Medeni hali: Bekâr
e-mail: nuranekici@yahoo.com

EĞİTİM

Şükrü Paşa İlkokulu / EDİRNE
Edirne Anadolu Lisesi / EDİRNE
Lisans
Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü / EDİRNE (Temmuz - 1997)
Yüksek Lisans
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. / EDİRNE (Kasım - 2000)
Doktora
Trakya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hücre Biyolojisi A.B.D. (2002-2006)

EĞİTİM ve AKADEMİK ÇALIŞMALAR

-Araştırma Görevlisi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. (Temmuz 1998- Ekim 2000) Immunogenetik

-Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.
(Şubat - Nisan 1998, Temmuz - Eylül 1998) Sitogenetik Analiz, FISH (Floresans In Situ Hibridizasyon)
(Eylül 1999 - Şubat 2000) Amniotik sıvı örneklerinde hücre kültürü

ULUSAL KONGRELER ve KURSLAR

-IV. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi (İzmir - 2000)
-Gen Teknolojisi Uygulamaları Sempozyumu – Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İzmir - 2000)
-Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (TÜBİTAK, Gebze-2005)

-Bilgisayar Kullanım Kursu - Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (Edirne – 1996)
-Temel Genetik Kursu (İzmir - 2000)

ARAŞTIRMA ve YAYINLAR

-**EKİCİ N.** "Atopik Dermatitli Olgularda HLA Antijenlerinin Dağılımı" Danışman: Doç. Dr. Gökay Bozkurt, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Ulusal Hakemli Dergi Makaleleri

- EKİCİ N., BOZKURT G., DALGIÇ Ö., TÜZÜN B., ALGÜNEŞ Ç. **(2001)**: Atopik dermatitli vakalarda HLA antijenlerinin dağılımı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 18(1): 3-8.

- BOZKURT G., **EKİCİ N.,** DALGIÇ Ö., ALGÜNEŞ Ç. **(2001)**: Ankilozan spondilitisli hastalarda HLA-B27 antijeni dağılımı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 18(1): 37-42.

- DALGIÇ Ö., BOZKURT G., **EKİCİ N.,** ALGÜNEŞ Ç. **(2001)**: Larenks kanserinin immunogenetik orijini. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 18(2): 93-99.

- DALGIÇ Ö., BOZKURT G., **EKİCİ N.,** ALGÜNEŞ Ç. **(2001)**: Larenks kanseri etiyolojisinde immunogenetik faktörlerin rolü. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 18(2): 111-116.

Uluslararası Hakemli Dergi Makaleleri

- EKİCİ N. & DANE F. **(2004)**: Polarity during sporogenesis and gametogenesis in plants. Biologia, Bratislava, Section Cellular and Molecular Biology. 59 (6): 687-696.

BİLDİRİ ve POSTERLER

- BOZKURT G., HATİPOGLU O. N., OĞUZ F. S., TÜRE M., DALGIÇ Ö., **EKİCİ N.,** ALGÜNEŞ Ç. **(2000):** Aktif Akciğer Tüberkiloz Hastalığı ile HLA-DRB1* Allel Birlikteliği. Gen Teknolojisi Uygulamaları Sempozyumu. 01-05 Mayıs 2000. İzmir.

- BOZKURT G., DALGIÇ Ö., **EKİCİ N.,** ALGÜNEŞ Ç. **(2000):** *Homo Sapiens*'lerin Klonlanması. Gen Teknolojisi Uygulamaları Sempozyumu. 01-05 Mayıs 2000. İzmir.

- DANE F., OLGUN G., **EKİCİ N. (2005):** *Penstemon gentianoides* Poir.'in (Scrophulariaceae) Olgun Embriyo Kesesi Evresinde Endotelyum ve Antipod Hücrelerinin İnce Yapısı. Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. TÜBİTAK, Gebze-2005.

ÜYE OLDUĞU DERNEKLER

-Tıbbi Biyoloji Derneği
-Türk Elektron Mikroskopi Derneği

2002-2003 yıllarında Özel Güçlü Eğitim Dershanesi'nde biyoloji öğretmenliği yaptım.