



Flow Sitometri ve Bitki Islahı

Fatih DEMİREL^{1*}, Barış EREN², Serap DEMİREL³, Aybüke EROL⁴

Öz: Bitkiler hem insanoğlunun hem de hayvanların beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Artan dünya popülasyonu ve küresel ısınma besin kalitesi ve kaynağı üzerinde problemler oluşturmaktadır. Bitki ıslahı besin kalitesinin ve verimin artırılması amacıyla birçok bitkide uygulanmıştır. Flow sitometri (flow cytometry; FCM) keşfedildiğinden beri bitki ıslahında ploidi seviyelerinin belirlenmesi için uygun ve kullanışlı bir araç olmuştur. Flow sitometri ebeveyn bitkilerin karakterize edilmesi, çaprazlama sonucu oluşan yavru bitkilerin kromozom içeriğinin saptanması, poliploidizasyon çalışmaları gibi farklı amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Bu çalışma da flow sitometri ve bitki ıslahında kullanımı ele alınmıştır. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte flow sitometrinin tarımda ve bitki ıslahında kullanımı yaygınlaşmıştır. Araştırmacıların genom modifikasyonu üzerindeki çalışmalara ilgisini arttıkça, flow sitometrinin farklı uygulamalarda kullanılacağı olası gözükmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bitki, DNA miktarı, FCM, ıslah.

* **Sorumlu Yazarlar/Corresponding Authors:** ¹ Fatih DEMİREL (İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, İğdır, Türkiye, drfdemirel@gmail.com, [OrcID: 0000-0002-6846-8422](https://orcid.org/0000-0002-6846-8422))

² Barış EREN (İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, İğdır, Türkiye, bariseren86@gmail.com, [OrcID: 0000-0002-3852-6476](https://orcid.org/0000-0002-3852-6476))

³ Serap Demirel (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye, serap_comart@hotmail.com, [OrcID: 0000-0002-3102-4924](https://orcid.org/0000-0002-3102-4924))

⁴ Aybüke EROL (İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, İğdır, Türkiye, aybuke7676@gmail.com, [OrcID: 0000-0002-0368-5434](https://orcid.org/0000-0002-0368-5434))

Flow Cytometry and Plant Breeding

Abstract: Plants have a crucial place in the nutrition of both the humankind and the animals. Increasing world population and global warming create problems on food quality and sources. Plant breeding has been applied in many plants in order to increase nutrient quality and yield. Since flow cytometry was discovered, it has been a convenient and useful tool for determining ploidy levels in plant breeding. Flow cytometry is used for different purposes such as characterization of parent plants, determination of chromosome content of offspring plants and polyploidization studies in breeding. In this study flow cytometry and its use in plant breeding are discussed. With the development of technology and automated systems, the use of flow cytometry in agriculture and plant breeding has become widespread. As researchers have increased interest in genome modification studies, it is likely that flow cytometry will be used in different applications.

Keywords: breeding, DNA amount, FCM, plant.

Giriş

İstenilen amaca yönelik ve bir hedef doğrultusunda bitki cins, tür ve çeşitlerinin genomik bilgisini, genetik ve sitogenetik yöntemlerden yararlanarak planlı şekilde değiştirme ve geliştirmeye bitki ıslahı denir (Tosun, 2015). Kromozom sayısı, kromozomların morfolojisi ve benzerlikleri türler arasındaki evrim ilişkisini açıklamada, bitkilerin taksonomisini belirlemede, karyotiplerinin incelenmesinde ve genetik sisteminin fiziksel olarak gösteriminin sağlanmasında bilgi vermektedir (Öz, 1995). Islah programı başlatılmadan önce cins içerisinde yer alan farklı türlerin birbiriyle olan evrimsel ilişkilerinin belirlenmesi, sahip oldukları genom yapısının anlaşılması ve ploidi düzeyinin belirlenmesi için kullanılacak flow sitometri tekniği günümüzde kullanılan en hızlı ve güvenilir bir yöntem olmaktadır (Teykin, 2011). Flow sitometri, geniş kullanıma sahip olmasına rağmen, bitkilerde en fazla çekirdek DNA analizinde kullanılmıştır (Dolezel ve Bartos, 2005).

Flow Sitometri Nedir?

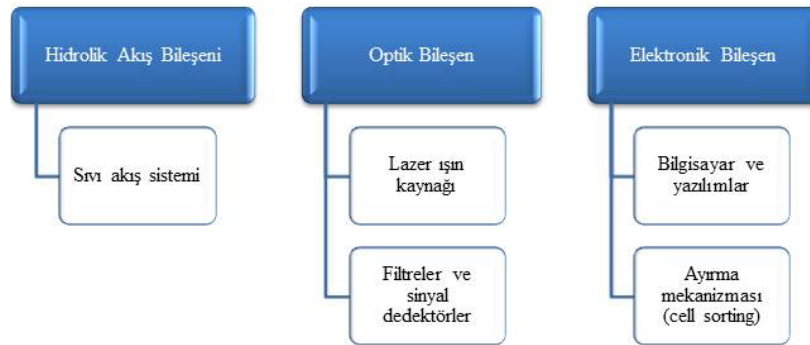
Flow sitometri, bir sıvı akım içerisinde hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinin hızlı ve güvenilir şekilde ölçüldüğü bir cihaz ve tekniktir. Bu yöntem ile hücrenin çapı, iç yapısı, enzim aktiviteleri ve DNA miktarları belirlenebilmektedir. DNA'nın yapısına bağlanan floresan boyalar bu teknikte kullanılarak, cihazın lazer ışınıyla oluşan farklı dalga boylarını sisteme ileterek kullanılabilir bilgi oluşturulmaktadır. Flow sitometride propidium iodide, ethidium bromide ve acridine orange sık kullanılan floresan boyalardır (Demirel, 1995). Ploidi taramasında, genom büyüklüğünün belirlenmesinde (Koné ve ark.,

2007), endopoliploidi çalışmalarında (Lemontey ve ark., 2000; Ochatt ve ark., 2001) ve hücre döngüsü çalışmalarında (Cvikrová ve ark., 2003) hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Flow sitometri cihazlarının kurulum maliyetleri yüksek olmasına rağmen, kullanım ve bakım maliyetleri düşüktür. Saniyede binlerce partikül okuma yapabilen hızlı bir teknik olmasının yanında, doğru kalibre yapılması gerekmektedir. Aksi durumda, ölçüm yapılması istenen partiküllerin dışındaki tüm yapıların ölçülmesi mümkün olabilmektedir (Kanev ve Muranlı, 2016).

Flow Sitometrinin Çalışma Prensipleri

Flow sitometri tekniğini oluşturan bileşenler Şekil 1’de verilmiştir (Pozarowski ve ark., 2004). Özet olarak çalışma prensibi şu şekildedir; sıvı akış sisteminden konulan örnek sıvısı, etrafını saran ve birbirleriyle karışmayan sıvının (sheath fluid) merkezinden bir kanal aracılığıyla tek bir sıra halinde lazerin önüne ilerlemektedir. Lazer önünden geçerken partiküllere çarpan ışın farklı dalga boylarında dağılıma uğramaktadır. Floresan dağılım, çapraz ve silindirik filtreler ile toplanıp fotodedektöre iletilmektedir. Gelen optik sinyaller PMT (photo multiplier tubes) ile birleşerek elektronik sinyallere çevrilerek bilgisayara aktarılmaktadır (Craig ve Foon, 2008; Kanev ve Muranlı, 2016). Sinyaller dijital ortamda histogram olarak ekranda gösterilmektedir (Dunphy, 2004).



Şekil 1. Flow sitometrinin temel bileşenleri <Pozarowski, 2004>

Bu tekniğin kullanımıyla analiz edilen genotiplerin çekirdek süspansiyonları standart bir örnekle karşılaştırılarak histogramda oluşan görüntülerin zirveleri ile ploidi seviyeleri belirlenmektedir. Teknolojik ilerlemeler sonucunda hem floresan hem de ışık saçılımı ölçebilen uygun fiyatlı cihazların ortaya çıkmasıyla taze bitki örneklerinden, kurutulmuş bitki örneklerinden (Suda ve Trávníček, 2006; Roberts, 2007) ve dondurulmuş bitki örneklerinden (Chiatante ve ark., 1990; Hopping, 1993) analiz yapılabilmektedir.

Sitogenetik ve Bitki Islahı

Ploidi olayı aynı tür bitkilerde bile görülen genetik bir olaydır. Farklı genetik kaynakların bilimsel çalışmalarda ve ıslah programlarında kullanılması için tür teşhisinin ve ploidi seviyelerinin belirlenmesi önemlidir (Tuna ve ark., 2001; Göçmen, 2016). Ploidi yönünden belirlenen tür, çeşit ve popülasyonlar arasındaki akrabalık ilişkileri bitki ıslahında melezlenme potansiyelleri hakkında bilgi vermektedir. Islah çalışmalarında sitogenetik kararlılığa sahip, melezlenmesi kolay olan ve kısırılık sorunu yaşanmayan kültür çeşitlerinin kullanımı daha çok tercih edilse de daralan genetik varyasyon, beklentileri karşılayamamakta ya da yetersiz kalmaktadır (Huang ve ark., 2002). Bu yüzden geniş genetik varyasyona sahip yabani ve yarı yabani bitki formlarından faydalanıldığı görülmektedir (Bai ve ark., 1994; Altındal ve Akgün, 2015). Ayrıca istenilen özelliklerin taranarak ıslahta kullanılabilmesi için çeşitlerin de sitolojik yapıları arasındaki ilişkinin bilinmesi, ıslah çalışmalarında önemli olabilmektedir.

Bitkilerde ploidi seviyesini belirlemek için metafaz safhasında tutulan kök uç hücreleri kullanılarak yapılan kromozom sayımları halen yapılsa da bu yöntem hem oldukça zaman alıcı hem de bol miktarda bölünen hücreye sahip genç ve hızlı büyüyen kök ucu materyaline gereksinim duymaktadır. Flow sitometrinin ortaya çıkmasıyla sitogenetik taramalar hız kazanmış ve birçok bitkide çalışmalar yapılmıştır (Brummer ve ark., 1999; Zonneveld, 2001; Egesi ve ark., 2002; Palomino ve ark., 2003; Pillay ve ark., 2006; Akbudak ve ark., 2018a).

Klasik ıslah programları uzun yıllar sürebilmektedir. Araştırmacılar moleküler teknikleri kullanarak ıslah çalışmalarını hızlandırmak ve genetik düzeyde varyasyonu incelemek için biyoteknolojik yöntemlere başvurmuşlardır (Çifci ve Yağdı, 2011). Klasik sitogenetik çalışmalarda, özellikle çok sayıda genotip için uzun süren bir işlem olmasından dolayı flow sitometri yöntemi zaman ve iş gücü yönünden avantaj sağlamaktadır.

Islah Amaçlı Flow Sitometrinin Kullanımı

Flow sitometri modern bitki ıslahı programlarının önemli bir parçası durumundadır. Bitki DNA içeriklerinin bilinmesi birçok bitki ıslah programları veya teknikleri için gerekli hale gelmiştir. Bu doğrudan poliploidi ıslahında ploidi değişimlerini kapsamaktadır. Poliploidizasyon genellikle olumlu morfolojik değişikliğe öncülük eden hücre boyutunun arttırılmasına eşlik etmektedir. Poliploid bitkiler genellikle yaprak en ve boy oranı artışı, daha koyu yaprak rengi ve daha dar büyüme habitatu ile karakterize edilmiştir (Shao ve ark., 2003). Süs bitkilerinde flow sitometri kullanılarak seçilmiş, antimitotik ajanlar kullanılarak *in vitro* veya *ex vitro* ortamlarda poliploidleşme çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Regalado ve ark., 2017). Poliplodinin uyarılması ile *Ocimum basilicum*, *Thymus persicus* ve *Trachyspermum ammi* gibi bazı tıbbi bitkilerin önemli bileşenlerinde artışın sağlandığı rapor edilmiştir (Omidbaigi ve ark., 2010; Tavan ve ark., 2015; Noori ve ark., 20017). Ancak çoğu zaman DNA miktarının içeriğinin bitkilerde belirli organların büyüklüğü ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Tatum ve ark., 2006).

Flow sitometri tür içi ve türler arası melezleme ıslahında DNA içeriklerini tanımlamada oldukça kullanışlı bir araçtır. Flow sitometrinin avantajlarından biri tohum ya da fide gelişim döneminde bitkilerin DNA içeriği ölçümlerini gerçekleştirerek olgun melez bitkilerin morfolojik karakterlerinin tahmin edilmesine olanak sağlamaktadır. *Musa* spp. gibi diploid, triploid veya tetraploid olan bitkilerin germplazm ve ıslah programlarının yönetimi için ploidi seviyelerinin bilinmesi önemli olmaktadır (Nsabimana ve van Staden, 2016). *Musa* spp. farklı polidi seviyelerine sahip olmasının yanı sıra vejetatif üretimde istenilmeyen triploid popülasyonlar arasında aneuploidi olayı meydana gelmektedir. Flow sitometri aneuploid bitkilerin tespit edilmesinde de kullanılmaktadır (Roux ve ark., 2003; Ozaki ve ark., 2004; Lim ve ark., 2003; Lepers-Andrzejewski ve ark., 2011).

Türler arası melezlemelerin amacı hem kalite veya biyotik/abiyotik dayanıklılık için değerli özellikleri yabancı türlerden kültür türlerine transfer etmek hem de elde edilen ıslah materyalinin genetik varyasyonunu genişletmek veya farklı özelliğe sahip yeni bir melez bitki elde etmektir. Bundan dolayı, ıslah programlarında melezleme çalışmalarında ebeveyn seçiminde flow sitometri kullanılarak farklı bitkilerin DNA içeriklerinin belirlendiği birçok araştırma bulunmaktadır (Kamiński ve ark., 2016; Talluri ve Murray, 2009; Temsch ve ark., 2008; Denaeghel ve ark., 2017).

Çok yıllık buğdaygiller yem bitkisi genetik kaynaklarının karakterizasyonu ve ıslah programlarında kullanmak için farklı bölgelerden toplanmış 169 bitki popülasyonlarının (*Agropyron* sp., *Festuca* sp. ve *Koeleria* sp.) çekirdek DNA içerikleri ve ploidi düzeyleri flow sitometri ile belirlenmiştir (Tuna ve ark. 2016). Yabancı 55 *E. arundinaceus*'ların kromozomlarının ploidi dağılımlarını belirlemesi ve şeker kamışı ıslahında kullanımlarını arttırmak için flow sitometri ile DNA içerikleri analiz edilmiştir (Yan ve ark., 2016). Yabancı yonca (*Medicago sativa* L. subsp. *xvaria*) aksesyonlarında ploidi seviyeleri ve genom büyüklükleri incelenmiş, bütün yonca aksesyonlarının tetraploid oldukları ve ıslah programlarında kullanmak için bu tür çalışmaların önceden yapılması gerektiği bildirilmiştir (Sakiroglu ve Kaya, 2012). Bamya (*Abelmoscus esculentus*) çeşit ve popülasyonlarının ploidi düzeylerinin belirlendiği bir çalışmada hızlı ve güvenilir bir yol olarak flow sitometriden faydalanılmıştır (Örkcü ve ark., 2014). FCM ile yam fasulyesinin iki türünde (6 adet *Pachyrhizus erosus* ve 3 adet *P. tuberosus*) ploidi seviyeleri ve genom büyüklükleri incelenmiş, *P. tuberosus*'un nükleer DNA içeriği *P. erosus*'unkinden daha düşük olduğu ve bütün türlerin diploid ($2n=2x$) ploidi seviyesinde bulunduğu rapor edilmiştir (Pati ve ark., 2019). Ispanak aksesyonlarının ploidi seviyelerinin incelendiği çalışmada flow sitometri ile belirlenen 53 ıspanak aksesyonunun yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılabileceği ve ayrıca araştırmacılara zaman ve iş gücü bakımından tasarruf sağlayabileceği rapor edilmiştir (Deveci ve ark., 2018). *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. (Su Kabağı) popülasyonlarında çekirdek DNA içerikleri ve ploidi düzeylerini FCM ile incelenerek, ıslah çalışmalarında bitkiler arasında ploidi farkından dolayı üreme engeli ve olumsuz gen akışı problemlerinin en aza indirilmesi hedef alınmıştır (Ersoy ve ark., 2014).

Dünya çapında çekirdeksiz turunçgiller geliştirilmesine yönelik yapılan ıslah çalışmalarına oldukça önem verilmektedir. Çekirdeksiz turunçgiller triploid yapıdaki türlerde görülmektedir. Triploidi bireyler ise diploid ebeveyn ya da diploid ve tetraploid ebeveynler ile oluşturulmaktadır. Genetik kaynaklar arasında bulunmayan tetraploid bireylerin elde edilmesi ise kromozom katlama işlemleriyle gerçekleştirilmektedir. Kromozom katlama

işlemi sonrası bireylerin ploidi seviyeleri flow sitometri yöntemi ile belirlenmekte ve elde edilen tetraploid ebeveynler diploid bireyler ile melezlenerek triploid ebeveynler yani çekirdeksiz turunçgiller elde edilmektedir (Çimen ve ark., 2016).

Flow sitometri yöntemi kullanılarak bazı bitkilerde erken gelişim dönemlerinde cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Dolezel ve Göhde (1995), dioik bir bitki olan *Melandrium album* bitkisinde flow sitometri yöntemiyle cinsiyet tayini yapmışlardır. Erkek bireylerin dişi bireylerden farklı olarak bir Y kromozomuna ve daha fazla DNA içeriğine sahip olması FCM aracılığıyla belirlenmiştir.

Digitalis trojana Ivanina türünün *in vitro* kültüre alınması sırasında kültür koşullarından kaynaklanabilecek nedenlerden dolayı oluşabilecek genetik varyasyonların incelenmesinde FCM kullanılmıştır. Araştırmacılar hem tohumdan hem de sürgün organogenezis kültürüyle yetiştirilen *Digitalis trojana Ivanina* bitkisinde kromozom sayılarının her iki yetiştiricilikte de aynı olduğunu FCM ile göstermişlerdir (Çördük ve ark., 2017).

Klasik yöntemler ile kromozom sayıları incelenen çok sayıdaki bitki örnekleri üzerinde yanlış analizler yapılabilmektedir. Hızlı ve güvenilir bir yöntem olan FCM tekniği ile USDA-NSGC gen bankasında saklanan 13 farklı *Avena* türüne ait 64 aksesyonun genom büyüklükleri ve ploidi seviyeleri incelenmiş ve bu gen bankasındaki bazı etiket bilgilerinin doğru olmadığı belirlenmiştir (Akbudak ve ark., 2018b). Yine, USDA Ulusal Bitki Germplazm Sistemi'nde (NPGS) bulunan dört *Bromus* türünün (*Bromus inermis* Leyss, *B. riparius* Rehm, *B. biebersteinii* Roem ve Schult. ve *B. inermis* ssp. *pumpellianus* (Scribn) Wagnon) 322'den fazla aksesyonunun nükleer DNA içerikleri belirlenmiştir (Tuna ve ark., 2001). Nijerya ve Uganda'daki Uluslararası Tropikal Tarım Enstitüsü'ndeki 300'den fazla üyeyi oluşturan *Musa* spp. germplazm koleksiyonunun ploidi düzeyleri ve genom bileşimleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda germplazm koleksiyonundaki bitkilerin en az %8'inin ploidi ve genom bileşimi açısından yanlış sınıflandırıldığı tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, daha önce triploid olarak sınıflandırılan 'Pisang awak', 'Foulah 4' ve 'Nzizi' çeşitlerinin, akış sitometrisi ve geleneksel kök ucu kromozomu sayıları ile tetraploid olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, daha önce "Too" ve "Toowoolee" gibi diploidler olarak sınıflandırılan çeşitlerin triploid olduğu bildirilmiştir (Pillay ve ark., 2006).

Disomik ve Ditelosomik Buğday-Çavdar hattı eklenen buğdayda aneuploidi varlığının tespiti flow sitometri yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. FCM DNA analizi, ortak buğday genomuna (*Triticum aestivum* L.) komple veya telosomik çavdar kromozomlarının eklenmesi ile uyarılan nükleer DNA içeriğindeki değişiklikleri incelemek için kullanılmıştır. Her hattın DNA içeriği, bir referans değerle karşılaştırılarak belirlenmiş ve orijinal buğday ana hattına göre bir fark olduğu belirlenmiştir. Çekirdek içindeki çavdar kromatininin daha yüksek DNA içeriğine sahip olduğu belirlenmiş ve bu tahminlerin Southern hibridizasyonu ile doğrulandığını bildirmişlerdir. Böylelikle flow sitometrinin, buğday bitkisinde aneuploid mevcudiyetini, küçük DNA içeriği sapmalarını tespit etmek için yeterince hassas olduğu kanıtlanmıştır (Pfosser ve ark., 1995).

Etiyopya'da endemik bir tür olan tef (*Eragrostis tef*) bitkisinde flow sitometri yöntemiyle nükleer DNA içeriği belirlenmiştir. Çalışmada Etiyopya koşullarında yetişen 35 tef (*Eragrostis tef*) çeşidi kullanılmıştır. Yöntem, kültür bitkilerinde ploidi düzeylerinin hızlı bir şekilde taranması ve Etiyopya'daki bu türün fenotipik

değişkenliğini temsil eden tef bitkileri açısından önem arz ettiği bildirilmiştir. Domateslerden izole edilen çekirdekler (*Lycopersicon esculentum*, $2C = 1.96$ pg) referans standardı olarak kullanılmış ve analiz sonuçlarında tüm çeşitlerin tetraploid olduğunu bildirmişlerdir (Ayele ve ark., 1996).

FCM kullanılarak, bazı şeftali türlerine ait DNA içerikleri belirlenmiştir. Şeftali DNA içerikleri haploid çekirdekler 0.30 pg ile tetraploid çekirdekler 1.23 pg arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Diploid genom içerikleri yaklaşık 0.60 pg olduğu ve genom boyutu ile ploidi seviyesi arasında pozitif bir ilişki olduğu tahmin edilmiştir. Yapılan genom büyüklüğü tahminleri Southern blot tekniği ile doğrulanmıştır (Baird ve ark., 1994).

Sonuç

Bitkilerin ıslah programlarında kullanım potansiyellerini arttırmak için sitolojik karakterizasyonlarının incelenmesi önemlidir. Islah çalışmalarında yeni çeşitlerin başarılı bir şekilde geliştirilebilmesi için tür veya türe ait genetik kaynakların biyolojik, taksonomik, genetik ve agronomik bilgilerinin bilinmesine gereksinim vardır. Bu tanımanın hızlı bir şekilde güvenli olarak yapılması flow sitometri cihazı ile mümkün olmaktadır. Flow sitometri bitki ıslah sürecinin farklı adımlarında çeşitli amaçlar doğrultusunda ıslah programında kullanılan materyaller hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Ploidi seviyesinin bilinmesi bitki ıslah programında kullanılacak olan uygun stratejinin seçilmesinde önem taşımaktadır. Bitki ıslahı ve sitogenetik çalışmalarda DNA içeriğinin doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenmesinde flow sitometri analizi uygun ve kullanım alanı yaygınlaşan bir yöntemdir. Bitki ıslahı artan popülasyonun besin ihtiyacını karşılamak ve küresel ısınmadan kaynaklı doğacak problemlerden dolayı önem taşımaktadır. Islah programlarında kullanılan bitki türü, çeşidi ve popülasyonlarında kromozom yapılarına ve ploidi seviyelerine göre gerçekleştirilen filogenetik analizler ıslah materyalinin melezlenme potansiyeli hakkında bilgiler sunmaktadır. Ayrıca bu tür bilgilerin varlığı gelecekte yürütülecek ıslah programlarına da ışık tutabilecektir.

Kaynakça

- Akbudak, M.A., Paksoy, A. ve Tuna, M. 2018a. Farklı türlere ait yulaf aksesyonlarının genom büyüklüklerinin belirlenmesi ve ploidi seviyelerinin tespiti. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 31(1): 49-54.
- Akbudak, M.A., Şakiroğlu, M. and Tuna, M. 2018b. Estimation of nuclear DNA content and determination of relationship between altitude and genome size of USDA Turkish oat (*Avena* spp.) collection. *Gesunde Pflanzen*, 70(4): 171-178.
- Altındal, D. ve Akgün, İ. 2015. Bitki genetik kaynakları ve tahıllardaki durumu. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(1): 147-153.
- Ayele, M., Doleže, J., Van Duren, M., Brunner, H. and Zapata-Arias, F.J. 1996. Flow cytometric analysis of nuclear genome of the Ethiopian cereal tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Genetica*, 98(2): 211-215.

- Bai, D., Scoles, G.J. and Knott, D.R. 1994. Transfer of leaf rust and stem rust resistance genes from *Triticum triaristatum* to durum and bread wheats and their molecular cytogenetic localization. *Genome*, 37(3): 410-418.
- Baird, W.V., Estager, A.S. and Wells, J.K. 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(6): 1312-1316.
- Brummer, E.C., Cazcarro, P.M. and Luth, D. 1999. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Science*, 39(4): 1202-1207.
- Chiatante, D., Brusa, P., Levi, M., Sgorbati, S. and Sparvoli, E. 1990. A simple protocol to purify fresh nuclei from milligram amounts of meristematic pea root tissue for biochemical and flow cytometry applications. *Physiologia Plantarum*, 78(4): 501-506.
- Craig, F.E. and Foon, K.A. 2008. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111(8): 3941-3967.
- Cvikrová, M., Binarová, P., Cenklová, V., Eder, J., Doležel, J. and Machácková, I. 2003. Effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on cell cycle progression in synchronous meristematic cells of *Vicia faba* roots. *Plant Science*, 164(5): 823-832.
- Çifci, E.A., Yağdı, K., 2011. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2): 7-18.
- Çimen, B., Yeşiloğlu, T., İncesu, M., Yılmaz, B. ve Kaçar, Y.A. 2016. Bazı turuncgil genotiplerinden tetraploid bitki elde edilmesi. *Derim*, 33(2): 175-188.
- Çördük, N., Yücel, G., Akinci, N. and Tuna, M. 2017. Assessment of the genetic stability of indirect shoot organogenesis-derived plantlets of *Digitalis trojana* Ivanina by flow cytometry and cytological analyses. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 14(1): 69-76.
- Demirel, D. 1995. Flow stimetrik DNA analizinin temel prensipleri. *Türk Patoloji Dergisi*, 11(2): 64-65.
- Denaeghel, H., Van Laere, K., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. and Van Labeke, M.C. 2017. Interspecific hybridization in *Sarcococca* supported by analysis of ploidy level, genome size and genetic relationships. *Euphytica*, 213(7): 149.
- Deveci, M., Yavaş, Ö., Şahin, N. ve Tuna, M. 2018. Flow sitometri ile bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(2): 239-246.
- Doležel, J. and Bartoš, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1): 99-110.
- Doležel, J. and Göhde, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19(2): 103-106.

- Dunphy, C.H. 2004. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 128(9): 1004-1022.
- Egesi, C.N., Pillay, M., Asiedu, R. and Egunjobi, J.K. 2002. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm. *Euphytica*, 128(2): 225-230.
- Ersoy, D., Ersoy, Y., Cabi, E., Denli, N., Yetişir, H. ve Tuna, M. 2014. Flow sitometri ile türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış olan *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. (Su Kabağı) popülasyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi ve popülasyonların ploidi düzeylerinin saptanması. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ, Türkiye, p:181.
- Göçmen, D.B. 2016. Doğu Anadolu Dağlık Bölgelerinden Toplanmış *Phelum* L. Popülasyonlarının Agronomik, Morfolojik ve Sitogenetik Karakterizasyonu. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Hopping, M.E. 1993. Preparation and preservation of nuclei from plant tissues for quantitative DNA analysis by flow cytometry. *New Zealand Journal of Botany*, 31(4): 391-401.
- Huang, X., Börner, A., Röder, M. and Ganai, M. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(5): 699-707.
- Kamiński, P., Podwyszyńska, M., Starzycki, M. and Starzycka-Korbas, E. 2016. Interspecific hybridisation of cytoplasmic male-sterile rapeseed with *Ogura* cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica*, 208(3): 519-534.
- Kanev, M. ve Muranlı, F.G. 2016. Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, 20(1): 33-38.
- Koné, M., Patat-Ochatt, E.M., Conreux, C., Sangwan, R.S. and Ochatt, S.J. 2007. In vitro morphogenesis from cotyledon and epicotyl explants and flow cytometry distinction between landraces of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc], an under-utilised grain legume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(1): 61-75.
- Lemontey, C., Mousset-Déclaus, C., Munier-Jolain, N. and Boutin, J.P. 2000. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *Journal of Experimental Botany*, 51(343): 167-175.
- Lepers-Andrzejewski, S., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S.C., Wong, M. and Dron, M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomaty from a cytogenetic study of Tahitian vanilla (*Vanilla × tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 98(6): 986-997.
- Lim, K.B., Ramanna, M.S., Jacobsen, E. and Tuyl, J.M. 2003. Evaluation of BC2 progenies derived from 3x-2x and 3x-4x crosses of *Lilium* hybrids: a GISH analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3): 568-574.
- Noori, S.A.S., Norouzi, M., Karimzadeh, G., Shirkoool, K. and Niazian, M. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(3): 543-551.

- Nsabimana, A. and Van Staden, J. 2006. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the National Banana Germplasm Collection at Rubona–Rwanda by flow cytometry. *South African Journal of Botany*, 72(2): 302-305.
- Ochatt, S., Durieu, P., Jacas, L. and Pontécaille, C. 2001. Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2(1): 35-38.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Sedghi Moghadam, M. 2012. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production*, 4(2): 87-98.
- Ozaki, Y., Narikiyo, K., Fujita, C. and Okubo, H. 2004. Ploidy variation of progenies from intra- and interploidy crosses with regard to trisomic production in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 17(4): 157-164.
- Örkcü, P., Polat, S., Savaş, G.T. ve Tuna, M. 2014. Türkiye’de yetiştirilen bamya (*Abelmoschus esculentus*) çeşitinin farklı lokal popülasyonlarının ploidi düzeylerinin flow sitometri ile belirlenmesi. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ, p:537.
- Öz, S. 1995. Balıkesir Edremit Kazdağ Yöresinde Yetişen Sideritis Türlerinde Kromozom Çalışmaları (*S. perfoliata* L., *S. athena* Papanikolau ve Kokkini, *S. dichotoma* Huter, *S. trojana* Bornm.). Basılmamış Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Palomino, G., Dolezel, J., Mendez, I. and Rubluo, A. 2003. Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*, 56(1): 37-46.
- Pati, K., Zhang, F. and Batley, J. 2019. First report of genome size and ploidy of the underutilized leguminous tuber crop yam bean (*Pachyrhizus erosus* and *P. tuberosus*) by flow cytometry. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 1-4.
- Pillay, M., Ogundiwin, E., Tenkouano, A. and Dolezel, J. 2006. Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *African Journal of Biotechnology*, 5(13): 1224-1232.
- Pfossler, M., Heberle-Bors, E., Amon, A. and Lelley, T. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat–rye addition lines. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 21(4): 387-393.
- Regalado, J.J., Carmona-Martín, E., Querol, V., Veléz, C.G., Encina, C.L. and Pitta-Alvarez, S.I. 2017. Production of compact petunias through polyploidization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(1): 61-71.
- Roberts, A.V. 2007. The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen. *Cytometry Part A*, 71(12): 1039-1044.
- Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F.J. and Doležel, J. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports*, 21(5): 483-490.

- Sakiroglu, M. and Kaya, M.M. 2012. Estimating genome size and confirming ploidy levels of wild tetraploid alfalfa accessions (*Medicago sativa* subsp.× *varia*) using flow cytometry. *Turkish Journal of Field Crops*, 17(2): 151-156.
- Shao, J., Chen, C. and Deng, X. 2003. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75(3): 241-246.
- Suda, J. and Trávníček, P. 2006. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry Part A*, 69(4): 273-280.
- Talluri, R.S. and Murray, B.G. 2009. DNA Cvalues and chromosome numbers in *Fuchsia* L.(Onagraceae) species and artificial hybrids. *New Zealand Journal of Botany*, 47(1): 33-37.
- Tatum, T.C., Nunez, L., Kushad, M.M. and Rayburn, A.L. 2006. Genome size variation in pumpkin (*Cucurbita* sp.). *Annals of Applied Biology*, 149(2): 145-151.
- Tavan, M., Mirjalili, M.H. and Karimzadeh, G. 2015. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3): 573-583.
- Temsch, E.M., Greilhuber, J., Hammett, K.R. and Murray, B.G. 2008. Genome size in *Dahlia* Cav.(Asteraceae–Coreopsidae). *Plant Systematics and Evolution*, 276(3-4): 157-166.
- Teykin, E.E. 2011. Flow Sitometri İle *Bromus catharticus* vahl Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tuna, G.S., Keleş, H., Göçmen, D., Güleriyüz, V., Nizam, İ., Cabi, E., Yazıcı, A., Çakal, Ş. ve Tuna, M. 2016. Flow sitometri ile çok yıllık buğdaygil yem bitkisi genetik kaynaklarının karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(ÖZEL SAYI-2): 7-12.
- Tuna, M., Vogel, K.P., Arumuganathan, K. and Gill, K.S. 2001. DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Science*, 41(5): 1629-1634.
- Tosun, M., 2015. *Bitki Islahı*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Türkiye, 480 s.
- Yan, J., Zhang, J., Sun, K., Chang, D., Bai, S., Shen, Y., Huang, L., Zhang, J., Zhang, Y. and Dong, Y. 2016. Ploidy level and DNA content of *Erianthus arundinaceus* as determined by flow cytometry and the association with biological characteristics. *Plos One*, 11(3): e0151948.
- Zonneveld, B.J.M. 2001. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Systematics and Evolution*, 229(1-2): 125-130.

