

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI KIRMIZI BAŞLI SOĞAN (*ALLIUM CEPA* L.)  
GENOTİPLERİNDE HAPLOİD BİTKİLERİN ÜRETİMİ  
POTANSİYELİNİN TESPİT EDİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SALİM BARIŞ**

**DENİZLİ, OCAK - 2020**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BAZI KIRMIZI BAŞLI SOĞAN (*ALLIUM CEPA* L.)  
GENOTİPLERİNDE HAPLOİD BİTKİLERİN ÜRETİMİ  
POTANSİYELİNİN TESPİT EDİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SALİM BARIŞ**

**DENİZLİ, OCAK - 2020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

SALİM BARIŞ tarafından hazırlanan “BAZI KIRMIZI BAŞLI SOĞAN (*ALLIUM CEPA* L.) GENOTİPLERİNDE HAPLOİD BİTKİLERİN ÜRETİMİ POTANSİYELİNİN TESPİT EDİLMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.01.2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN  
Pamukkale Üniversitesi



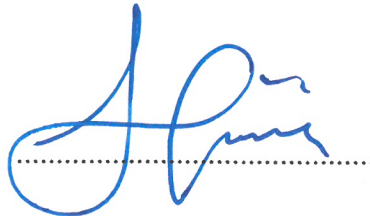
Üye  
Prof. Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK  
Pamukkale Üniversitesi



Üye  
Prof. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
16/01/2020 tarih ve ...0.3./16... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018FEBE058 no.lu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**SALİM BARIŞ**



## ÖZET

**BAZI KIRMIZI BAŞLI SOĞAN (*ALLIUM CEPA* L.) GENOTİPLERİNDE  
HAPLOİD BİTKİLERİN ÜRETİMİ POTANSİYELİNİN TESPİT  
EDİLMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SALİM BARIŞ  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALİ RAMAZAN ALAN)**

**DENİZLİ, OCAK - 2020**

Soğan (*Allium cepa* L.) türünde haploid bitki üretimi ginogenesis yöntemi ile mümkün olmaktadır. Farklı soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına verdikleri cevap ve haploid bitki üretme potansiyelleri farklılıklar göstermektedir. Bu tez çalışmasında ülkemizde yetiştiriciliği yapılan kırmızı başlı genotiplerin ginogenesis uyartımına verdiği cevaplar araştırılmıştır. Kullanılan soğan genotipleri Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAU BİYOM) soğan gen havuzundan alınan açık tozlanan seleksiyon materyalleri ve standart çeşitlerden oluşmuştur. Ginogenesis uyartım deneylerinde on genotipten alınan ~43 bin çiçek tomurcuğu uyartım ortamına ekilmiştir. Ginogenesis uyartımı denemelerinde yer alan 10 genotipten dokuzundan cevap elde edilmiştir. Toplam 267 (% 0,63) tomurcuk ginogenesis cevap vermiş ve bunlardan 274 (% 0,64) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Ginogenik bitkiciklerin ~% 42'si normal gelişim gösterirken geri kalanları bitkiye dönüşmemiştir. Flow sitometri analizi (FCM) ile yapılan ploidi analizi sonucunda normal gelişim gösteren ginogenik rejenerantların ~%50'sinin haploid olduğu tespit edilmiştir. FCM analizi normal gelişim gösteren ginogenik bitkilerin ~% 30'unun ve vegetatif olarak anormal gelişim gösteren bitkiciklerin ~% 40'ının diploid olduklarını göstermiştir. Ginogenik bitkilerin bazıları aklimize edilmiş ve dış ortama aktarılmıştır. Serada büyütülerek baş oluşturan ginogenik bitkiler kaynaklandıkları donör genotiplere benzerlik göstermişlerdir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Allium cepa* L., flow sitometre, ginogenesis, haploid, ploidi

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF HAPLOID PLANT PRODUCTION IN SOME RED BULBED ONION (*ALLIUM CEPA* L.) GENOTYPES**

**MSC THESIS**

**SALİM BARIŞ**

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. ALİ RAMAZAN ALAN)**

**DENİZLİ, JANUARY 2020**

Production of haploid plants from onion (*Allium cepa* L.) species is possible via gynogenesis technique. Onion genotypes may vary in their responses to gynogenesis induction and potential of haploid plant production ability. In this thesis project, responses of red bulb onion genotypes grown in our country to gynogenesis induction was studied. Onion genotypes used were open pollinated selection materials and standard varieties taken from Pamukkale University Plant Genetics and Agricultural Biotechnology Application and Research Center (PAU BIYOM) germplasm collection. In the gynogenesis induction experiments, ~43 thousand flower buds collected from 10 genotypes were placed in induction medium. Nine out of 10 genotypes used in the gynogenesis induction experiments showed response. A total of 267 (% 0,63) responded to gynogenesis and 274 (% 0,64) gynogenic plantlets were obtained from them. About % 42 of gynogenic plantlets showed normal growth and the remaining plantlates failed to develop to plant level. According to ploidy analysis with flow cytometry (FCM) ~% 50 of the gynogenic regenerants showing normal development were haploids. FCM analysis showed that ~% 30 of gynogenic plants with normal growth and ~% 40 of gynogenic regenerants with abnormal vegetative growth were determined to be diploids. Some of the gynogenic plants were acclimatized and transferred to in vivo. Gynogenic plants grown to produce bulbs in the greenhouse showed similarities to the donor genotypes from which they were obtained.

**KEYWORDS:** *Allium cepa* L., flow cytometer, gynogenesis, haploid, ploidy

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>8</b>
1.1 Soğanın ( <i>Allium cepa</i> L.) Ekonomik Önemi ve Islahı .....	8
1.2 Katlanmış Haploid (DH) Soğan Bitkilerinin Üretimi .....	9
1.3 Tezin Amacı .....	12
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>13</b>
2.1 Bitki Materyali .....	13
2.2 Çiçek tomurcuklarının kültüre hazırlanması .....	13
2.3 Ginogenesis uyartımı ve ginogenik bitkilerin elde edilmesi .....	15
2.4 Ginogenik soğan bitkilerinde ploidi seviyesi testi .....	16
2.5 Ginogenik Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılarak Büyütülmeleri.....	16
2.6 İstatistiksel Analiz .....	17
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>18</b>
3.1 Soğan Genotiplerinin Ginogenesis Uyartımına Verdikleri Cevaplar .	19
3.2 Ginogenesis Uyartım Uygulamasından Elde Edilen Soğan Bitkilerinin Ploidi Seviyeleri .....	22
3.3 Dış Ortama Aktarılan Ginogenik Bitkiler .....	23
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>28</b>
4.1 Haploid ve DH Soğan Bitkilerinin Üretilmesi .....	28
4.2 Haploid ve DH Soğan Bitkilerinin Üretiminin Avantajları.....	31
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>35</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 1. Soğan tomurcuklarının uyartım kültürüne ekilmeleri. A. Tomurcukların kesilmesi. B. Tomurcukların çay süzeklerine doldurulmaları. C. Yüzey sterilizasyonu işlemi. D. Sterilize edilmiş olan tomurcuklar. E. Tomurcukların uyartım ortamına ekilmeleri. F. Parafilm ile sarılmış tomurcuk kültürü. .... 14
- Şekil 2. Soğan tomurcuklarında ginogenesis cevabı. A. Tomurcuk kültürleri. B. Ginogenesis cevabı veren soğan tomurcuğu. C. Bir tomurcuktan üretilen iki ginogenik bitkicik. D. Tüplere aktarılmış ginogenik bitkicikler. .... 15
- Şekil 3. Ginogenik soğanlarda flow sitometri ile ploidi tespiti. A. Çekirdek örneklerinin PI ile boyanması. B. Örneklerin flow sitometriye yerleştirilmesi. C. Örneklerin analizi. D. Diploid bir bitkiye ait flow historamı. .... 17
- Şekil 4. Ginogenik soğan bitkilerinin dış ortama aktarımı. A. Tüpte bulunan ginogenik soğan bitkileri. B. Tüpten çıkarılmış bir ginogenik soğan. C. Steril torf ve perlit (2:1) ile doldurulmuş saklıslara aktarılış ve naylon poşet ile kapatılmış bitkiler. D. Dış ortama alıştırılmış ve seraya alınmış ginogenik soğan bitkileri. .... 18
- Şekil 5. Bitkiye dönüşemeyen ginogenik bitkicikler A. Vitrifiye bitkicik. B. Yapışık bitkicik. C. Kalınlaşmış kök. D. Dumura uğramış bitkicik. E. Dumura uğramış bitkicik. F. Kök ve sürgünde kallus. G. Dumura uğramış sürgün. H. Kalınlaşmış kök. I. Vitrifiye köklere sahip bitkicik. .... 19
- Şekil 6. PAU3-7 genotipinden üretilmiş ginogenik bitkiler ..... 26
- Şekil 7. PAU6 genotipinden (A-H) üretilmiş ginogenik bitkiler ..... 26
- Şekil 8. PAU5 (A) ve Çanakkale Kırmısı (B) genotiplerinden üretilmiş ginogenik bitkiler ..... 27

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1. Donör soğan hatlarının genel özellikleri.....	13
Tablo 2. Soğan genotiplerinin ginogenesis uyarımına gösterdikleri cevaplar .	21
Tablo 3. Bitki haline dönüşmüş olan ginogenik soğan bitkilerinde ploidi analizi sonuçları .....	22
Tablo 4. Anormal gelişim gösteren ginogenik soğan materyallerinde ploidi analizi sonuçları .....	24
Tablo 5. Ginogenik ve somatik bitkilerin yaş hallerinin karakteristik özellikleri	24
Tablo 6. Ginogenik ve somatik bitkilerin kuru hallerinin karakteristik özellikleri .....	25

## SEMBOL LİSTESİ

<b>g/l</b>	: Gram/litre
<b>mg/l</b>	: Miligram/litre
<b>µm</b>	: Mikro litre
<b>°C</b>	: Santigrad derece
<b>PI</b>	: Propodium iodide
<b>m/cm</b>	: Metre/santimetre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>NIB</b>	: Nuclei isolation buffer
<b>2,4-D</b>	: 2,4-Dikloro Fenoksi Asetik Asit
<b>BAP</b>	: Benzil Amino Pürin

## ÖNSÖZ

Bazı kırmızı başlı soğan (*Allium cepa* L.) genotiplerinde haploid bitkilerin üretimi potansiyelinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmayı tez konusu olarak öneren danışman hocam Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN'a çalışmamın her aşamasında bütün destekleri için teşekkür ediyorum ve saygılarımı sunuyorum.

Tezimin jüri üyesi olan Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak'a da yaptığı yardımlardan dolayı teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca yaptıkları yardımlardan ve desteklerinden dolayı başta arkadaşlarım Alireza Lachin, Doğuşcan Yıldız, Fatma Düzgün olmak üzere tüm PAU BİYOM ekibine teşekkür ediyorum.

Okula başladığım günden beri maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Soğanın (*Allium cepa* L.) Ekonomik Önemi ve İslahı

Soğan (*Allium cepa* L.) dünyanın her yerinde üretimi ve tüketimi yapılan önemli bir *Allium* türüdür. FAOSTAT (2016) verilerine göre yıllık dünya soğan üretimi yaklaşık olarak 93 milyon tondur. Ülkemiz yıllık yaklaşık olarak 2 milyon ton soğan üretimi ile dünyada dördüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2016). İnsan beslenmesi ve sağlığı açısından oldukça önemli biyokimyasal maddeler içermekte olan soğanın ıslahı zaman alıcı ve aynı zamanda zordur. Soğanın iki yıllık ve yabancı tozlanma eğilimine sahip olması, şiddetli kendileme depresyonu göstermesi, genomunun büyük ve heterozigotluk oranının yüksek olması gibi faktörler soğan ıslah programlarının zor ve çok uzun sürmesine neden olmaktadır. Bu nedenle de soğan ıslahı ile ilgilenen araştırmacı kuruluş ve bilim insanı sayısı hem az hem de yeterli düzeyde değildir. Soğan türünde yeni çeşitlerin geliştirilmesi işleminde klasik ıslah yöntemleri ile saf soğan hatlarının elde edilmesi, seçilmekte olan karakterlere göre değişiklik göstermekle birlikte yaklaşık olarak 6-7 generasyon (12-14 yıl) sürebilmektedir. Ülkemizde geçmiş yıllarda yapılan seleksiyon ıslahı çalışmalarıyla üretilmiş olan az sayıda açık tozlanan standart soğan çeşitleri mevcuttur ancak yeni soğan çeşitleri mevcut değildir. Bu nedenle de önemli soğan üreticisi ülkeler arasında yer alan ülkemizde üstün verimli yerli çeşitler mevcut olmadığı için yetiştiricilikte kullanılan tohumluk materyallerinin önemli bir kısmı ithalat yoluyla sağlanmaktadır.

Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde F1 hibrit, dünyanın diğer ülkelerinde ise açık tozlanan standart ve çiftçi çeşitleri ile soğan üretimi yapılmaktadır (Brewster 2008). Açık tozlanan (OP) standart ve çiftçi çeşitleri yetiştiriciliğin yapıldığı şartlara adapte olmuş materyallerdir. Bu çeşitlerde yüksek oranda heterozigotluk mevcuttur. OP materyallerde üretici ve tüketici tercihlerine de bağlı olarak istenilen özelliklerin devam ettirilmesi amacıyla kendileme ve seleksiyon ıslahı uygulanmaktadır. Tohum üretimi serbest tozlama ile sağlanan bu

materyallerde aşırı düzeyde kendileme ve seleksiyon yapılmaz. F1 hibrit çeşit üretiminde ise genel olarak iki aşama vardır. İlk aşamada istenen özellikler için büyük ölçüde homojen bitkiler üretebilen ebeveynlerin ıslahı gerçekleştirilir. Bu amaçla ilk aşamada anne ebeveyn olarak kullanılmak istenen hatlar, kendilenme riskinin ortadan kaldırılması için, sitoplazmik erkek kısır (CMS, A hattı) bitkiler olarak geliştirilir. Ayrıca bu hatlara genetik olarak çok benzeyen idame ettiriciler (B hattı) geliştirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda hibrit üretiminde polen donörü olarak kullanılacak hatlar (C) kendilemeler yapılarak ileri derecede homozigot hale getirilmektedir. İkinci aşamada ise A ve C hatlarının sıralar halinde dikilmesi ve tozlaşması sağlanmakta ve böylece hibrit tohumların üretimi gerçekleştirilmektedir. F1 hibrit çeşitleri melez gücü özellikleri sayesinde OP çeşitlere göre uniform ve aynı zamanda daha yüksek verim kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle de tohum firmaları genellikle F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesine yönelik ıslah programları yürütmektedirler. Bu ıslah programlarının ilk aşamasında yukarıda belirtildiği gibi yüksek derecede homozigotluk gösteren ebeveyn hatların geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu hatların üretilmesi ise kendileme yönteminin uygulanmasındaki zorluklar nedeniyle oldukça zordur. Bu nedenle de yüksek derecede homozigot ebeveyn hatların üretilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## **1.2 Katlanmış Haploid (DH) Soğan Bitkilerinin Üretimi**

Birçok bitki türünde saf bitkilerin üretimine imkan sağlayabilen katlanmış haploid (DH) bitki üretim teknikleri bulunmaktadır (Dunwell 2010, Germana 2011). Haploid bitkiler erkek ve dişi hücrelerden üretilebilirler. Bitki türlerinde en yaygın kullanılan haploid bitki üretim teknikleri gelişmemiş polen (androgenesis) ve dişi yumurta hücresinden (ginogenesis) embriyo uyartımına dayalıdır. Soğan türünde yapılan androgenesis denemelerinde başarı elde edilememiştir (Keller ve Korzun 1996). Bu bitki türünde haploid embriyo eldesi için ginogenesis tekniği kullanılır. İlk başarılı ginogenik soğan bitkileri eldesi 30 yıl kadar önce üç farklı araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Muren 1989, Champion ve Alloni 1990, Keller 1990). İlk ginogenesis çalışmalarında araştırmacılar gelişmemiş ovul, ovarı ve tüm çiçek tomurcuklarını farklı uyartım ortamlarında kültüre almışlardır. Elde edilmelerinin

zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle ovul ve ovarı eksplanları yerine açmamış tüm çiçek tomurcuklarının kullanımı daha fazla tercih edilebilir. Tüm çiçek kültürünün soğan ginogenesi çalışmalarında başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Bohanec ve Jakse 1999, Alan ve diğ. 2003, Anandhan ve diğ. 2014). Tüm tomurcuk kültürü yönteminin diğer önemli bir *Allium* türü olan pırasa (*A. ampeloprasum* L.) ile yapılan ginogenesis çalışmalarında da başarılı olduğu gösterilmiştir (Alan ve diğ. 2016).

Biyoteknolojik bir uygulama olarak kabul edilen DH üretim teknolojisi ile tamamen homozigot soğan bitkilerinin üretilmesi mümkün olabilmektedir (Alan ve diğ. 2004). DH soğan bitkilerinin üretilmesi yıllarca tekrarlanan kendilemeler yoluyla genetik olarak saf hatlar elde edilmesi işlemine gerek kalmaz (Bohanec 2002). Kendine verimli, yüksek verim ve kalite özelliklerine sahip DH bitkiler direkt olarak ticari çeşit olarak üretimde kullanılacakları gibi heterozis yaratma özelliklerinden yararlanmak amacıyla F1 hibrit çeşitlerin üretiminde de kullanılabilirler (Hyde ve diğ. 2012).

DH tekniği ile üretilen soğan hatları tüm karakterler için saflaştırılır ve bu bitkilerde kendileme depresyonu gibi istenmeyen özellikler gözlenmez (Alan ve diğ. 2004). DH hatların ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için, uygulanacak protokollerin genotipten etkilenmemesi, çok sayıda haploid bitki eldesine olanak sağlaması, bitkilerin diploidizasyonunun ve yeniden bol miktarda tohum üretebilmelerinin sağlanması gereklidir. Tercih edilen agronomik özelliklere sahip DH soğan hatları tescillenerek tohum üretimi amacıyla kullanılabilir. DH teknolojisinin ülkemize uygun soğan genotiplerinden üstün verim ve kaliteli özelliklere sahip yeni çeşitlerin üretiminde kullanılabilmesi için projede kullanılacak materyallerin ginogenesis uyartımına uygunluklarının belirlenmesi gerekmektedir. Haploid bitkilerin yeniden diploid seviyesine ve tohum üretebilir duruma getirilebilmeleri gerekmektedir (Alan ve diğ. 2004). DH tekniklerinin soğan ıslahı çalışmalarına entegre edilebilmesi durumunda genetik olarak uniform soğan hatlarının çok kısa sürede üretilmesi mümkün olacaktır. DH tekniğiyle tamamen saf soğan genotiplerinin üretimi iki yıl gibi kısa bir sürede sağlanabilir (Alan ve diğ. 2004). Soğanda haploid bitki eldesinde kullanılacak olan çiçek tomurcuklarının ginogenesis uyartımına uygun gelişme safhalarında olması gerekir. Ginogenesis

uyartımı için en uygun çiçek tomurcuğu gelişme döneminin, embriyo keseciğinin olgunlaşmış olduğu, antesisten 3-5 gün önceki dönem olduğu düşünülmektedir (Musial ve diğ. 2001).

Soğanda ginogenesis uyartımı için farklı medyaların kullanılması önerilmiştir. Yayınlanan çalışmalarda B5 (Gamborg ve diğ. 1968), BDS (Dunstan ve Short 1977) ve MS (Murashige ve Skoog 1962) medyalarının ginogenesis uyartımı için uygun oldukları bilinmektedir (Kaska 2013). Alan ve diğ. (2004) çiçek tomurcuklarının modifiye edilmiş BDS (Bohanec ve Jakse 1999) içeren petri kaplarında kültüre alınmasından en az iki ay sonra ginogenik bitkiciklerin ortaya çıkmaya başladığını ve bu bitkiciklerin sağlıklı büyüebilmeleri için EM (Jakse ve diğ. 2003) medyası içeren tüplere transfer edilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir. Soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına verdikleri karşılık çok farklı olabilmektedir (Geoffriau ve diğ. 1997, Bohanec ve Jakse 1999, Michalik ve diğ. 2000, Alan ve diğ. 2004, Khar ve diğ. 2018). Elde edilen ginogenik bitkiciklerin bir kısmı büyümeye devam eder ve normal gelişim gösterirler. Ginogenesis tekniğinin soğan ıslahında uygulanabilmesi için haploid bitkilerden DH bitkilerin üretilmesi gerekmektedir. Ginogenik soğan bitkileri çoğunlukla haploid kromozom sayısına sahiptirler. Bu bitkiler arasında kendiliğinden diploid hale dönüşebilen bitkilerin oranı çok düşüktür (Bohanec 2002, Alan ve diğ. 2004, 2007). Ginogenik bitkilerin çoğu kromozom katlaması uygulaması yapılmazsa haploid olarak kalırlar ve tohum üretmedikleri için çoğaltılamazlar.

Ginogenik bitkilerde kromozom katlaması uygulamaları genellikle *in vitro* olarak yapılır çünkü soğan bitkileri büyüdükçe antimitotik kimyasalların meristematik bölgelere ulaştırılabilmesi zorlaşır. Antimitotik kimyasal uygulamaların yeni elde edilmiş ginogenik bitkiciklerde yapılması büyük oranda kayıplara neden olmaktadır (Jakse ve diğ. 2003, Grzebelus ve Adamus 2004). Bu yöntemlerle elde edilen diploidlerin ne kadarının kendiliğinden, ne kadarının yapılan uygulamadan kaynaklandığı belli değildir. Plodi seviyesi tespiti yapılmamış embriyo ve bitkicikler arasında haploid ve diploid hücreler bulunduran miksoploidler ve kendiliğinden (spontan) diploid hale gelmiş bitkiler olabilir (Alan ve diğ. 2003, 2004, 2007). Bu nedenle kromozom katlamasına tabi tutulacak bitkilerin haploid seviyede olduğunun



kesin olarak bilinmesi gerekir. Alan ve diğ. (2007) 3-4 gerçek yapraklı haploid bitkilerden elde edilen bazal eksplantlar kullanılarak sıvı ortamda antimitotik kimyasallarla (APM ve Kolhisin) yapılmasının bitki kayıplarını azalttığını ve rejenere olan bitkilerin çoğunluğunun tohum üretebildiği gösterilmiştir (Alan ve diğ. 2004, 2007).

### **1.3 Tezin Amacı**

Soğanında içinde bulunduğu *Allium* cinsinde haploidizasyon uygulaması ginogenesis uyartımı yolu ile yapılmaktadır. Soğanda saf hatların üretilmesi çok uzun yıllar alacağı için soğan ıslah materyallerinde ginogenesis temelli haploidizasyon teknolojisi uygulaması ile birkaç yıl içinde genetik olarak tamamen saf olan hatlar üretilebilir. Bu nedenle PAÜ BİYOM soğan ıslah programında kullanılan kırmızı başlı 10 genotipin ginogenesis temelli haploidizasyon uygulamasına gösterecekleri cevabın tespit edilmesi önem arz etmektedir. Bu projenin amacı PAÜ BİYOM soğan gen havuzunda yer alan kırmızı baş rengine sahip soğan hatlarında haploid bitki üretim potansiyelinin araştırılmasıdır. Çalışmada üretilmiş olan bitkiler sitolojik ve mormofolojik olarak karakterize edilmiştir. Bu çalışma ile soğan ıslah programında yer alan Türkiye'ye adapte olmuş soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına cevap verdikleri gösterilmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Bitki Materyali

Projede PAU BİYOM tarafından ıslah materyali olarak geliştirilen dokuz ıslah hattı ve bir ticari soğan hattı (Tablo 1) çiçek tomurcuğu donörü olarak kullanılmıştır. Donör soğan hatlarına ait başlar bir yıl önce arazide üretilmiştir. Soğan başları soğuk depoda üç ay kadar tutulduktan sonra Aralık ayında yeniden seraya aktarılmışlardır. Yeniden süren ve yapraklanan başlarda Mart ayı başlarında çiçek sapları oluşmaya başlamıştır. Umbeller Nisan-Mayıs aylarında ~30 cm çiçek sapıyla kesilerek laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarda umbellerde bulunan açılmış çiçekler manuel olarak uzaklaştırılmıştır. Ginogenesis uyartımı deneylerinde antesis öncesi aşamada bulunan açmamış tüm çiçek tomurcukları kullanılmıştır.

**Tablo 1:** Donör soğan hatlarının genel özellikleri

Genotip <sup>a</sup>	Tat	Baş Kabuğu Rengi	Baş Şekli
BPE <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
BPE6 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
BPE10 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
BPEPAU3-7 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
BPEPAU3-20 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
PAU5 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
PAU6 <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Uzun
Çanakkale Kırmısı <sup>b</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
Red Baron <sup>c</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak
Burgaz <sup>c</sup>	Ac1	Kırmızı	Basık yuvarlak

<sup>a</sup>Çalışmada kullanılan çiçek tomurcuğu donörlerinin tümü OP genotiplerdir

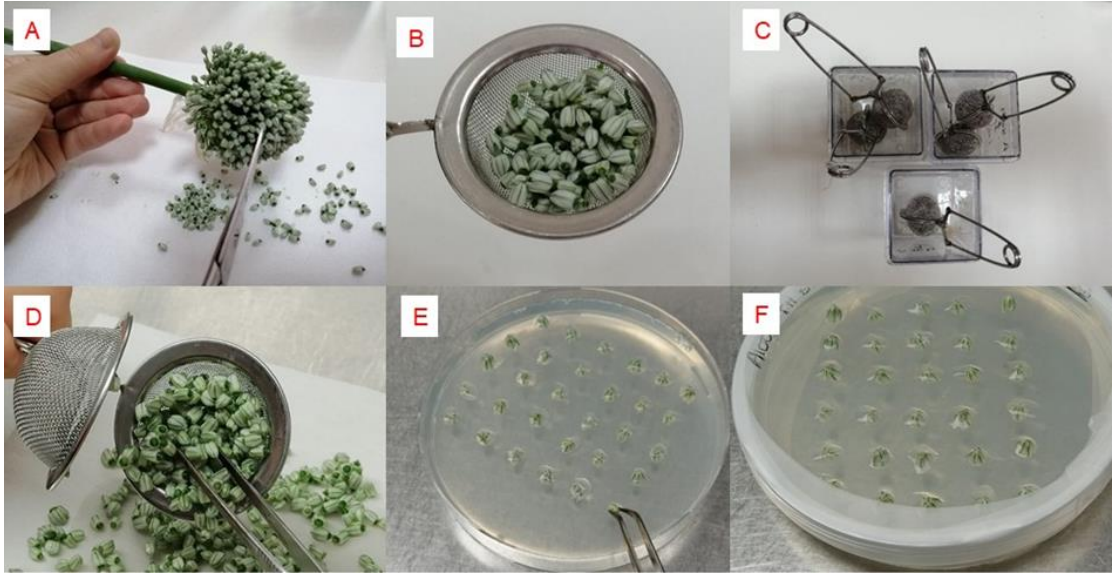
<sup>b</sup>Seleksiyon materyali

<sup>c</sup>Standart çeşit

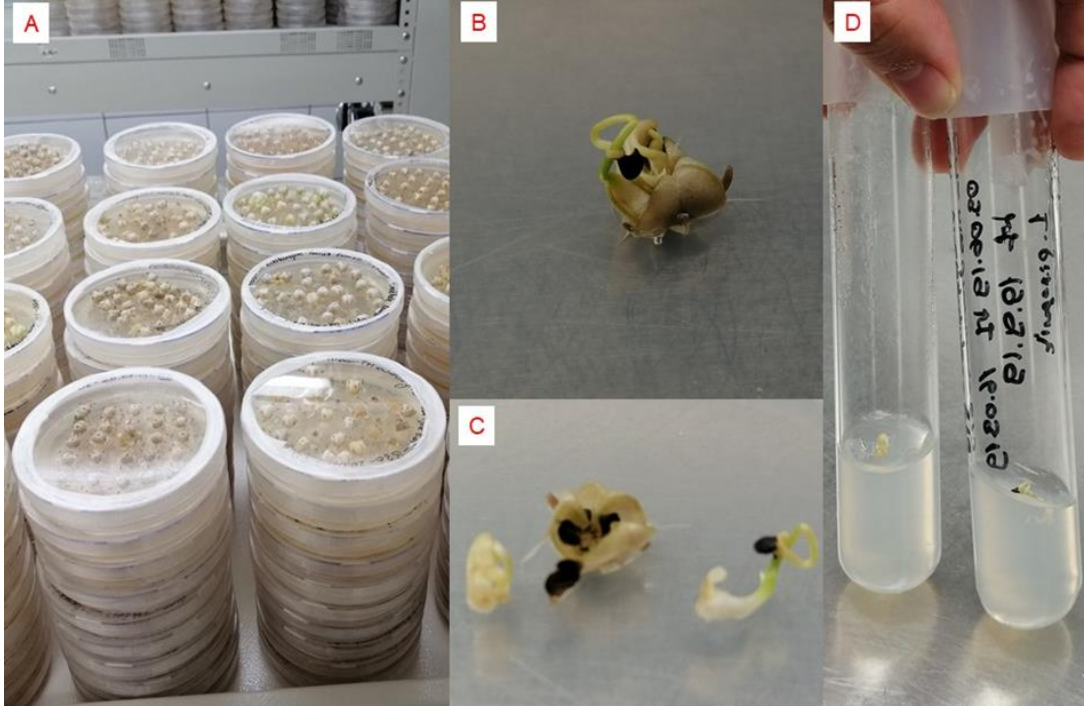
### 2.2 Çiçek Tomurcuklarının Kültüre Hazırlanması

Bu dönemde çiçeklerin % 20-30 kadarı antesis aşamasında olan umbeller toplanıp etiketlenerek laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarda açılmış çiçeklerin çıkarılmasından sonra sadece olgunlaşmamış çiçeklerin bulunduğu umbeller,

saplarının bir kısmı suda kalacak şekilde kavanozlara yerleştirilmişlerdir Antesis aşamasına ulaşması için birkaç gün gereken çiçek tomurcukları (>3 mm) bir makas yardımıyla kesilip yüzey sterilizasyonu için içinde %70'lik etanol bulunan kavanozda 30 saniye kadar tutulmuş ve daha sonra bu tomurcuklar içinde sterilizasyon solusyonu (%15 clorax+%0.1 Tween-20) bulunan Magenta kaplarına aktarılmıştır (Şekil 1A-C). Tomurcuklar sterilizasyon solüsyonunda 30 dakika kadar sürekli olarak karıştırılmıştır. Bu işlem sonrasında tomurcuklar steril su ile üç defa yıkayıp durulanmıştır. Steril tomurcuklar steril kurutma kağıtları üzerine serilerek kurumaları sağlanmıştır (Şekil 1D). Tüm sterilizasyon işlemleri steril kabinde ve steril ekipman ile yapılmıştır.



**Şekil 1:** Soğan tomurcuklarının uyartım kültürüne ekilmeleri. **A.** Tomurcukların kesilmesi. **B.** Tomurcukların çay süzекlerine doldurulmaları. **C.** Yüzey sterilizasyonu işlemi. **D.** Sterilize edilmiş olan tomurcuklar. **E.** Tomurcukların uyartım ortamına ekilmeleri. **F.** Parafilm ile sarılmış tomurcuk kültürü.



**Şekil 2:** Soğan tomurcuklarında ginogenesis cevabı. **A.** Tomurcuk kültürleri. **B.** Ginogenesis cevabı veren soğan tomurcuğu. **C.** Bir tomurcuktan üretilen iki ginogenik bitkicik. **D.** Tüplere aktarılmış ginogenik bitkicikler.

### 2.3 Ginogenesis Uyartımı ve Ginogenik Bitkilerin Elde Edilmesi

Ginogenesis uyartım kültürleri Alan ve diğ. (2004) tarafından yayınlanmış olan protokole göre oluşturulmuşlardır. Kültürlerin büyütme koşulları aynı referansta verilmiş olan protokole göre ayarlanmıştır. Uyartım uygulaması için 20 ml modifiye BDS (Dunstan ve Short 1977) içeren 15x90 mm'lik Petri tabaklarına içeren 30'ar çiçek tomurcuğu konulmuştur (Şekil 1E). Ginogenesis uyartım deneylerinde toplam 42990 bin açmamış tüm çiçek tomurcuğu uyartım ortamına ekilmiştir. Oluşturulan tüm kültür tabakları sterilizasyonun korunması amacıyla iki sıra parafilm ile sarılmıştır (Şekil 1F). Soğan ginogenesis uyartım kültürleri 18 saat ışık/25° C ve 6 saat karanlık/17° C olarak ayarlanmış büyütme odasına yerleştirilmiş ve haftalık olarak gözlemlenmişlerdir (Şekil 2A). Elde edilen ginogenik bitkiciklerin çıkış tarihleri kayıt altına alınmıştır. Uyartıma cevap veren tomurcuklar 20 ml EM (Jakse ve diğ., 2003) içeren Petri tabaklarına transfer edilmişlerdir (Şekil 2B). Gelişerek tomurcuklardan dışarı çıkan ginogenik bitkicikler 15 ml EM içeren 50 ml'lik cam tüplere transfer edilmişlerdir (Şekil 2C, D).

## 2.4 Ginogenik Soğan Bitkilerinde Ploidi Seviyesi Testi

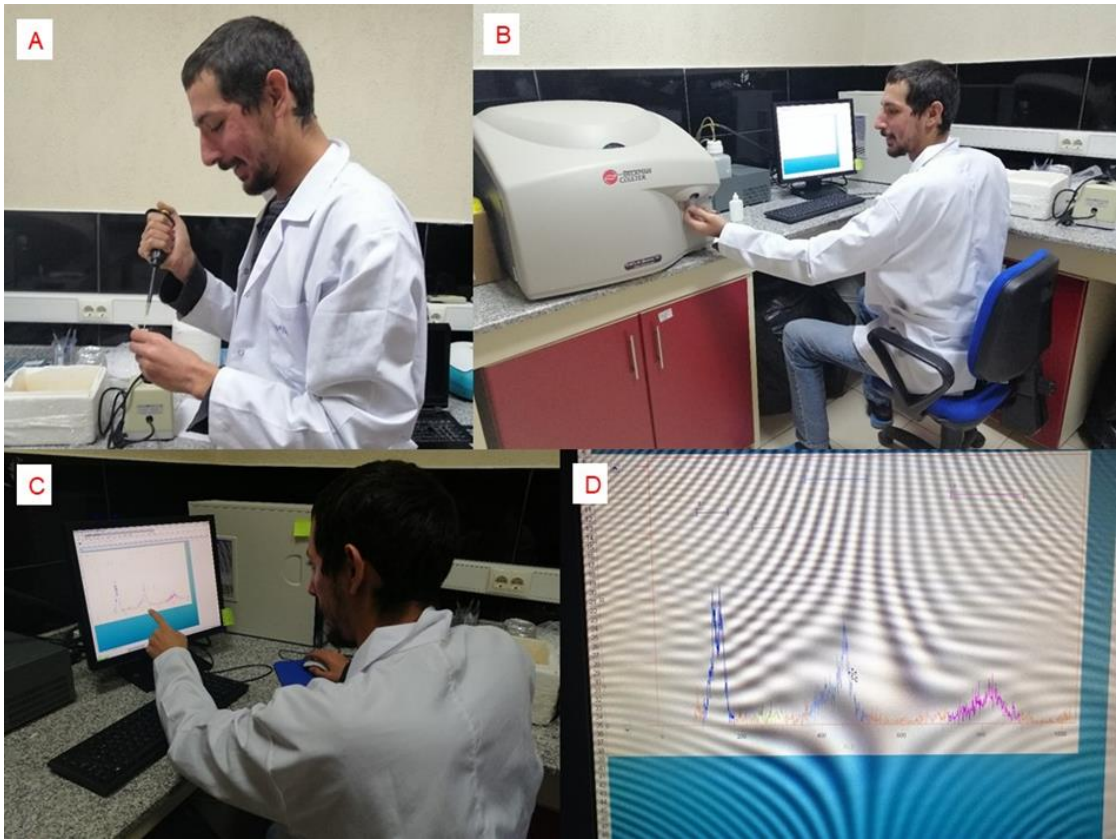
Bu projede elde edilmiş olan ginogenik bitkilerde hücre çekirdeği DNA miktarı ve ploidi tespiti Alan ve diğ. (2016) tarafından geliştirilen Flow Sitometri (FCM) analizi protokolüne göre yapılmıştır. Analiz için içsel kontrol olarak arpa (*Hordeum vulgare*) fidelerinden alınan yaprak dokusu kullanılmıştır. Birkaç yapraklı ginogenik soğan bitkilerinden 50 mg kadar yaprak örnekleri alınıp ıslak buz kutusunda tutulmuş ve 65x15 mm Petri kaplarına konmuştur. Her soğan örneğinin bulunduğu Petri tabağına 10 mg kadar arpa yaprağı eklenmiştir. Örneklerin bulunduğu Petri tabaklarına 1,5 ml nükleer DNA izolasyon (NIB) solusyonu eklenmiş ve soğan ve arpa yaprakları bir jilet ile ince şeritler halinde kesilmiştir. 45 µm'lik bir naylon filtreden geçirilen çekirdekler Eppendorf tüplerinde toplanmıştır. Tüplerdeki örnekler propidium iodide (PI) ile boyandıktan sonra flow sitometri ile analiz edilmişlerdir (Şekil 3A-C). Bu çalışmada kullanılan donör soğan genotiplerinin ( $2n=2x=18$ ) çekirdek DNA miktarı ~32 pg DNA/hücre olarak hesaplanmıştır.

## 2.5 Ginogenik Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılarak Büyütülmeleri

FCM analiz sonuçlarına göre spontan diploid ve miksploid oldukları tespit edilen bitkiler dış ortama aktarılmıştır. Tüplerden çıkarılan bitkilerin kök bölgeleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra bitkiler steril torf ve perlit (2:1) karışımı ile doldurulmuş olan saksılara dikilmişlerdir (Şekil 4A, B). Bu saksılar naylon poşetler ile kapatıldıktan sonra 18 saat aydınlık, 6 saat karanlık ve sürekli 18° C'ye ayarlanmış olan büyütme kabinine alınmışlardır (Şekil 4C). Büyütme kabininde naylon poşetlerde küçük delikler açılarak bitkilerin aklimize olmalarına yardım edilmiştir. Transferden yaklaşık iki hafta sonra naylon poşetler tamamen kaldırılmış ve bitkiler seraya aktarılmışlardır (Şekil 4D).

## 2.6 İstatistiksel Analiz

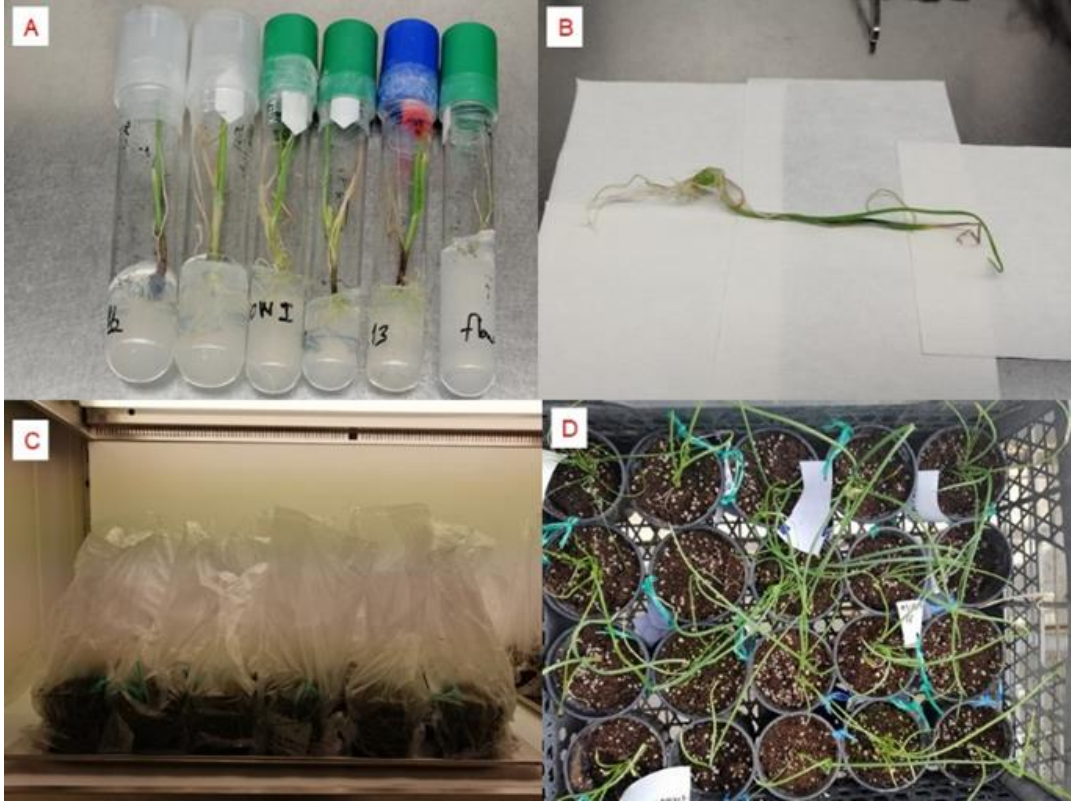
Tez çalışmasında elde edilecek verilerin istatistiksel analizleri ANOVA ile yapılacaktır. Ginogenik bitki rejenerasyonu oranları kültürdeki çiçek tomurcuğu sayısına göre hesap edilecektir. Aynı medya kompozisyonuna sahip ve aynı genotipten elde edilmiş eksplantlarla oluşturulmuş Petriler bir replikasyon ünitesi olarak kabul edilecektir. Ginogenesis deneylerinde elde edilen ortalamalar arasındaki farklılıkların Tukey ( $p=0.05$ ) ile kıyaslaması yapılmıştır.



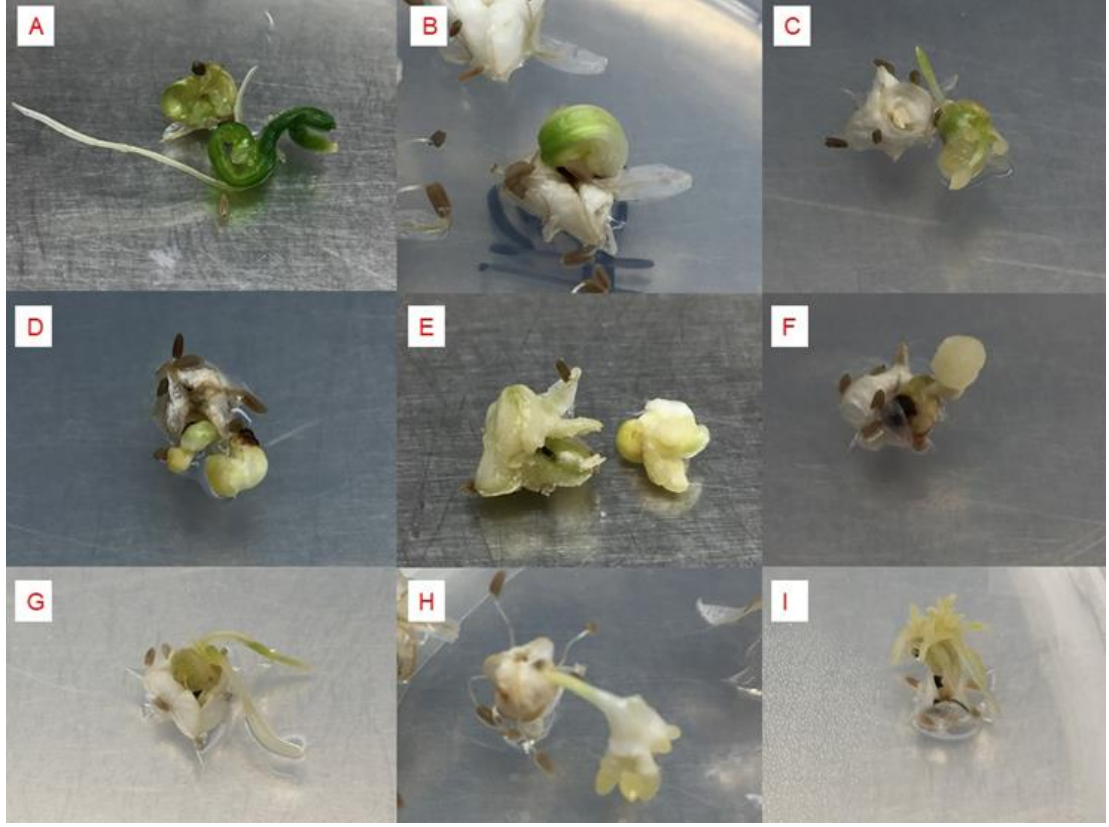
**Şekil 3:** Ginogenik soğanlarda flow sitometri ile ploidi tespiti. **A.** Çekirdek örneklerinin PI ile boyanması. **B.** Örneklerin flow sitometriye yerleştirilmesi. **C.** Örneklerin analizi. **D.** Diploid bir bitkiye ait flow histogramı.

### 3. BULGULAR

Açmamış çiçek tomurcukları ile oluşturulmuş olan ginogenesis uyartım kültürleri hafta da iki kez gözlemlenmiştir. Kültüre alındıktan birkaç gün sonra tomurcuklar açmıştır. İki hafta içerisinde çiçeklerin ovaryum büyüklükleri birkaç kat artmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık üç ay sonra ginogenik bitkicikler çiçeklerin yumurtalık kısımlarından dışarıya doğru çıkmaya başlamışlardır. Bu süre içinde petri tabaklarında görülen bakteri ve mantar kontaminasyonları kültür odasından uzaklaştırılmıştır.



**Şekil 4:** Ginogenik soğan bitkilerinin dış ortama aktarımı. **A.** Tüpte bulunan ginogenik soğan bitkileri. **B.** Tüpten çıkarılmış bir ginogenik soğan. **C.** Steril torf ve perlit (2:1) ile doldurulmuş saksılara aktarılış ve naylon poşet ile kapatılmış bitkiler. **D.** Dış ortama alıştırmış ve seraya alınmış ginogenik soğan bitkileri.



**Şekil 5:** Bitkiye dönüşemeyen ginogenik bitkicikler **A.** Vitrifiye bitkicik. **B.** Yapışık bitkicik. **C.** Kalınlaşmış kök. **D.** Dumura uğramış bitkicik. **E.** Dumura uğramış bitkicik. **F.** Kök ve sürgünde kallus. **G.** Dumura uğramış sürgün. **H.** Kalınlaşmış kök. **I.** Vitrifiye köklere sahip bitkicik.

### 3.1 Soğan Genotiplerinin Ginogenesis Uyarımına Verdikleri Cevaplar

Bu tez çalışmasında 10 kırmızı başlı soğan genotipine (BPE, BPE6, BPE10, BPEPAU3-7, BPEPAU3-20, PAU5, PAU6, Çanakkale Kırmısı, Red Baron, Burgaz) ait ~43 bin çiçek tomurcuğu uyarım ortamına ekilmiştir. Çalışmada toplam 267 (% 0,63) tomurcuk ginogenesisine cevap vermiş ve bunlardan 274 (% 0,64) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 2). Ginogenik bitkiciklerin ~% 42'si normal gelişim gösterirken geri kalanların anormal vejetatif gelişim gösterdikleri bitkiye tespit edilmiştir. Denemelerinde yer alan 10 genotipten dokuzunda cevap elde edilmiştir. En yüksek ginogenesis cevabı (% 1,9 bitkicik) PAU6 genotipine ait tomurcuklardan oluşturulan kültürlerde elde edilmiştir. BPE10 genotipinden uyarım ortamına konan ~3000 tomurcuktan ise ginogenesis cevabı alınamamıştır.



BPE genotipine ait çiçek tomurcuklarından beş (% 0,30) tanesi ginogenesis cevap vermiştir. Üretilen beş ginogenik bitkicikden dördü (% 0, 24) bitki haline gelirken bir (% 0,06) bitkicik anormal gelişim göstermiştir. Ayrıca bu genotipe ait tomurcukların bazal kısımlarından gelişen beş adet somatik bitki elde edilmiştir.

BPE6 genotipine ait kültürlerde 12 (% 0,31) adet tomurcukta ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Elde edilen 16 (% 0,41) bitkicikten beş (% 0,13) adedi bitki halini almış ve 11 (% 0,28) bitkicik anormal gelişim göstermiştir.

BPEPAU3-7 genotipine ait tomurcukların 20 (% 0,30) adedinde ginogenik cevap gözlenmiştir. Bu kültürlerden elde edilen 20 (% 0,30) bitkicikten sekiz (% 0,12) adedi bitki haline dönüşürken 12 (% 0,18) adedi anormal olarak gelişmiş ve bitki formuna geçememiştir. Ayrıca bu kültürlerden 11 adet somatik bitki üretilmiştir.

BPEPAU3-20 genotipinden alınan tomurcuklarla kurulan uyartım denemelerinde tomurcuklardan beşinde (% 0,22) cevap görülmüştür. Elde edilen beş (% 0,22) bitkicikten bir (% 0,04) adedi bitkiye dönüşmüş ve dört (% 0,18) adedi anormal gelişim göstermiştir.

PAU5 genotipinde 51 (% 0,43) tomurcukta ginogenesis cevabı gözlenmiştir. Bu tomurcuklardan 52 (% 0,44) bitkicik üretilmiştir. Bitkiciklerden 22 (% 0,18) adedi bitki olarak gelişirken 30 (% 0,25) adedinde anormal gelişim görülmüştür. PAU5 genotipine ait tomurcuklardan 11 adet somatik bitki elde edilmiştir.

PAU6 çalışmada kullanılan genotipler arasında en yükseğe ginogenesis cevabı göstermiştir. Bu genotipe ait 152 (% 1,9) tomurcuk ginogenesis cevabı göstermiştir. Cevap veren tomurcuklardan 154 (% 1,9) adet ginogenik bitkicik üretilmiştir. Ginogenik bitkiciklerin 67 (% 0,84) adedi normal gelişim göstererek bitki haline dönüşmüştür. Geri kalan 87 (% 1,09) bitkicik anormal gelişim göstermiştir.

Çanakkale Kırmısına ait tomurcuklarda ginogenesis uyartımına gösterilen cevap düşük seviyede gerçekleşmiştir. Bu genotipe ait altı (% 0,17) tomurcuk ginogenesis cevabı vermiş ve bunlardan altı (% 0,17) adet bitkicik üretilmiştir. Elde edilen bitkiciklerden beş (% 0,16) adedi bitki haline dönüşürken bir (% 0,03) adedi

anormal gelişim göstermiştir. Bu genotipten iki adet somatik bitki gelişimi gözlemlenmiştir.

Ticari bir çeşit olan Red Baron genotipine ait kültürlerden üç (% 0,33) tomurcukta cevap gözlenmiş bunlardan üç (% 0,33) bitkicik üretilmiştir. Bunlardan iki (% 0,22) adedi normal gelişim göstererek bitki formunu almıştır. Diğer bitkicik (% 0,11) ise anormal gelişim göstermiştir.

Diğer bir ticari çeşit olan Burgaz genotipine ait 13 (% 0,63) tomurcuk ginogenesis cevabı göstermiş ve bunlardan 13 (% 0,63) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bunlardan iki (% 0,22) adedi bitki haline dönüşürken 11 (% 0,53) tanesi anormal gelişim göstermiştir.

**Tablo 2:** Soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına gösterdikleri cevaplar

Donör genotip	Ekilen çiçek tomurcuğu sayısı	Cevap veren tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)	Gelişim anormalliği gösteren bitkicik sayısı (%)
BPE	1650	5 (0,30) B	5 (0,30) B	4 (0,24) AB	1 (0,06)
BPE6	3810	12 (0,31) B	16 (0,41) B	5 (0,13) B	11 (0,28)
BPE10	2910	0 B	0 B	0 B	0
BPEPAU3-7	6570	20 (0,30) B	20 (0,30) B	8 (0,12) B	12 (0,18)
BPEPAU3-20	2190	5 (0,22) B	5 (0,22) B	1 (0,04) B	4 (0,18)
PAU5	11760	51 (0,43) B	52 (0,44) B	22 (0,18) B	30 (0,25)
PAU6	7920	152 (1,9) A	154 (1,9) A	67 (0,84) A	87 (1,09)
Çanakkale Kırmısı	3210	6 (0,17) B	6 (0,17) B	5 (0,16) B	1 (0,3)
Red Baron	900	3 (0,33) B	3 (0,33) B	2 (0,22) AB	1 (0,11)
Burgaz	2070	13 (0,63) B	13 (0,63) B	2 (0,22) B	11 (0,53)
<b>Toplam</b>	<b>42990</b>	<b>267 (0,63)</b>	<b>274 (0,64)</b>	<b>116 (0,27)</b>	<b>158 (0,36)</b>

\* Farklı harfler ile ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır (Tukey, P<0,05).

**Tablo 3:** Bitki haline dönüşmüş olan ginogenik soğan bitkilerinde ploidi analizi sonuçları

Donör genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi seviyesi				
		n (%)	n+2n (%)	2n (%)	2n+4n (%)	4n (%)
BPE	2	1 (50)	-	1 (50)	-	-
BPE6	5	2 (40)	1 (20)	2 (40)	-	-
BPEPAU3-7	5	-	-	5 (100)	-	-
BPEPAU3-20	1	1 (100)	-	-	-	-
PAU5	19	12 (63,1)	1 (5,2)	5 (26,3)		1 (5,2)
PAU6	70	39 (55,7)	9 (12,8)	19 (27,1)	1 (1,4)	2 (2,8)
Çanakkale Kırmısı	5	-	1 (20)	4 (80)	-	-
Red Baron	2	2 (100)	-	-	-	-
Burgaz	3	2 (66,6)	1 (33,3)	-	-	-
Toplam	112	59 (52,6)	13 (11,6)	36 (32,1)	1 (0,8)	3 (2,6)

### 3.2 Ginogenesis Uyartım Uygulamasından Elde Edilen Soğan Bitkilerinin Ploidi Seviyeleri

Çalışmada çiçek tomurcuğu donörü olarak kullanılan ve diploid ploidi seviyesine ( $2n=2x=16$ ) sahip oldukları bilinen soğan genotiplerinin flow sitometri ile yapılan analizlerinde  $\sim 32$  pg DNA/2C çekirdek DNA'sına sahip oldukları tespit edilmiştir. Ginogenesis tekniğiyle elde edilen bitkilerde yapılan analizlerde bu bitkiler arasında ploidi farklılıkları olduğu görülmüştür. Ginogenik bitkiler arasında haploid ( $\sim 16$  pg DNA/2C), diploid ( $\sim 32$  pg DNA/2C), triploid ( $\sim 48$  pg DNA/2C), tetraploid ( $\sim 60$  pg DNA/2C), haploid ve diploid hücreler için miksoyploid ve diploid ve tetraploid hücreler için miksoyploid bitkiler tespit edilmiştir. Ginogenesis cevabı gösteren tomurculardan elde edilen bitkiciklerin bir bölümü normal gelişim gösterip bitki haline dönüşürken bir bölümüde anormal gelişim göstermiştir. Bu gelişimsel farklılığın nedenlerini araştırmak amacıyla bir FCM analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen ve normal gelişim gösteren 112 ginogenik bitkide FCM analizi yapılmıştır (Tablo 3). Bu bitkilerin 59 (% 52,6) adeti haploid, 36 (% 32,1) adeti diploid, üç (% 2,6) adeti tetraploid, 11 (% 11,6) adeti haploid ve diploid hücreler bulunduran miksoyploid (n+2n) ve bir (% 0,8) adetide diploid ve tetraploid hücreler bulunduran miksoyploid (2n+4n) olarak tespit edilmiştir. Normal gelişim gösteremeyen ginogenik bitkiciklerde yapılan FCM analizinde 144 örnek test

edilmiştir (Tablo 4). Bunlardan 69 (% 47,9) adetinin diploid, 58 (% 40,2) adetinin diploid, üç (% 2) adetinin triploid, 11 (% 7,6) adetinin  $n+2n$  ve üç (% 2) adetinin  $2n+4n$  olduğu tespit edilmiştir.

### 3.3 Dış Ortama Aktarılan Ginogenik Bitkiler

Çalışmada elde edilen BPE6, BPE3MOR7, PAU3MOR7, PAU5, PAU6 ve Çanakkale Kırmısı genotiplerine ait ginogenik bitkiler dış ortama aktarılmış ve gelişimleri takip edilmiştir (Tablo 5 ve 6). Bu bitkiler hasat aşamasında resimlenmişlerdir (Şekil 6-8). BPE6 genotipinden üretilen BPE6G1 bitkisi 18 g ağırlığında yuvarlak bir kırmızı baş oluşturmuştur. Kurutulan başın ağırlığı 6 g olarak ölçülmüştür. BPE3MOR7 donöründen elde edilen bir bitki olan BPE3MOR7G1 172 g ağırlığında yuvarlak bir baş oluşturmuştur. Bu bitkinin kurutulan başı ağırlığı 82 g'dır. PAU3MOR7 donöründen elde edilen PAU3MOR7G1 bitkisi 20 g'lık bir yuvarlak baş oluşturmuştur. Kurutulan baş 10 g olarak ölçülmüştür. PAU5 donöründen elde edilen PAU5G1 bitkisi 100 g'lık bir yuvarlak baş oluşturmuştur. Bu baş kurulunca 60 g olarak tartılmıştır. PAU6 donöründen elde edilen 14 (PAU6G1-14) bitkinin baş ağırlıkları 1 ile 92 g arasında değişiklik göstermiştir. Bu gruptaki tüm başların uzun kırmızı olduğu tespit edilmiştir. Kurutma işme sırasında 2 ginogenik (PAU6G7 ve G9) bitkiye ait başlar çürüdükleri için kaybedilmişlerdir. Geri kalan 14 ginogenik bitkiye ait kurutulmuş başların 0.5 ile 58 g arasında olduğu tespit edilmiştir. Çanakkale Kırmısı donöründen elde edilen iki (Çanakkale KırmısıG1 ve G2) bitki seda büyütülmüştür. Bu ginogenik bitkilerin bir tanesi 10 g ve üç baş oluşturan diğeri ise ortalama olarak 111,3 g ağırlığında uzun ve kırmızı başlar oluşturmuştur. Kurutulan başların ağırlıkları 5 ve 46,6 g'dır.

**Tablo 4:** Anormal gelişim gösteren ginogenik soğan materyallerinde ploidi analizi sonuçları

Donör genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi seviyesi				
		n (%)	n+2n (%)	2n (%)	2n+4n (%)	3n (%)
BPE	1	-	-	1 (100)	-	-
BPE6	11	4 (36,3)	-	7 (63,6)	-	-
BPEPAU3-7	10	1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)	-
BPEPAU3-20	2	1 (50)	-	1 (50)	-	-
PAU5	30	18 (60)	2 (6,6)	10 (33,3)	-	-
PAU6	78	39 (50)	4 (5,1)	30 (38,4)	2 (2,5)	3 (3,8)
Çanakkale Kırmısı	1	-	-	1 (100)	-	-
Red Baron	1	1 (100)	-	-	-	-
Burgaz	10	5 (50)	2 (20)	3 (30)	-	-
Toplam	144	69 (47,9)	11 (7,6)	58 (40,2)	3 (2)	3 (2)

**Tablo 5:** Ginogenik bitkilerin yaş hallerinin karakteristik özellikleri

GENOTİP	Baş Sayısı	Yaş Ağırlık (g)	Tam Boy Uzunluğu (cm)	Yaprak Boyu (cm)	Yaprak Eni (cm)	Yaprak Sayısı	Baş Boyu (cm)	Baş Çapı (cm)
BPE6 G1	1	18	27	19	0,6	3	2,9	2,7
BPE3 MOR7 G1	1	172	84	65	1	7	8,3	5,9
PAU3 MOR7 G1	1	20	31	24,5	0,7	5	3	2,3
PAU5 G1	1	100	69	54	1,2	6	5,4	5,3
PAU6 G1	1	1	24	16	0,1	2	2,8	1
PAU6 G2	1	84	67	52	1	6	6,5	4,4
PAU6 G3	1	18	23	14	1	2	3,5	2,4
PAU6 G4	1	90	61	49	0,8	5	7,5	3,9
PAU6 G5	1	24	35	25	0,9	3	3,6	2,7
PAU6 G6	1	42	53	39	0,7	6	5,8	2,9
PAU6 G7	1	10	39	28	0,4	4	3,8	1,8
<sup>a</sup> PAU6 G8	2	6	38	28	0,4	3	4,6	1,8
PAU6 G9	1	12	38	29	0,4	3	3,9	1,9
PAU6 G10	1	92	71	56	1,1	5	6,7	4,5
PAU6 G11	1	86	76	55	1,3	8	1,4	3,3
PAU6 G12	1	24	66	50	8,6	3	7	2,9
PAU6 G13	1	92	58	45	1,1	6	6,2	4,3
PAU6 G14	1	30	44	33	0,3	4	5,7	2,8
Çanakkale Kırmısı G1	1	10	-	-	-	-	7,9	2,2
<sup>b</sup> Çanakkale Kırmısı G2	3	111,3	94	72	1,5	8	5,4	5,7

<sup>a</sup>İki başın ortalama değerleri alınmıştır.

<sup>b</sup>Üç başın ortalama değerleri alınmıştır.

**Tablo 6:** Ginogenik bitkilerin kuru hallerinin karakteristik özellikleri

<b>GENOTİP</b>	<b>Baş Sayısı</b>	<b>Baş Ağırlığı (g)</b>	<b>Baş Boyu (cm)</b>	<b>Baş Çapı (cm)</b>	<b>Baş Rengi</b>	<b>Baş Özelliği</b>
BPE6 G1	1	6	2,8	2,4	Kırmızı	Yuvarlak
BPE3 MOR7 G1	1	82	5,5	5,1	Kırmızı	Yuvarlak
PAU3 MOR7 G1	1	10	1,8	1,4	Kırmızı	Yuvarlak
PAU5 G1	1	60	1,2	6	Kırmızı	Yuvarlak
PAU6 G1	1	0,5	2	0,5	Kırmızı	Uzun
PAU6 G2	1	58	5,1	4,3	Kırmızı	Uzun
PAU6 G3	1	6	2,9	2,1	Kırmızı	Uzun
PAU6 G4	1	50	5,8	3,5	Kırmızı	Uzun
PAU6 G5	1	8	3	2,3	Kırmızı	Uzun
PAU6 G6	1	22	4,9	2,4	Kırmızı	Uzun
PAU6 G8	1	5	2,65	1,7	Kırmızı	Uzun
PAU6 G10	1	52	6,8	4,1	Kırmızı	Uzun
PAU6 G11	1	40	7,5	3,1	Kırmızı	Uzun
PAU6 G12	1	14	5,3	2,4	Kırmızı	Uzun
PAU6 G13	1	40	5,9	3,9	Kırmızı	Uzun
PAU6 G14	1	4	3,8	2,4	Kırmızı	Uzun
Çanakkale Kırmısı G1	1	5	3,5	1,9	Kırmızı	Uzun
<sup>a</sup> Çanakkale Kırmısı G2	3	46,6	4,46	4,3	Kırmızı	Uzun

<sup>a</sup>Üç başın ortalama değerleri alınmıştır.



Şekil 6: PAU3-7 genotipinden (A, B) üretilmiş ginogenik bitkiler



Şekil 7: PAU6 genotipinden (A-H) üretilmiş ginogenik bitkiler



**Şekil 8:** PAU5 (A) ve Çanakkale Kırmısı (B) genotiplerinden üretilmiş ginogenik bitkiler



## 4. TARTIŞMA

### 4.1 Haploid ve DH Soğan Bitkilerinin Üretilmesi

Soğan dünyanın her yerinde üretimi ve tüketimi yapılan önemli bir türdür. Tüm dünyada soğan tüketimi artma eğilimindedir. Gelişmiş ülkelerde F1 hibritlerle üretim yaygın iken gelişmekte olan ülkelerde çoğunlukla açık tozlanan standart çeşitler ve çiftçi çeşitleri ile soğan üretimi yapılmaktadır. Farklı yetiştirme ortamlarına adaptasyon kabiliyeti yüksek, üstün verim, kalite, biyotik ve abiyotik streslere dayanım özelliğine sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde büyük zorluklarla karşılaşmaktadır. Soğan ıslahının en zor kısmı genetik olarak saflaşmış çeşitlerin azlığıdır. Hayat döngüsünün en az iki yıllık olması, yüksek oranda yabancı tozlama eğiliminin olması ve çok büyük genoma sahip olması klasik kendileme yolu ile saf hatların üretimini önündeki önemli engellerdir. Diğer bir engelde soğanın şiddetli derecede kendileme depresyonu göstermesidir. Bu problemler nedeni ile kendileme ile tamamen saf soğan hatlarının üretilmesi mümkün olamamaktadır.

Yeni soğan çeşitlerinin geliştirilmesinin çok uzun zaman alması bitki ıslahı ve biyoteknolojisi alanında uzmanlaşmış araştırma gruplarının ilgisini çekmektedir. Soğanda ginogenesis temelli haploidizasyon ve bunu takiben kromozom katlaması yolu ile tamamen saf hatların üretilmesinin mümkün olduğu farklı araştırma grupları tarafından gösterilmiştir (Campion ve diğ. 1995, Jakse ve diğ. 2003, Alan ve diğ. 2004, Grzebelus ve Adamus 2004, Fayos ve diğ. 2015). Avrupa kökenli soğan genotipleri ile yapılan çalışmalarda da ginogenesis verilen cevapların düşük ve orta seviyede oldukları rapor edilmiştir. Michalik ve diğ. (2000) tarafından yayınlanan çalışmada kullanılan 30 genotipten dokuzunun hiç cevap vermediği, diğer genotiplerin % 0,2 ile 10 arasında cevap gösterdikleri belirtilmiştir. Elde ettikleri ginogenik yapıları embriyo olarak tanımlayan araştırmacılar bunların ne kadarının ginogenik bitkiler haline dönüştüğünü belirtmemişlerdir. Diğer Avrupa kaynaklı soğan genotiplerinde de benzer ginogenesis cevapları görüldüğü rapor edilmiştir. Fayos ve diğ. (2015), tarafından yapılan çalışmada İspanyol çeşitlerinin % 0,27 ile 2,09 arasında ginogenesis cevabı verdikleri belirtilmiştir. Çalışmada yer verilen

İspanyol genotiplerden elde edilen ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranları % 0 ile 33,3 arasında değişiklik göstermiştir. Bohanec ve Jakse (1999) Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya kaynaklı 39 soğan genotipi ile yaptıkları çalışmada soğanların genetik ve coğrafik kökenlerinin ginogenesis cevabı üzerinde etkisi olduğu sonucuna varmıştır. Araştırmacılar 34 genotipe ait tomurcuklarda % 0,2 ile 22,6 arasında ginogenesis cevabı görüldüğünü rapor etmişlerdir. Çalışmaya göre İngiliz genotipleri % 0-1,7 arasında, Fransız genotipleri % 3,4-3,8 arasında, İspanyol genotipi % 2,1, Portekiz genotipleri % 0-2 arasında, Slovenya genotipleri % 0,8-3,4 arasında, Makedonya genotipi % 2,1, Türk genotipi % 2,2, Eski Sovyet Ülkeleri genotipi % 1,2, Japon genotipleri % 0 ile 4,4 arasında ve ABD genotipleri % 0-22,6 arasında ginogenesis cevabı göstermişlerdir. Bu araştırmacılarda ginogenik bitkiye dönüşüm oranları hakkında bilgi vermemişlerdir. Alan ve diğ. (2004) tarafından Kuzey Amerikan kökenli 10 acı ve dört tatlı uzun gün soğan genotiplerinde yapılan detaylı çalışmalarda bu genotiplerin ginogenesis cevaplarının orta ve yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Kuzey Amerikan genotiplerinden 1270 (% 4,6) ginogenik bitkicik eldesi sağlanmıştır. Bunların yaklaşık üçte ikisi ginogenik bitki olarak gelişmiştir.

Türk soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına verdikleri cevaplar ile ilgili araştırma sayısı oldukça azdır. Kaska (2013)'nin çalışmasında PAÜ BİYOM soğan gen havuzundan alınan 35 genotipten 25 (% 71,5)'ine ait tomurcukların BDS ortamında uyartım cevabı gösterdikleri ve toplam 345 (% 0,62) ginogenik bitkicik üretildiği belirtilmiştir. Çalışmada elde edilen ginogenik bitkiciklerin ~% 20'sinin gelişmeye devam ederek bitki haline dönüştüğü tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan 10 soğan genotipinden dokuzunda (% 90) ginogenesis cevabı elde edilmiş ve toplam 274 (% 0,64) ginogenik bitkicik üretilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin ~% 42'si gelişmeye devam ederek ginogenik bitki haline dönüşmüştür. Benzer donör materyalleriyle yapılmış olan bu iki çalışmanın ikincisinde elde edilen ginogenik bitki sayısındaki artış dikkat çekicidir. İkinci çalışmada kullanılan donör soğan genotiplerinin dört generasyon boyunca kendilenerek genetik olarak uniformlaşmış olmasının bu sonuçta katkısı olabilir. Genomda mutasyonlar sonucu oluşmuş olan ve genellikle çekinik kalıtım moduna sahip olan letal allellerin genetik saflaştırma uygulamaları sırasında homozigot hale gelmesi durumunda ölümcül veya gelişimi engelleyici sonuçlar ortaya çıkabilir (Alan ve diğ. 2004, Geoffriau ve diğ.

1997). Aşırı düzeyde heterozigot olan soğan popülasyonlarında ginogenesis uyartımına verilen cevaplarda düşük düzeydedir (Kaska 2013). PAÜ BİYOM soğan geliştirme programında klasik kendileme yöntemi ile saflaştırma çalışmaları yapılarak bu tip heterozigot materyallerden daha az düzeyde kendileme depresyonu gösteren ve birbirine genetik olarak daha fazla benzeyen bitkilerden oluşan standart OP genotipleri geliştirilmektedir. Soğan materyallerinde ginogenesis uyartımına cevap verme özelliğinin genetik olarak birbirine yakın bireylerden oluşan soğan genotiplerde daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Alan ve diğ. 2003).

Haploid bitkilerde mayoz gerçekleşmediği için normal erkek ve dişi gametler gelişemez. Bu nedenle ginogenik bitkilerin ploidi seviyelerinin tespit edilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada elde edilen ginogenik bitkiler ve bitkilerin ploidi seviyeleri FCM analizi ile tespit edilmiştir. Normal gelişim gösteren ginogenik bitkilerin ~% 50 kadarının haploid ve ~%30 kadarının diploid olduğu tespit edilmiştir. Bunların dışında miksploidler (% 11,6  $n+2n$  ve % 0,8  $2n+4n$ ) ve tetraploid (% 2,6) bitkiler bulunmuştur. Analiz sonuçlarına göre normal bitki formuna dönüşemeyen anormal ginogenik bitkilerin ~% 48 kadarı haploid ve %40 kadarının diploid olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunların yanında miksploidler (% 7,6  $n+2n$  ve % 2  $2n+4n$ ) ve triploidler (% 2) tespit edilmiştir.

Diploid ya da tetraploid olarak belirlenen ginogenik bitkiler haploid bitkilerden spontan olarak oluşmuş olabilirler (Campion ve diğ. 1995, Geoffriau ve diğ. 1997, Alan ve diğ. 2007). Alan ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada FCM analizine göre ginogenik bitkilerin ~% 82'si haploid ve ~% 15'inin diploid olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında test edilen bitkilerin ~% 2,4'ü haploid ve diploid hücreler için miksploidken ~% 0,8'i tetraploid olarak analiz edilmiştir. Kaska (2014)'nın çalışmasında denemeye alınan soğan genotiplerinden meydana gelmiş ginogenik bitkiler analiz edilmiştir. Sonuç olarak ~% 46 oranında haploid, ~% 19 oranında diploid, ~%1,5 oranında tetraploid, ~% 30 oranında haploid ve diploid hücreler için miksploidi, ~% 2 oranında diploid ve tetraploid hücreler için miksploid elde edilmiştir.

## 4.2 Haploid ve DH Soğan Bitkilerinin Üretiminin Avantajları

Üretilmesi oldukça zahmetli olmasına rağmen haploid bitkilerin iki önemli avantajı vardır. İlki her kromozom çiftinden sadece bir tanesine sahip olan bu bitkilerde mutasyonların neden oldukları değişikliklerin tespitinin kolaylaşmasıdır. İkincisi de diploid hale getirildiklerinde bu bitkilerin hücrelerinde birbirinin aynı olan kromozom çiftlerine (izogenik diploid veya katlanmış haploid) sahip olunmasıdır. Konvansiyonel kendileme ile hiçbir zaman ulaşılamayacak derecede homozigot olan bu bitkilerin kendilenmesiyle tamamen homozigot ve birbirlerine klon kadar benzeyen bitkiler üretilir. Soğan türünde elde edilen DH genotiplere ait bitkilerin letal allelerden arındıkları, kendileme depresyonu göstermedikleri ve deneysel melezlemelerde konvansiyonel hibritlerden daha yüksek seviyede melez gücü gösterdikleri rapor edilmiştir (Alan ve diğ. 2004, Hyde ve diğ. 2012). Bu nedenlerden dolayı farklı soğan genotiplarından çok sayıda DH bitkinin üretilmesi soğanda genetik ve ıslah çalışmaları açısından önemli kazanımlar sağlayacaktır.

## 5. KAYNAKLAR

Alan, A.R., Mutschler, M.A., Brants, A., Cobb, E. and Earle, E.D., “Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn”, *Plant Sci.* 165, 1201-1211, (2003).

Alan, A. R., Brants, A., Cobb, E., Goldschmied, P. A., Mutschler, M.A. and Earle, E.D., “Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials”, *Plant Sci.* 167, 1055–1066, (2004).

Alan, A. R., Lim, W., Mutschler, M.A. and Earle, E.D., “Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.)”, *Plant Sci.* 173,25-31, (2007).

Alan, A. R., Toprak, F. C. and Kaska, A. “Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants”, *PCTOC*, 125:249-259, (2016).

Anandhan, S., Chayan, A. A., Gopal, J., Mote, S. R., Shelke, P. V. and Lawand, K. E., “Variation in gynogenic potential for haploid induction in Indian short day onions”, *Indian J Genet Pl Br.* 74 (4), 526-528, (2014).

Bohanec, B. and Jakse, M., “Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions”, *Plant Cell Rep.* 18, 737-742, (1999).

Bohanec, B., “Doubled-haploid onions”, (eds: H.D. Rabinowitch and L. Currah), *Allium Crop Science: Recent Advances*, CABI Publishing, Wallingford, UK, 145-158, (2002).

Brewster, J. L., “Onions and Other Vegetable *Alliums*”, (Vol. 15). *CABI*, (2008).

Campion, B., Perri, E., Azzimonti, M.T., Vicini, E. and Schiavi, M., “Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.)”, *Plant Breed.* 114: 243-246, (1995).

Campion, B. and Alloni, C., “Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules”, *PCTOC*, 20, 1-6, (1990).

Dunstan, D. I. and Short, K.C., “Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa*”, *Physiol. Plantarum*, 41, 70-72, (1977).

Dunwell, J. M., “Haploids in flowering plants: origins and exploitation”, *Plant Biotechnol J.* 8(4), 377-424, (2010).

Fayos, O., Vallés, M., Garcés-Claver, A., Mallor, C. and Castillo, A., “Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling”, *Front. Plant Sci.* 6, 1-13, (2015).

Food and Agriculture Organization, (15 November 2019), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (2016).

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Rancillac, M., “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp. Cell Res.* 50, 151-158, (1968).

Geoffriau, E., Kahane, R. and Rancillac, M., “Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.)”, *Euphytica*, 94, 37-44, (1997).

Germana, M. A., “Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding”, *Plant Cell Rep.* 30, 839-857, (2011).

Grzebelus, E. and Adamus, A., “Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos”, *Plant Sci.* 167, 569-574, (2004).

Hyde, P.T., Earle, E.D. and Mutscheler, M.A. “Doubled-haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance”, *Hortscience* 47 (12), 1690-1695, (2012).

Jakse, M., Havey, M.J. and Bohanec, B., “Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos”, *Plant Cell Rep.* 21, 905-910, (2003).

Kaska, A., “Bazı yenilebilir *Allium* türlerinde ginogenesis uyartımı ve klonal çoğaltma olanaklarının araştırılması”, Doktora, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2013).

Keller, J. “Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)”, *Euphytica*, 47, 241–247, (1990).

Keller, E.R.J. and Korzun, L., “Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species”, (eds: S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux), *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 3. The Netherlands, 51-75, (1996).

Khar, A., Kumar, A., Islam, S. Kumar, A. and Agarwal, A., “Genotypic response towards haploid induction in short day tropical Indian onion (*Allium cepa*)”, *Indian J. Agric. Sci.* 88 (5), 709-13, (2018).

Michalik, B., Adamus, A. and Nowak, E., “Gynogenesis in Polish onion cultivars”, *J. Plant Physiol.* 156, 211-216, (2000).

Murashige, T. and Skoog, F., “A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cell culture”, *Plant Physiol.* 15, 473-497, (1962).

Muren, R.C., “Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion”, *HortSci.* 24, 833-834, (1989).

Musial, K., Bohanec, B. and Przywara, L., “Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)”, *Sex. Plant Reprod.* 13, 335-341, (2001).

## 6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Salim BARIŞ  
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul 15.01.1990  
Lisans Üniversitesi : Atatürk Üniversitesi  
Y. Lisans Üniversitesi : Pamukkale Üniversitesi  
Elektronik Posta : [salim.baris90@gmail.com](mailto:salim.baris90@gmail.com)

### Posterler:

- Alan, A.R., Duzgun, F., Barıs, S., Celebi-Toprak, F., “Gynogenesis Responses of Onion (*Allium cepa* L.) Genotypes Adapted to Turkey”, *The joint NOA/NARC/IARS Conference in Madison WI USA*, (July 24-27, 2019).
- Alan, A.R., Alan, S., Barıs, S., Kaska, A., Celebi-Toprak, F., “Field Performance of Doubled Haploid (DH) Onion (*Allium cepa* L.) Lines Developed from Turkish Land Races”, Yayın Yeri: *30. International Horticultural Congress*, Istanbul, Turkey (12-16. 08. 2018).

### Sunduđu Seminer:

- Barıs S., “ Soğanda (*Allium cepa* L.) Haploid ve Katlanmış Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi” Yüksek Lisans Semineri, Pamukkale Üniversitesi/Denizli (2018).