

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

**ÇİV (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.) GENOTİPLERİNDE İN
VİTRO'DA GİNOGENİK VE SOMATİK REJENERASYON
UYARTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADAMOU KORONEY KOURE

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

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



**ÇİV (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.) GENOTİPLERİNDE İN
VİTRO'DA GİNOGENİK VE SOMATİK REJENERASYON
UYARTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADAMOU KORONEY KOURE

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

Bu tez çalışması PAÜ BİYOM tarafından 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.

Adamou Koroney Koure

ÖZET

ÇİV (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.) GENOTİPLERİNDE İN VİTRO'DA GİNOGENİK VE SOMATİK REJENERASYON UYARTIMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ADAMOU KORONEY
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALİ RAMAZAN ALAN)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

Çiv (*Allium schoenoprasum* L.) ülkemizde doğadan toplanarak tüketilen yenilebilir *Allium* türlerinden en önemlisidir. Bazı ülkelerde ıslah edilmiş farklı çiv tipleri arazi, sera ve ev bahçelerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde tarımsal ürün olarak değerlendirilme potansiyeli olan bu türde ıslah programlarının hızlı bir şekilde ilerlemesi için katlanmış haploid (DH) hatların üretilmesine imkan sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu tez projesinde beş çiv genotipine ait bitkilerden alınan açmamış çiçek tomurcukları dört uyartım ortamında kültüre alınmıştır. Toplamda 51 (% 0.67) ginogenik bitkicik üretilmiş ve bunlardan 40 adeti bitki haline dönüşmüştür. Flow sitometri analizine göre ginogenik bitkilerin 36 adedinin (% 90) diploid, üç adedinin (% 7.5) tetraploid ve birinin (% 2.5) haploid ve diploid hücreler için miksploid olduğu tespit edilmiştir. Kültürlerden elde edilen 80 somatik bitkinin hepsinin diploid olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular açmamış çiçek eksplantlarının uyartım ortamlarında kültüre alınması ile ginogenik ve somatik bitki rejenerasyonunun mümkün olduğunu göstermiştir. Tez çalışmasında kullanılan çiv genotiplerinin hepsinde ginogenik ve somatik bitki gelişimi sağlanmıştır. Çekirdek DNA miktarı analizi ile elde edilen ginogenik bitkilerin genellikle diploid oldukları tespit edilmiştir. Kültürlerden üretilen ginogenik ve somatik bitkiler dış ortama aktarılarak sera ortamında büyütülmüşlerdir. Bu çalışma ile halen doğadan toplanarak tüketilen bu türde DH üretimi ile saf hatların elde edilebileceği gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Allium schoenoprasum*, çiv, flow sitometri, ginogenesis, katlanmış haploid

ABSTRACT

INDUCTION OF GYNOGENIC AND SOMATIC REGENERATION IN CHIVES (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.) GENOTYPES IN IN VITRO

MSC THESIS

ADAMOU KORONEY

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALI RAMAZAN ALAN)

DENİZLİ, JULY 2021

Chive (*Allium schoenoprasum* L.) is the most important edible *Allium* species collected from nature for consumption. In some countries, improved chieve types are grown in field, green house and home yards. In our country, it is necessary to develop methods that will allow the production of doubled haploid (DH) lines for the rapid progress in the breeding programs for this species, which has the potential to be used as a crop. In this thesis project, unopened flower buds collected from five donor genotypes were cultured in four induction media. In total, 51 (0.67 %) gynogenic plantlets were produced and 40 of these plantlets were converted to plants. Flow cytometry analysis of gynogenic plants showed that 36 (90 %) of them were diploid, three (7.5 %) were tetraploid and one (2.5 %) was a mixoploid for haploid and diploid cells. All of 80 somatic plants developed from the cultures were diploids. The findings showed that gynogenic and somatic plant regeneration is possible by culturing whole unopened flower explants in induction media. Gynogenic and somatic plant regeneration was achieved in all of the chieve genotypes used in the thesis study. Nuclear DNA amount analysis showed that gynogenic plants obtained were generally diploids. It has been shown that pure lines can be obtained in this species, which is currently collected and consumed from nature, using DH production.

KEYWORDS: *Allium schoenoprasum*, chive, flow cytometer gynogenesis, doubled haploid

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çiv türünde doku kültürü araştırmaları	2
1.2 Tezin Konusu ve Literatür Bilgisi	3
1.3 Tezin amacı	5
2. YÖNTEM.....	7
2.1 2.1 Bitki Materyali	7
2.2 Donör Çiv Bitkilerine Ait Çiçek Tomurcuklarının Kültüre Hazırlanması8	
2.3 Besi Ortamları ve Kültürlerden Elde Edilecek Olan Bitkilerin Karakterizasyonu	9
2.4 Donör ve Doku Kültürü Kaynaklı Çiv Bitkilerinde Ploidi Seviyesi Tespiti.....	11
2.5 Üretilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılarak Büyütölmeleri.....	11
2.6 Donör Genotiplerine Ait Çiçeklerde Yapılan Gözlemler.....	12
2.7 Doku Kültürü Ortamlarında Üretilmiş Olan Bitkilerde Yapılan Gözlemler	12
2.8 İstatistiksel Analiz	12
3. BULGULAR	13
3.1 Donör Çiv Genotiplerine Ait Açmamış Çiçek Tomurcuklarının Uyarım Ortamlarında Gösterdikleri Cevaplar	13
3.2 Açmamış Çiçek Tomurcuğu Kültürlerinden Gözlemlenen Ginogenesis Cevabı.....	14
3.3 Açmamış çiçek tomurcuğu kültürlerinden ele edilen somatik bitkiler15	
3.4 Donör ve Doku Kültürü Kaynaklı Çiv Bitkilerinde Ploidi Seviyesi Tespiti.....	20
3.5 Çiçek Tomurcuğu Kültürlerinden Üretilen Bitkilerin Aklimatize Edilmesi.....	20
3.6 Doku Kültürü Ortamlarında Üretilmiş Olan Bitkilerde Yapılan Gözlemler	21
3.6.1 Ginogenik bitkilerin vejetatif özellikleri.....	21
3.6.2 Somatik bitkilerin vejetatif özellikleri	22
4. TARTIŞMA	25
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
6. KAYNAKLAR.....	29
7. ÖZGEÇMİŞ.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1. Çiv bitkisi. A. Saksıda büyütülmüş üç yıllık bir çiv bitkisi. B. Kökleri yıkanarak temizlenmiş bitki. C. Antesis aşamasında çiçekler bulunduran bir çiv umbeli. D. Olgunlaşmış tohumlar bulunduran kurumuş umbeller. E. Çiv tohumları..... 3
- Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan donör Çiv genotiplerin ve açmamış çiçek tomurcuğu eksplantlarının kültür işlemi için hazırlanması. 8
- Şekil 3.1. Tüm açmamış çiçek kültürü ile *in vitro* ginogenesis uyartımı ve ginogenik çiv bitkisi üretimi. A. Uyartım ortamına ekilmiş olan çiv çiçek tomurcuk eksplantları. B. Uyartım kültüründe tomurcuktan dışarı çıkan ginogenik bitkicik. C. Gelişimine tüpte devam eden ginogenik çiv bitkisi. 16
- Şekil 4.2. *In vitro*'da üretilmiş olan çiv bitkilerinin dış ortama aklimatizasyonu. A. Kültür tüpünden çıkarıldıktan sonra kökleri musluk suyu ile yıkanmış ginogenik bitki. B. Çiv bitkisinin steril torf ve perlit karışımı bulunduran plastik saksıya aktarımı ve steril su ile sulanması. C. Saksıya aktarılmış çiv fidelerinin plastik sandviç poşetleri ile örtülmesi. D. Saksılara aktarıldıktan sonra kontrollü iklimlendirme kabininde dış ortama alıştırılmış çiv bitkileri E. Isıtmasız cam serada büyütülen ginogenik ve somatik çiv bitkileri..... 17

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Donör çiv genotiplerinin kökeni ve genel özellikleri.	7
Tablo 2.2: Çiv ginogenesis ve somatik rejenerasyon uyartımı ve bitki büyüme ortamları.....	10
Tablo 3.1: Çiv donör genotiplerinde ginogenesis uyartı.....	18
Tablo 1.2: Çiv donör genotiplerine ait tomurcuk eksplantlarından elde edilen somatik bitkiler.....	19
Tablo 3.3: Ginogenik çiv bitkilerinin toprak üstü özellikleri.....	23
Tablo 1.4: Somatik çiv bitkilerinin toprak üstü özellikleri.....	24

SEMBOL LİSTESİ

2,4-D	: 2,4-Dikloro Fenoksi Asetik Asit
2İP	: İzopentenil adenin
BAP	: 6-Benzil Amino Pürin
°C	: Santigrad derece
m/cm	: Metre/santimetre
mm	: Milimetre
NAA	: α -naftalenasetikasit
NIB	: Çekirdek izolasyon tamponu
g/l	: Gram/litre
mg/l	: Miligram/litre
μm	: Mikro litre
pg	: Pikogram
TDZ	: Tiazuron

ÖNSÖZ

Yaptığım bu tez çalışmasında beni yönlendiren, değerli bilgilerini benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN'a, bu çalışma süresince her aşamada yardım ve desteğini benden esirgemeyen Prof. Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK'a teşekkür ediyorum.

Çalışmalarında bana yardımcı olan Alireza LACHIN, Tuğçe ALAN, Doğuşcan YILDIZ ve bütün biyom ekibine teşekkürü bir borç bilirim.

Beni yetiştiren ve bu günlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi olarak her zaman bana destek olan annem Haova NOMAOU ve babama Koroney KOURE'ye çok teşekkür ediyorum.

1. GİRİŞ

Çiv (*Allium schoenoprasum* L.) 800'den fazla tür barındıran *Allium* cinsi içerisinde yer almaktadır (Fritsch ve Friesen 2002). Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika kıtalarının ılıman bölgelerinde doğal olarak yayılım gösteren çok yıllık bir türüdür. Hem yeni, hem de eski dünyada doğal yayılım gösteren ve soğan oluşturan diploid ($2n = 2x = 16$) tek *Allium* türüdür. Çok yıllık otsu bir bitki olan çiv doğal yayılım gösterdiği alanlardan toplanılarak tüketilmektedir. Islahçılar tarafından sebze ve süs bitkisi olarak geliştirilmiş çeşitler ile tarımı yapılmaktadır. Taze yaprakları Avrupa'da salata, sos ve yemeklerde kullanılmaktadır (van der Meer 1997). Çiv ülkemizde otlu peynir üretiminde kullanılan bitki türlerinden birisidir (Tuncer ve diğ. 2016). Doğadan toplanarak tüketimi yapılan çiv türünün dışında ülkemizde henüz çiv tarımı yapılmamaktadır.

Çiv doğada kendiliğinden saçılan tohumlar ile çoğalmaktadır. İlk yıl, tohumdan çimlenen fideler bir süre sonra kardeşlenerek, birbirine yapışık, çok sayıda ince ve uzun başlar oluşturmaktadırlar. Bu bitkiler özellikle yabancı ot rekabetinin olmadığı, yüksek rakımlı ve sulak alanlarda uzun yıllar yaşayabilmektedirler. Soğanlar 2-3 cm uzunluğunda ve yaklaşık olarak 1 cm çapında ince ve konik şekillidirler ve yoğun kökler üretmektedirler. Doğal yayılım alanlarında ilkbaharda uyanan bitkiler 30-50 cm boyunda yapraklar üretmektedirler. Yapraklar baş soğandakine (*A. cepa* L.) benzer tüpsü ve yuvarlak şekillidirler. Yaprak kısımları kışın kurumakta ve başlar dormant halde bahar aylarına kadar beklemektedir. Çiv ılıman ülkelerde doğadan toplandığı gibi, çiçekleri ve yaprakları için arazi ve seralarda üretimi yapılmaktadır. Tohumla üretilebileceği gibi, kardeşlenmiş soğanların ayrılarak çoğaltılması da mümkündür. Avrupa ülkelerinde birçok geleneksel yemeğe tat vermesi amacıyla kullanılmaktadır. Tadının soğandan daha az acı olması nedeniyle tercih edilmektedir. Birçok ülkede peynirin yanında verilmektedir. Ülkemizde Van otlu peynirinin yapımında kullanılmaktadır (Kocak ve diğ. 2020). Ayrıca güzel çiçeklere sahip olduğu için park ve bahçelerde süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik özelliklerinin yanı sıra böcek kovucu özelliği de bulunmaktadır.

Çiv türünde genotiplerin klonal olarak çoğaltımı amacıyla birkaç yıllık bitkilerin köklü sürgünleri kullanılmaktadır. Bu uygulamanın en önemli sorunu hastalık ve zararlı etmenleri ile bulaşık bitkilerden kaliteli çoğaltma materyalinin üretilmemesi riskinin olmasıdır. Doğal olarak yabancı tozlanma eğilimi gösteren bu türde, genetik olarak saf hatlar mevcut değildir ve ticari önemi olan genotip sayısı oldukça azdır. Çivin aseptik olarak doku kültürü ortamlarında çoğaltımı ile ilgili yayınlar sınırlı sayıdadır. Bazı *Allium* türlerinde uygulanabilen ginogenesis temelli haploid bitki üretimi yönteminin çiv türünde de uygulanabilirliği detaylı olarak test edilmemiştir.

1.1 Çiv türünde doku kültürü araştırmaları

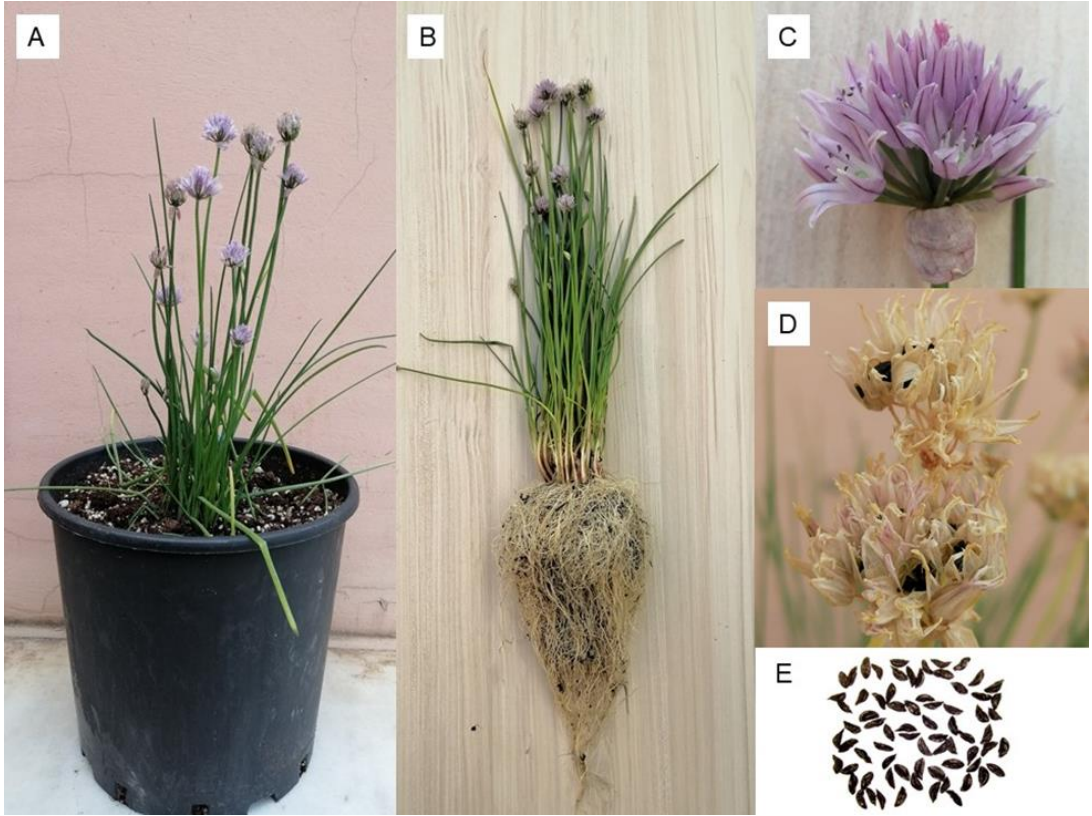
Modern biyoteknolojik yöntemlerin bu türün ıslahında ve hastalıklardan arındırılarak çoğaltımında kullanılması konusunda araştırmalara ihtiyaç vardır. Önemli ticari türler olan soğan (*A. cepa*), pırasa (*A. ampeloprasum*) ve sarımsak (*A. sativum*) ile ilgili çok sayıda doku kültürü çalışmalarını yayınlanmış olmasına rağmen çiv ile ilgili çok az sayıda araştırma makalesi mevcuttur. Çiv ile ilgili olarak bugüne kadar yayınlanmış çalışmalar genellikle bitkisel materyalin klonal çoğaltımına yöneliktir.

Zdravkovic-Korac ve diğ. (2010) tarafından yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar *in vitro* ortamda çimlendirdikleri fidelerin, kök bölgelerinden aldıkları parçaları bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve BDS (Dunstan ve Short, 1977) temelli besi ortamlarını içerisine koyarak önce kallus elde etmişlerdir. Sonra kallusların büyüme düzenleyiciler içermeyen ya da sadece kinetin içeren ortamlara alınarak çoğaltması ve somatik embriyolara dönüşmesi sağlanmıştır. Daha sonra embriyolar ½ MS ortamına alınarak fide haline dönüştürülmüşlerdir.

Sitokinin grubundan sekiz bitki büyüme düzenleyicisinin çiv bitkisinin bazal bölümünden yapılan rejenerasyona olan etkisi Tubic ve diğ. (2016) tarafından araştırılmıştır. Yapılmış olan bu çalışmada en başarılı rejenerasyonun 10 µM tidiazuron (TDZ) içeren, MS temelli besi ortamlarında kültüre alınan 5 mm çapındaki bazal kısmının gerçekleştiği görülmüştür. Araştırmacılar bitkilerde rejenerasyon kapasitesinin peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesi ile pozitif

korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. 10 µM TDZ tüm antioksidan enzimlerinin aktivitesini hızlı bir şekilde değiştirmiştir.

PAU BİYOM'da hem klonal çoğaltım, hem de genetik saflaştırma amacıyla araştırmalar yapılmaktadır. Diploid ($2n= 2x= 16$) olan bu tür doğada birçok ülkede yabani olarak kendiliğinden büyümektedir. Avrupa ve Asya ülkelerinde insanlar tarafından gıda ve süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Çiv türünün son yıllarda tüketimi Türkiye'de yaygınlaşmaya başlamıştır ve bu türle ilgili olarak yapılmış olan çok az bilimsel çalışmaya rastlanmaktadır.



Şekil 1.1. Çiv bitkisi. A. Saksıda büyütülmüş üç yıllık bir çiv bitkisi. B. Kökleri yıkanarak temizlenmiş bitki. C. Antesis aşamasında çiçekler bulunduran bir çiv umbeli. D. Olgunlaşmış tohumlar bulunduran kurumuş umbeller. E. Çiv tohumları.

1.2 Tezin Konusu ve Literatür Bilgisi

Islahı zaman alıcı ve zor olan çiv türünde yeni çeşitlerin geliştirilmesi oldukça uzun zaman almaktadır. Klasik ıslah yöntemleri kullanılarak saf çiv hatlarının elde edilmesi çok uzun zaman alabilir. Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAÜ BİYOM)'nde ekonomik potansiyeli olan çiv materyallerinden oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur. Bu materyallerden saf hatların üretilmesi için klasik saflaştırma (kendileme ve seleksiyon ıslahı kombinasyonu) çalışmaları sürdürülmektedir. Bu uygulama ile birçok çiv materyalinde ikinci nesil kendileme seviyesine ulaşılmıştır. Klasik yöntemle standart açık tozlanan hatların üretilmesi işleminin daha birkaç nesil sürmesi gerekmektedir.

Tarımı yapılan çiv tipleri doğada kendiliğinden çoğalanlardan çok az farklılıklar göstermektedirler. Çiv, diğer tarımsal ürünlerde olduğu kadar yoğun bir ıslah uygulamasına maruz kalmaması nedeniyle yüksek oranda heterozigotluk göstermektedir. Soğan ve pırasa gibi tohumla çoğaltılan türlerde klasik kendileme işlemi ile saf hatların oluşturulması sırasında kendileme depresyonu adı verilen problem ortaya çıkmaktadır (Silverland, 1996). Kendileme depresyonu bitki büyüme gücünde azalma, küçük bitki oluşumu, tohum sayısında azalma, çeşitli klorofil bozuklukları (albinizm) gibi şekillerde ortaya çıkmaktadır. Alan ve ark. (2004, 2007) tarafından yapılan çalışmalarda DH soğan hatların donör bitkiler kadar güçlü büyüüp tohum ürettikleri görülmüştür. DH hatlar ve DH polen donörleri ile üretilen F1 soğan hibritleri önemli agronomik özellikler açısından oldukça yüksek uniformite göstermişlerdir (Hyde ve ark., 2012). Çiv türünde DH bitkilerin üretilmesi mümkün hale geldiğinde, bu bitkilerin yeni çiv çeşitlerinin geliştirilmesi çalışmalarında kullanılabilme potansiyeli oldukça yüksektir.

*Allium*larda haploidizasyon uygulamaları ile saf hatların üretilbileceği yönünde yayınlar mevcuttur (Muren, 1989; Champion ve Alloni, 1990; Alan ve diğ., 2003; Alan ve diğ., 2004). Soğan ve pırasa gibi *Allium* türlerinde uygulanabilen ginogenesis temelli haploidizasyon uygulamasının çiv ıslahında kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Haploidizasyon tekniklerinin uygulanması ile tamamen saf çiv hatlarının iki yıllık bir süre içerisinde elde edilmesi mümkün olabilir. Bu nedenle de çiv genotiplerinin ginogenesis uyarımına cevap verme potansiyellerinin tespit edilmesi gerekmektedir.

Soğangillerde haploid ve dihaploid bitkilerin elde edilmesi, olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarının tüm olarak ya da ovül ve ovaryumlarının ginogenesis uyartım ortamında kültüre alınmasıyla mümkün olmaktadır (Muren, 1989; Keller, 1990; Bohanec ve Jakse, 1999; Schum ve diğ., 1993; Alan ve diğ., 2016). Diploid olan çiv bitkilerinde ilk aşamada haploid bitkilerin üretilmesi, daha sonraki aşamada ise kromozom katlaması uygulaması ile bunlardan katlanmış haploid (DH) bitkilerin üretilmesiyle genetik olarak tamamen saf bitkiler üretilebilir. DH tekniklerinin çiv ıslahı çalışmalarına entegre edilebilmesi durumunda genetik olarak uniform çiv hatlarının çok kısa sürede üretilebilmesi mümkün olacaktır. DH tekniğiyle tamamen saf çiv genotiplerinin üretimi iki yıl gibi kısa bir sürede sağlanabilecektir.

DH tekniği ile üretilecek çiv hatları tüm karakterler için saflaştırılır. Yapılacak olan bu çalışma ile elde edilecek olan DH bitkilerde kendileme depresyonu gibi istenmeyen durumların ortaya çıkıp çıkmayacağı gözlenebilecektir. DH hatların ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için, uygulanacak protokollerin genotipten etkilenmemesi, çok sayıda haploid ve DH bitki eldesine olanak sağlaması, bitkilerin ve yeniden bol miktarda tohum üretebilmelerinin mümkün olması gerekmektedir.

Açık tozlanan ve doğada tohum ile yayılış gösteren çiv genotipleri tek tip olmayan bitkiler üretmeleri nedeniyle tercih edilmezler. Aseptik koşullarda klonal olarak çoğaltılabilmesi durumunda daha uniform çiv bitkileri elde edilebilir. Çiv türünde *in vitro* klonal çoğaltım konusunda sınırlı sayıda yayın mevcuttur. Tubic ve diğ. (2016) çiv bitkisinde sitokininlerin bitki gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Diğer bir çalışmada çiv kök eksplantlarından somatik embryo gelişimi sağlanması için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri araştırılmıştır (Zdravkovic-Korac ve diğ., 2010). Çiçek tomurcuklarının eksplant olarak kullanıldığı bir somatik rejenerasyon çalışması mevcut değildir. Bu tür için *in vitro* temelli tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada çiv türünde ginogenesis ve somatik sürgün uyartımının sağlanması için protokoller geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Tezin amacı

Yapılmış olan bu tez çalışması kapsamında çiv türünde hızlandırılmış ıslah programlarında kullanılacak homozigot hatların ginogenesis temelli

haploidizasyon yöntemi ile üretilebilme potansiyelinin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı çiv genotiplerinden alınan açmamış çiçek tomurcuğu eksplantlarının farklı uyartım ortamlarında kültüre alınması ve bu ortamlarda ginogenik ve somatik rejenerasyon gözlemlenmiştir. Tomurcuk içerisindeki yumurta hücrelerinden gelişen (ginogenik) veya tomurcuğun bazal kısmından gelişen (somatik) bitkiler sitolojik ve morfolojik olarak karakterize edilmeleri için dış ortama alıştırılmışlardır. Yapılmış olan bu çalışma ile Türkiye’de ilk defa ginogenik çiv bitkilerinin üretilme fırsatı elde edilmiştir. Elde edilmesi zor olan ginogenik bitkiler genetik olarak tamamen saftırlar bu nedenle genetik ve ıslah çalışmaları için büyük öneme sahiptirler.

2. YÖNTEM

2.1 2.1 Bitki Materyali

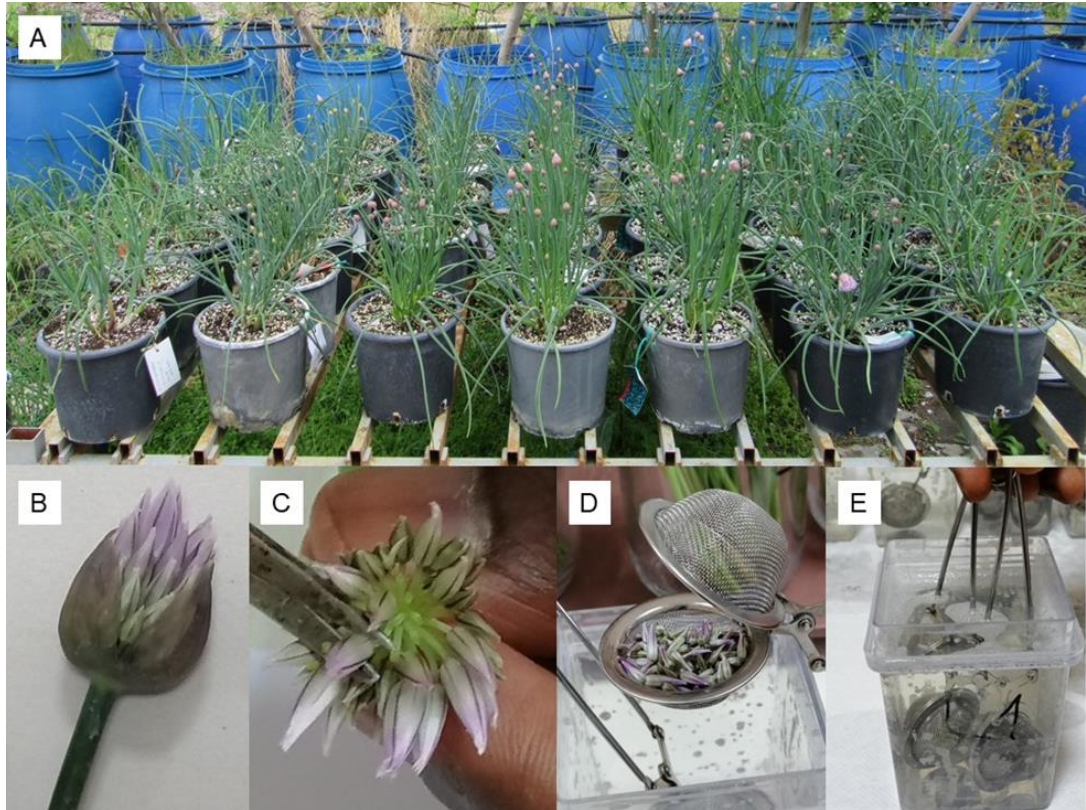
Tez çalışmasında kullanılan dört seleksiyon hattı ve bir ticari çeşitten oluşan donör genotipler Pamukkale Üniversitesi, Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (PAÜ BİYOM) *Allium* geliştirme programı kapsamında oluşturulan çiv genetik havuzundan alınmıştır (Tablo 2.1). Donör genotiplere ait bitkilere ait tohumlar dört yıl önce (Eylül 2017) ısıtmasız cam serada torf ve perlit (2:1)'ten oluşan karışım ile doldurulmuş olan 104'lük viyollere ekilmişlerdir. Birkaç yapraklı aşamaya gelen çiv fideleri Nisan 2018'de aynı karışımı içeren 4 L'lik saksılara transfer edilmişlerdir. Haziran 2018'de çiv bitkileri sera dışına alınmış ve burada büyütülmeye devam edilmiştir. Şubat 2019'da bitkiler torf ve perlit ile doldurulmuş 4 L'lik saksılara transfer edilerek büyütülmüşlerdir. Haziran 2019'da 7 L'lik saksılara transfer edilen bitkiler sera dışına alınmış ve burada büyümelerine devam etmeleri sağlanmıştır. Çiv fideleri ve bitkileri aktif büyüme dönemi boyunca 1.5 kg/1000 L olarak ayarlanmış 15: 15: 15 (N:P:K) içeren gübreli su ile haftalık olarak sulanmışlardır. Gerekli durumlarda bitkilerin hastalık ve zararlılardan korunması amacı ile insektisit (Decis 2.5 EC) ve fungusit (Captan 50 WP ve Ridomil Gold MZ 68 WG) uygulamaları da gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.1. Donör çiv genotiplerinin kökeni ve genel özellikleri.

Donör genotip	Kökeni	Erkenci/Geçci	Kullanılan çiçek tomurcuğu sayısı
Asch1	Seleksiyon hattı	Geçci	1170
Asch2	Seleksiyon hattı	Erkenci	3720
Asch3	Seleksiyon hattı	Geçci	480
Asch4	Seleksiyon hattı	Erkenci	1290
Twiggy	Ticari çeşit	Erkenci	960

2.2 Donör Çiv Bitkilerine Ait Çiçek Tomurcuklarının Kültüre Hazırlanması

Donör genotipler Mart 2020 başında çiçek sapı oluşturmaya başlamışlardır (Şekil 2.1A). Umbeli saran zarın açılmaya başlaması aşamasına gelindiğinde umbeller 15-20 cm'lik çiçek sapı ile kesilerek içine saf doldurulmuş olan kavanozlara konarak laboratuvara getirilmişlerdir (Şekil 2.1B). Bu umbellerde bulunan antesis aşamasındaki çiçekler elle kopararak uzaklaştırılmışlardır. Açmamış çiçek tomurcukları bir makas yardımıyla kesilip çay süzекlerine yerleştirilmişlerdir (Şekil 2.1C, D). Süzekte bulunan tomurcuklar yüzey sterilizasyonu amacı ile % 70'lik etanol bulunan kavanozda 30 saniye kadar tutulmuşlardır (Şekil 2E). Bu tomurcuklar daha sonra içinde sterilizasyon solüsyonu (%15 klorak + %0.1 Tween-20) bulunan bir kavanozda yaklaşık olarak 30 dakika tutulduktan sonra steril kabin içerisinde steril su ile üç defa yıkanıp durulanmışlardır. Steril hale getirilen tomurcuklar steril kurutma kağıtları üzerine serilerek 15-20 dakika kadar kurumaları sağlanmıştır.



Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan donör Çiv genotiplerin ve açmamış çiçek tomurcuğu eksplantlarının kültür işlemi için hazırlanması.

A. Saksıda büyütülmüş ve çiçeklenme aşamasında olan donör genotiplere ait çiv bitkileri. B. Doku kültürü uygulamaları için uygun aşamada çiçek tomurcuklarının bulunduğu bir umbel. C. Çiv umbelinde kesilen açmamış çiçek tomurcukları. D. Açmamış çiçek tomurcuklarının çay süzeğine konulması. E. Çiv tomurcuklarında yüzey sterilizasyonu uygulaması.

2.3 Besi Ortamları ve Kültürlerden Elde Edilecek Olan Bitkilerin Karakterizasyonu

Çalışmada BDS (Dunstan ve Short, 1977), MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve B5 (Gamborg ve diğ., 1968) temelli besi ortamları kullanılmıştır (Tablo 2). Bu besi ortamları farklı kombinasyonlarda oksin (2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve α -Naftalen asetik asit (NAA)) ve sitokinin (6-Benzilaminopurin (BAP) ve İzopentenil adenin (2ip)) bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Otoklav ile sterilize edilen besi ortamları yaklaşık olarak 65°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril kabin içinde açılan 90 x 15 mm'lik petri tabaklarına yaklaşık olarak 20 ml olacak şekilde dökülmüşlerdir.

Çalışmada ginogenesis ve somatik sürgün rejenerasyonu işlemleri için uygun olan açmamış çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Dijital kumpas ile yapılan ölçümlerde tomurcukların en küçüğü ~2 mm çapında ve ~3.5 mm uzunluğunda en büyüklerinin de ~2.5 mm çapında ve ~6 mm uzunluğunda ölçülmüştür. Kültürler Petri tabaklarına 30'ar çiçek tomurcuğu konarak oluşturulmuştur.

Tüm kültür tabakları sterilizasyonun korunması amacıyla iki sıra parafilm ile kapatılmıştır. Tomurcuk kültürleri 25°C ve 18 saat ışık/6 saat karanlık için ayarlanmış kültür büyüme odasına yerleştirilmiştir. Kültürler haftalık olarak gözlemlenmiş ve tomurcuk eksplantlarındaki gelişmeler kayıt altına alınmıştır. Ginogenik ve vegetatif gelişim gösterdiği tespit edilen tomurcuklar 20 ml büyüme ortamı (EM) (Jakse ve diğ., 2003) içeren Petri kaplarına transfer edilmiştir. Ginogenik ve somatik kökenli bitkicikler 15 ml EM içeren 50 ml'lik cam tüplere transfer edilip gelişmeye teşvik edilmiştir. Somatik rejenerasyon gösteren tomurcuk eksplantlarından tek somatik sürgün alınmıştır.

Tablo 2.2: Çiv ginogenesis ve somatik rejenerasyon uyarımı ve bitki büyüme ortamları.

İçerik	Ortam				
	BDS (mg/l)	MMS1 (mg/l)	MMS2 (mg/l)	MB5 (mg/l)	EM (mg/l)
Makro Elementler					
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150.00	440.00	440.00	150.00	75.00
KNO ₃	2530.00	1900.00	1900.00	2500.00	1265.00
NH ₄ (NO ₃)	320.00	1650.00	1650.00	134.00	160.00
MgSO ₄ x 7H ₂ O	247.00	370.00	370.00	250.00	123.50
KH ₂ PO ₄	-	170.00	170.00	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	134.00	-	-	134.00	670.00
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	169.00	-	-	150.00	845.00
NH ₄ H ₂ PO ₄	230.00	-	-	-	115.00
Mikro Elementler					
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.039	0.025	0.025	0.025	0.02
H ₃ BO ₃	3.00	6.20	6.20	3.00	1.50
KI	0.75	0.83	0.83	0.75	0.38
MnSO ₄ x H ₂ O	13.20	16.90	16.90	10.00	6.60
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.13
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2.00	8.60	8.60	2.00	1.00
Demir Kaynağı					
FeNaEDTA	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25
Vitaminler					
Miyo inositol	500.00	500.00	500.00	500.00	500.00
Nikotinik asit	1.00	0.50	0.50	1.00	1.00
Piridoksin HCL	1.00	0.50	0.50	1.00	1.00
Tiamin HCL	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Amino asitler					
Glisin	-	2.00	2.00	-	-
L-prolin	200.00	-	-	-	200.00
Bitki büyüme düzenleyicileri					
2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)	2.00	2.00	-	2.00	-
α-Naftalen asetik asit (NAA)	-	-	0.50	-	-
6-Benzilaminopurin (BAP)	2.00	2.00	-	2.00	-
İzopentenil adenin (2ip)	-	-	4.00	-	-
Karbonhidrat kaynağı					
Sukroz	100,000	100,000	100,000	100,00	30,000
Katılaştırıcı ajan					
Agar (mikrobiyolojik kullanım için)	7,400	7,800	7,800	7,400	7,400
pH	6.00	5.8	5.8	5.5	6.0

2.4 Donör ve Doku Kültürü Kaynaklı Çiv Bitkilerinde Ploidi Seviyesi Tespiti

In vitro açamamış tomurcuk kültürlerinden elde edilen çiv bitkilerinde hücre çekirdeği DNA miktarı ve ploidi tespiti Alan ve diğ. (2016) tarafından yayınlanan protokole göre yapılmıştır. İçsel kontrol olarak arpa (*Hordeum vulgare*) fidelerinden alınan yaprak dokuları kullanılmıştır. Arpa çekirdek DNA miktarı 10,1 pg/2C olarak rapor edilmiştir (Arumuganathan ve Earle, 1991). Analiz amacı ile çiv ve arpa bitkilerinden 50 mg kadar yaprak örnekleri alınıp buz kutusuna yerleştirilmiş olan 60 x 15 mm'lik Petri tabaklarına konmuştur. Yaprak örnekleri 1.5 ml soğuk çekirdek DNA izolasyon solüsyonu (NIB) eklendikten sonra yeni jilet ile ince şeritler halinde doğranmıştır. Örnekler yaprak parçalarının uzaklaştırılması amacı ile 45 µm'lik naylon filtreden geçirilerek 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerinde toplanmıştır. Tüplerdeki çekirdek DNA örnekleri 1 mg/ml olarak hazırlanmış propidium iodide stokundan 5 µl alınarak boyanmışlardır. Örnekler 30 saniye kadar vortekslenmiş ve sonra okuma tüplerine transfer edildikten sonra Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC marka flow cytometri cihazında analiz edilmişlerdir. Örneklerin çekirdek DNA miktarları Alan ve diğ. (2016) tarafından önerilen formüle göre tespit edilmiştir.

2.5 Üretilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılarak Büyütülmeleri

Kültürlerden elde edilen ginogenik ve somatik kökenli bitkilerin dış ortama alıştırmaları işleminde kullanılması amacıyla 2:1 oranında torf ve perlite oluşturulan karışım otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Bitkiler tüplerden çıkarıldıktan sonra çeşme suyu ile iyice yıkanarak besi ortamından arındırılmış ve steril karışım ile doldurulan plastik saksılara şaşırtılmışlardır. Bu saksılar steril su ile sulandıktan sonra naylon poşetler ile örtülmüşlerdir. Bitki aktarılan saksılar 17 °C ve 18 saat ışığa ayarlanmış büyütme kabineye yerleştirilmiştir. Aktarımdan bir hafta sonra naylon poşette küçük delikler açılarak bitkilerin dış ortama alışmaları hızlandırılmıştır. İki hafta sonrada poşetler tamamen kaldırılmıştır. Bitkiler bu ortamda yaklaşık iki ay daha tutulmuşlardır. Daha sonra iyi gelişim gösteren bitkiler ısıtmasız cam seraya aktarılmışlardır. Serada büyütülen bitkiler haftalık olarak gözlemlenerek morfolojik özellikleri kayıt altına alınmıştır.

2.6 Donör Genotiplerine Ait Çiçeklerde Yapılan Gözlemler

Antesis aşamasında bulunan çiv çiçeklerinde anterlerin morfolojisi, anterlerde polen üretilip üretilmediği ve üretilen polenlerde canlılık oranları test edilmiştir. Polen canlılığının tespiti amacı ile rastgele seçilmiş olan beş çiçekten alınan anterler bir cam slayt üzerine konmuş birkaç damla %1'lik asetokarmin solüsyonu içinde ezilmiştir. Daha sonrada polen canlılık yüzdeleri bir ışık mikroskopi yardımı ile sayılmıştır. Bu testlerde tüm donörlerin polenlerinde >% 90 canlılık tespit edilmiştir. Bu bitkilerin üzerinde bırakılan umbellerden çok sayıda kendilenmiş tohum üretilmiştir.

2.7 Doku Kültürü Ortamlarında Üretilmiş Olan Bitkilerde Yapılan Gözlemler

Dış ortama aklimatize edilen ginogenik ve somatik kökenli bitkiler toprak üstü vegetatif organları için gözlemlenmişlerdir.

2.8 İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin istatistiksel analizleri ANOVA ile yapılmıştır. Bitki rejenerasyonu oranları (ginogenik ve somatik) kültürdeki çiçek tomurcuğu sayısına göre hesap edilmiştir. Aynı medya kompozisyonuna sahip ve aynı genotipten elde edilmiş eksplantlarla oluşturulmuş petriler bir replikasyon ünitesi olarak kabul edilmiştir. Çalışmada elde edilcek olan ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan testine ($p=0.05$) göre test edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Donör Çiv Genotiplerine Ait Açmamış Çiçek Tomurcuklarının Uyartım Ortamlarında Gösterdikleri Cevaplar

Çiçek tomurcuğu kültürü uygulamasının başlamasından birkaç gün sonra uyartım ortamına yerleştirilen çiçeklerin yumurtalık kısımları irileşmeye başlamış ve iki haftalık süre içerisinde son halini almıştır. Tomurcuklarda gözlemlenen ilk gelişim tomurcuk tabanından kallus gelişimidir. Somatik dokulardan gelişen kalluslar altıncı haftadan itibaren belirgin hale gelmişlerdir. İlk ginogenik cevaplar kültür başlangıcından yaklaşık üç ay sonra görülmeye başlamıştır. Somatik kökenli kallus yapıları üzerinde farklılaşarak oluşan somatik meristemlerin gelişmesi ile kökü bulunmayan sürgünler oluşmuştur. Ginogenik bitkicikler çiçek tomurcuklarının içinden, yumurtalıkların bulunduğu bölmelerden çıkmışlardır. Ginogenik bitkicikler yeni çimlenmekte olan fideler gibi kök ve yapraktan oluşmuşlardır. Doku kültürü ortamlarında ginogenik veya somatik sürgün cevabı gösteren tomurcukların EM ortamı içeren petri tabaklarına alınmasından sonra rejenerantların gelişimi hızlanmıştır. Çalışmada yer alan çiv genotiplerinin dört uyartım ortamlarında gösterdikleri cevaplarda farklılıklar gözlemlenmiştir. Tüm çiv genotiplerinde ginogenesis ve somatik sürgün uyartımı sağlanmıştır. Bununla beraber dört ıslah hattından yeşil yapraklı ve köklü ginogenik bitkiler elde edilirken Twiggy çeşidine ait çiçek tomurcukları ile kurulan kültürlerinden elde edilen tek ginogenik bitkicik gelişimine devam edemediği için kaybedilmiştir. Somatik sürgün rejenerasyonu gösteren tomurcuklar EM ortamı içeren petri tabaklarına alındıktan sonra daha hızlı gelişmeye başlamışlardır. Bu tez çalışmasında yer verilen beş çiv genotipinde köklü somatik bitkiler elde edilmiştir.

3.2 Açmamış Çiçek Tomurcuğu Kültürlerinden Gözlemlenen Ginogenesis Cevabı

Kültüre alınan Asch1 çiçek tomurcuklarından altı adedinde (%0.47) ginogenesis cevabı gözlenmiştir. Bu tomurcuklardan yedi bitkicik (%0.58) izole edilmiştir. Bunlardan toplam altı adet ginogenik bitki gelişmiştir. Asch1 tomurcukları en yüksek ginogenesis cevabı %1.11 ile MMS1 ortamında göstermiştir. Bunu %0.83 ile MMS2 ve %0.37 ile BDS ortamlarına ekilen tomurcuklar izlemiştir. MB5 ortamında kültüre alınan Asch1 tomurcuklarında ginogenesis cevabı gözlemlenmemiştir.

Asch2 çiçek tomurcuk kültürlerinde 12 adet (%0.33) ginogenesis cevabı gösteren tomurcuk belirlenmiştir. Bu kültürlerden 13 adet (%0.35) ginogenik bitkicik izole edilmiştir. Ginogenik bitkiciklerin tümü gelişerek bitki haline dönüşmüştür. Bu genotipe ait tomurcuklarla tez çalışmasında kullanılan dört uyartım ortamından da ginogenesis cevabı alınmıştır. Asch2 çiçek tomurcukların elde edilen en yüksek ginogenik bitkicik oranları MMS1 (%0.61) ve MB5 (%0.44) kültürlerinde gözlemlenmiştir. MMS2 (%0.28) ve BDS (%0.09) ortamlarında kültüre alınan genotipe-2 çiçek tomurcuklarında elde edilen ginogenesis cevabı daha düşük olarak gerçekleşmiştir.

Asch3 tomurcukları çalışmada kullanılan dört uyartım ortamının üçüne ginogenesis cevabı göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen en yüksek ginogenesis cevabı Asch3 tomurcuklarından elde edilmiştir. Kültüre alınan toplam 480 tomurcuktan 12 adeti (%2.50) ginogenik cevap göstermiştir. Bu tomurcuklardan 14 adet (%2.92) bitkicik izole edilmiştir. Bitkiciklerden dokuz adeti (%1.88) gelişmeye devam etmiştir. Elde edilen en yüksek ginogenik bitkicik oranı (%8.33) MB5 ortamında gerçekleşmiştir. MMS1 ortamına ekilen Asch3 tomurcukları ginogenesis uyartımına cevap yönünden %2.50 ile ikinci sırada yer almışlardır. Aynı genotipe ait tomurcukların BDS ortamında kültüre alınması ile %0.83 oranında ginogenik bitkicik eldesi sağlanmıştır. MMS2 ortamına ekilen Asch3 tomurcuklarında ginogenesis cevabı gözlemlenmemiştir.

Asch4 tomurcukları dört uyartım kültüründe de ginogenesis cevabı göstermişlerdir. Göstermiş oldukları cevap oranı açısından Asch3 tomurcuklarını takip

etmişlerdir. Kültüre konulan toplam 1290 tomurcuktan 15 adedinde (%1.30) 16 adet (%1.34) bitkicik bulundurduğu tespit edilmiştir. Bitkiciklerden 12 adeti (%0.90) gelişmeye devam ederek ginogenik bitkicik haline dönüşmüştür. Bu genotiple kurulan kültürler arasında en yüksek ginogenesis oranı %2.38 ile MMS1 ortamında gözlemlenmiştir. BDS ve MMS2 kültürlerinde %1.00 civarında cevap gözlemlenirken, MB5 ortamına konulan tomurcuklardan %0.83 oranında cevap elde edilmiştir. MB5 ortamında elde edilen iki ginogenik bitkicik gelişim göstermemiştir.

Bu tez çalışmasında yer verilen genotipler arasında en düşük ginogenesis cevabı Twiggy çeşidine ait tomurcuk kültürlerinde gözlemlenmiştir. Bu genotipe ait toplam 960 tomurcuğun kültüre konmasından sadece bir adet (%0.04) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. BDS ortamında uyartılan tek ginogenik bitkicik gelişime devam edememiş ve kaybedilmiştir.

3.3 Açmamış çiçek tomurcuğu kültürlerinden ele edilen somatik bitkiler

Kültüre konulan Asch1 tomurcuklarından üç adet (% 0.32) somatik sürgün elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler sadece MMS2 ortamına ekilen tomurcuklardan üretilmiştir.

Asch2 çiçek tomurcuk kültürlerinden 58 adet (%1.91) somatik sürgün elde edilmiştir. MMS2 ortamına konan Asch2 tomurcuklarından %6.67'sinde somatik sürgün gelişimi gerçekleşmiştir. Asch2 tomurcukları iki ortamda da (MMS1 ve BDS) düşük oranlarda (%0.61 ve %0.36) somatik sürgün oluşturmuşlardır. MB5 ortamında ise somatik sürgün gelişimi sağlanamamıştır.

Dört ortama konan toplam 480 Asch3 çiçek tomurcuğundan sadece bir adet (%0.42) somatik sürgün gelişmiştir. Elde edilen tek somatik bitki BDS ortamında üretilmiştir.

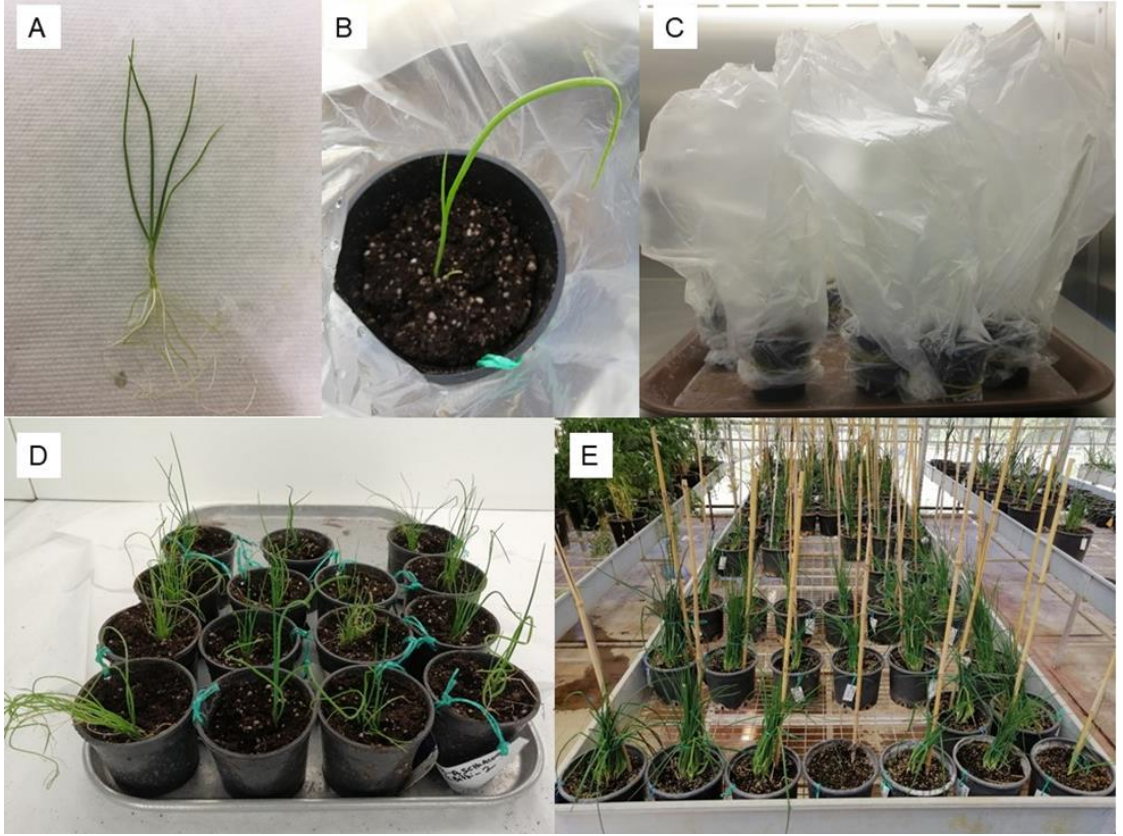
Toplam 1290 Asch4 çiçek tomurcuğundan 16 adet (%1.47) somatik sürgün gelişmiştir. MMS2 bu genotipe ait tomurcukların %2.96 ile en yüksek oranda sürgün oluşturduğu ortam olmuştur. MMS1 ortamı MMS2 ortamına yakın oranda somatik

rejenerasyon uyarımı sağlamıştır. BDS ortamında %0.53 oranında somatik sürgün gelişimi elde edilirken MB5 ortamında somatik sürgün üretimi mümkün olmamıştır.

Twiggy çeşidine ait çiçek tomurcuklarından çok düşük oranda (%0.25) somatik sürgün gelişimi gözlenmiştir. MMS2 ve BDS ortamlarına ekilmiş olan Twiggy tomurcuklarından birer adet somatik sürgün elde edilirken diğer iki ortamda somatik rejenerasyon gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.1. Tüm açmamış çiçek kültürü ile *in vitro* ginogenesis uyarımı ve ginogenik çiv bitkisi üretimi. A. Uyarım ortamına ekilmiş olan çiv çiçek tomurcuk eksplantları. B. Uyarım kültüründe tomurcuktan dışarı çıkan ginogenik bitkicik. C. Gelişimine tüpte devam eden ginogenik çiv bitkisi.



Şekil 4.2. *In vitro*'da üretilmiş olan çiv bitkilerinin dış ortama aklimatizasyonu. A. Kültür tüpünden çıkarıldıktan sonra kökleri musluk suyu ile yıkanmış ginogenik bitki. B. Çiv bitkisinin steril torf ve perlit karışımı bulunduran plastik saksıya aktarımı ve steril su ile sulanması. C. Saksıya aktarılmış çiv fidelerinin plastik sandviç poşetleri ile örtülmesi. D. Saksılara aktarıldıktan sonra kontrollü iklimlendirme kabininde dış ortama alıştırmış çiv bitkileri E. Isıtmasız cam serada büyütülen ginogenik ve somatik çiv bitkileri.

Tablo 3.1. Çiv donör genotiplerinde ginogenesis uyarımı

Donör genotip	Medyum	Tomurcuk no.	Cevap veren tomurcuk (%)	Ginogenik bitkicik (%)	Ginogenik bitki (%)
Asch1	BDS	270	1 (0.37) a	1 (0.37) a	0 a
	MMS1	360	4 (1.11) a	4 (1.11) a	4 (1.11) a
	MMS2	240	1 (0.42) a	2 (0.83) a	2 (0.83) a
	MB5	300	0 a	0 a	0 a
Toplam		1170	6 (0.47)	7 (0.58)	6 (0.47)
Asch2	BDS	1110	1 (0.09) a	1 (0.09) a	1 (0.09) a
	MMS1	990	5 (0.51) a	6 (0.61) a	6 (0.61) a
	MMS2	720	2 (0.28) a	2 (0.28) a	2 (0.28) a
	MB5	900	4 (0.44) a	4 (0.44) a	4 (0.44) a
Toplam		3720	12 (0.33)	13 (0.35)	13 (0.35)
Asch3	BDS	120	1 (0.83) a	1 (0.83) a	1 (0.83) a
	MMS1	120	3 (2.5) a	3 (2.50) a	2 (1,67) a
	MMS2	120	0 a	0 a	0 a
	MB5	120	8 (6.67) a	10 (8.33) a	6 (5.00) a
Toplam		480	12 (2.50)	14 (2.92)	9 (1.88)
Asch4	BDS	570	5 (0.88) a	6 (1.05) a	6 (1.05) a
	MMS1	210	5 (2.38) a	5 (2.38) a	3 (1.43) a
	MMS2	270	3 (1.11) a	3 (1.11) a	3 (1.11) a
	MB5	240	2 (0.83) a	2 (0.83) a	0 a
Toplam		1290	15 (1.30)	16 (1.34)	12 (0.90)
Twiggy	BDS	660	1 (0.15) a	1 (0.15) a	0 a
	MMS1	90	0 a	0 a	0 a
	MMS2	120	0 a	0 a	0 a
	MB5	90	0 a	0 a	0 a
Toplam		960	1 (0.04)	1 (0.04)	0
Genel toplam		7620	46 (0.60)	51 (0.67)	40 (0.53)

Tablo 3.2. Çiv donör genotiplerine ait tomurcuk eksplantlarından elde edilen somatik bitkiler

Donör genotip	Medyum	Tomurcuk no.	Somatik bitki (%)
Asch1	BDS	270	0 a
	MMS1	360	0 a
	MMS2	240	3 (1.25) a
	MB5	300	0 a
Toplam		1170	3 (0.32) a
Asch2	BDS	1110	4 (0.36) a
	MMS1	990	6 (0.61) a
	MMS2	720	48 (6.67) a
	MB5	900	0 a
Toplam		3720	58 (1.91)
Asch3	BDS	120	1 (1.67) a
	MMS1	120	0 a
	MMS2	120	0 a
	MB5	120	0 a
Toplam		480	1 (0.42)
Asch 4	BDS	570	3 (0.53) a
	MMS1	210	5 (2.38) a
	MMS2	270	8 (2.96)a
	MB5	240	0 a
Toplam		1290	16 (1.47)
Twiggy	BDS	660	1 (0.15) a
	MMS1	90	0 a
	MMS2	120	1 (0.83) a
	MB5	90	0 a
Toplam		960	2 (0.25)
Genel toplam		7620	80 (1.05)

3.4 Donör ve Doku Kültürü Kaynaklı Çiv Bitkilerinde Ploidi Seviyesi Tespiti

Bu çalışmada çiçek tomurcuğu olarak kullanılan beş donör bitkinin ve doku kültürü uygulamalarında üretilen 40 ginogenik 80 somatik çiv bitkisinin çekirdek DNA miktarları ve ploidi seviyeleri Flow sitometri analizi ile tespit edilmiştir. Donör çiv bitkilerinin 16.98 ± 0.23 pg/2C çekirdek DNA miktarlarına sahip oldukları bulunmuştur. Bu değer diploid çiv bitkisi için Jones ve Rees (1968) tarafından rapor edilen 16.90 pg/2C değerle çok yakındır. Analiz edilen 40 ginogenik çiv bitkilerinin 36 adetinin (%90) 16.48 ± 0.96 pg DNA/2C çekirdek DNA'sına sahip oldukları tespit edilmiştir. Üç ginogenik bitkinin (%7.5) 30.83 ± 1.39 pg DNA/2C sahip olmaları nedeni ile tetraploid (4n) oldukları bulunmuştur. Bir ginogenik bitkinin benzer miktarlarda haploid (8.86 pg) ve diploid (15.47 pg) DNA miktarlarına sahip olan bir mixoploid (n+2n) olduğu tespit edilmiştir. Analiz edilen somatik bitkilerin 17.18 ± 1.29 pg DNA/2C çekirdek DNA'sına sahip oldukları ve hepsinin diploid oldukları tespit edilmiştir.

3.5 Çiçek Tomurcuğu Kültürlerinden Üretilen Bitkilerin Aklimatize Edilmesi

Çiv çiçek tomurcuğu kültürlerinden elde edilen ve ploidi seviyeleri tespit edilmiş olan 40 ginogenik ve 80 somatik kökenli bitki *in vivo*'ya aktarılmıştır. Aktarım işleminden sonra 19 diploid ve üç tetraploid ginogenik bitki büyümeye devam etmiştir. Bununla beraber 17 diploid ve bir mixoploid ginogenik bitki büyütme kabini ve serada yetiştirilme işlemleri sırasında kaybedilmiştir. Somatik kökenli bitkilerin 37 adeti (%46.25) dış ortama aktarım işleminden sonra büyümeye devam etmiş diğerleri ise kaybedilmiştir.

3.6 Doku Kültürü Ortamlarında Üretilmiş Olan Bitkilerde Yapılan Gözlemler

3.6.1 Ginogenik bitkilerin vejetatif özellikleri

Asch1 donöründen elde edilen iki diploid bitkinin bitki boyu ~50 cm olarak ölçülmüştür. Bu bitkilerde üç ile beş arasında yalancı gövde gelişmiştir. Bu bitkilerin yalancı gövde uzunlukları 5 ile 6 cm ve çapları 4.22 ile 5.22 mm olarak ölçülmüştür. Gözlem zamanında bu bitkilerde 19 ile 23 yaprak sayılmıştır. Bu bitkilerde en yaşlı yaprakların 43 ile 44 cm uzunluğunda ve 3.04-4.48 mm çapında olduğu tespit edilmiştir.

Asch2 donöründen elde edilen altı diploid bitkinin boyları 43 ile 52 cm arasında ölçülmüştür. Bu diploid bitkilerin 4 ile 14 arasında yalancı gövdeye sahip oldukları, yalancı gövdelerin 2 ile 5 cm uzunluğunda ve 4.05 mm ile 8.28 mm çapında olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerde 12 ile 56 yaprak sayılmıştır. En yaşlı yaprakların uzunluklarının 34 ile 47 cm arasında, çaplarının da 3.66 ile 4.45 mm arasında olduğu belirlenmiştir. Bu genotipten üretilen iki tetraploid ginogenik bitkiler birbirinden farklı gelişim göstermişlerdir. Tetraploid bitkilerin uzunlukları 20 ve 48 cm olarak ölçülmüştür. Bu bitkilerde 3 ve 4 yalancı gövde sayılmıştır. Yalancı gövdelerin 2 ve 3 cm uzunluğunda ve çaplarının 5.11 ve 5.84 mm olduğu tespit edilmiştir. Yaprak özellikleri açısından farklılıkların görüldüğü tetraploid ginogenik bitkilerde 10 ve 13 adet yaprak sayılmıştır. En yaşlı yaprakların uzunlukları 18 ve 45 cm, çapları ise 3.42 ve 5.59 mm olarak ölçülmüştür.

Asch3 donöründen üretilmiş olan altı diploid bitkinin uzunlukları 43.50 ve 69 cm arasında ölçülmüştür. Bu grupta yer alan bitkilerin yalancı gövde sayısının 7 ile 30 arasında olduğu belirlenmiştir. Yalancı gövde uzunlukları 2.50 ile 6 cm arasında çapları ise 4.15 ile 12.64 mm arasında tespit edilmiştir. Bu bitkilerde yaprak sayıları 14 ile 119 adet olarak değişiklikler göstermiştir. En uzun yaprakların uzunluğu 41 ile 65 cm, çaplarının ise 2.82 ile 5.32 mm arasında olduğu tespit edilmiştir.

Asch4 kültürlerinden üretilen sekiz diploid ve bir adet tetraploid ginogenik bitkide sayımlar ve ölçümler yapılmıştır. Bu genotipten elde edilen diploid bitkilerin

boyları 29 ile 55 cm arasında ölçülmüştür. Diploid bitkilerde yalancı gövde sayıları 2 ile 25, uzunlukları 1 ile 8 cm, çapları ise 2.18 ile 8.13 mm olarak belirlenmiştir. Bu bitkilerde 2 ile 97 yaprak sayılmıştır. En yaşlı yaprakların uzunluklarının 23 ile 50 cm arasında, çaplarının ise 1.18 ile 7.25 mm arasında olduğu belirlenmiştir. Bu genotipten üretilen bir tetraploid ginogenik bitkinin uzunluğu 52 cm olarak ölçülmüştür. Bu bitkide altı yalancı gövde gelişmiştir. Yalancı gövdelerin 5 cm uzunluğunda ve 8.51 mm çapında olduğu tespit edilmiştir. Bu tetraploid ginogenik bitkide 27 yaprak sayılmıştır. Bu bitkinin en yaşlı yaprağının uzunluğunun 47 cm ve çapının ise 4.42 mm olduğu belirlenmiştir.

3.6.2 Somatik bitkilerin vejetatif özellikleri

Asch1 donöründen elde edilen iki somatik bitkinin bitki boyları 60 ve 70 cm olarak ölçülmüştür. Bu bitkilerde 11 ile 16 arasında yalancı gövde sayılmıştır. Bu bitkilerin yalancı gövde uzunlukları 5 ile 6 cm ve çapları ise 5 mm olarak ölçülmüştür. Gözlem zamanında bu bitkilerde 61 ile 81 adet yaprak sayılmıştır. Bu bitkilerde en yaşlı yaprakların 54 ile 65 cm uzunluğunda ve 2 mm çapında olduğu tespit edilmiştir.

Asch2 donörüne ait tomurcuklardan üretilip büyütülen 31 somatik bitkinin boylarının 43 ile 74 cm arasında olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerin 2 ile 27 arasında yalancı gövdeye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu bitkilerin yalancı gövde uzunluklarının 1.50 ile 6 cm ve çaplarının ise 2 ile 5 mm çapında olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerde yapılan sayımında 8 ile 103 arasında yaprak bulunduğu tespit edilmiştir. Bunların yaşlı yaprakların uzunluklarının 43 ile 70 cm arasında, çaplarının da 1.50 ile 4 mm arasında olduğu belirlenmiştir.

Asch3 tomurcuk kültürlerinden elde edilen iki somatik bitkinin uzunlukları 24 ve 53 cm olarak ölçülmüştür. Bu somatik bitkilerin yalancı gövde sayısı 9 ve 11 olarak kayıt edilmiştir. Bitkilerin yalancı gövde uzunluklarının 3 ve 4 cm, çaplarının ise 3 ve 4 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerde 25 ve 29 adet yaprak sayılmıştır. En uzun yaprakların uzunluğunun 19 ve 50 cm, çaplarının ise 3 ve 4 mm olduğu belirlenmiştir.

Twiggy kültürlerinden üretilen iki somatik bitkinin boyları 52 ve 56 cm olarak ölçülmüştür. Bu bitkilerin yalancı gövde sayıları 4 ve 8, uzunlukları 3 ve 4 cm, çapları

ise 4 ve 5 mm olarak ölçülmüştür. Twiggy çeşidine ait somatik bitkilerde 20 ve 34 adet yaprak sayılmıştır. En yaşlı yaprakların uzunluklarının 49 ve 52 cm arasında, çaplarının da 3 ve 4 mm arasında oldukları belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Ginogenik çiv bitkilerinin toprak üstü özellikleri

Donör genotip	Ginogenik bitki no.	Ploidi seviyesi	Tam bitki boyu (cm)	Yalancı gövde sayısı	Yalancı gövde uzunluğu (cm)	Yalancı gövde çapı (mm)	Yaprak sayısı	En yaşlı yaprak boyu (cm)	En yaşlı yaprak çapı (mm)
Asch1	1	2n	49.00	3	5.00	4.23	19	44.00	4.48
	2	2n	49.00	5	6.00	5.22	23	43.00	3.04
Ortalama			49.00	4	5.50	4.73	21	43.50	3.76
Asch2	1	2n	43.00	6	3.00	4.08	23	40.00	4.00
	2	2n	52.00	6	5.00	8.28	36	47.00	4.20
	3	2n	52.00	4	5.00	4.60	13	47.00	4.45
	4	2n	50.00	7	4.00	5.20	28	46.00	3.74
	5	2n	36.00	4	2.00	4.12	12	34.00	4.00
	6	4n	48.00	4	3.00	5.11	10	45.00	3.42
	7	4n	20.00	3	2.00	5.84	13	18.00	5.59
	8	2n	47.00	14	5.00	5.20	56	42.00	3.66
Ortalama			43.50	6	3.63	5.30	23.88	39.88	4.13
Asch3	1	2n	64.00	15	6.00	8.22	64	58.00	5.32
	2	2n	56.00	23	4.00	5.81	64	52.00	3.70
	3	2n	56.75	7	3.50	6.67	14	53.00	5.25
	4	2n	43.50	22	2.50	4.15	76	41.00	2.82
	5	2n	69.00	24	4.00	9.12	100	65.00	5.26
	6	2n	56.00	30	5.00	12.64	119	51.00	4.20
Ortalama			61.25	20.17	4.00	7.77	72.83	53.33	4.47
Asch4	1	2n	51.00	25	6.00	5.23	97	45	5.14
	2	2n	50.00	9	3.00	7.03	47	47	7.25
	3	2n	52.00	17	5.00	8.13	48	47	4.64
	4	2n	24.00	1	1.00	2.18	2	23	1.18
	5	2n	55.00	6	5.00	6.38	13	50	6.33
	6	4n	52.00	6	5.00	8.51	27	47	4.42
	7	2n	41.00	15	4.00	4.14	72	37	2.69
	8	2n	53.00	18	8.00	6.37	74	45	2.36
	9	2n	29.00	2	1.00	3.18	10	28	3.00
Ortalama			45,22	11	4.00	5.68	43.33	41	4.25

Tablo 3.4. Somatik çiv bitkilerinin toprak üstü özellikleri

	En yaşlı	En yaşlı
--	----------	----------

Donör genotip	Somatik bitki no.	Ploidy seviyesi	Tam bitki boyu (cm)	Yalancı gövde sayısı	Yalancı gövde uzunluğu (cm)	Yalancı gövde çapı (mm)	Yaprak sayısı	yaprak boyu (cm)	yaprak çapı (mm)
Asch1	1	2n	60.00	16	6.00	5.00	81	54.00	2.00
	2	2n	70.00	11	5.00	5.00	61	65.00	2.00
Ortalama			65.00	13.50	5.50	5.00	71	59.5	2.00
Asch2	1	2n	59.00	2	4.00	4.00	10	55.00	2.00
	2	2n	52.00	4	3.00	3.00	18	49.00	3.00
	3	2n	46.00	4	4.00	3.00	18	42.00	4.00
	4	2n	64.00	5	6.00	2.00	18	58.00	4.00
	5	2n	42.00	2	2.00	2.00	8	40.00	2.00
	6	2n	43.00	3	3.00	3.00	23	40.00	2.00
	7	2n	49.00	3	2.00	2.00	17	47.00	2.00
	8	2n	63.00	3	4.00	5.00	11	58.00	3.00
	9	2n	63.00	7	4.00	5.00	25	59.00	3.00
	10	2n	52.00	4	4.00	5.00	20	48.00	2.00
	11	2n	62.00	4	5.00	3.00	27	57.00	2.00
	12	2n	56.00	4	2.00	2.00	20	54.00	2.00
	13	2n	60.00	3	2.00	5.00	22	58.00	3.00
	14	2n	56.00	6	3.00	5.00	33	53.00	2.00
	15	2n	45.00	2	2.00	3.00	9	43.00	2.00
	16	2n	50.00	4	3.00	2.00	14	47.00	2.00
	17	2n	50.50	4	1.50	2.00	17	49.00	1.50
	18	2n	54.00	3	3.00	4.00	22	51.00	4.00
	19	2n	60.00	7	2.00	3.00	32	58.00	2.00
	20	2n	50.00	4	2.00	5.00	31	48.00	1.50
	21	2n	60.00	6	2.00	4.00	28	58.00	2.00
	22	2n	48.00	7	3.00	2.00	55	45.00	1.50
	23	2n	61.00	13	6.00	3.00	65	55.00	3.00
	24	2n	64.00	21	4.00	3.00	57	60.00	2.00
	25	2n	58.00	10	4.00	2.00	45	54.00	2.00
	26	2n	55.00	13	3.00	3.00	60	52.00	3.00
	27	2n	74.00	20	4.00	4.00	75	70.00	3.00
	28	2n	59.00	16	4.00	4.00	34	55.00	3.00
	29	2n	57.00	6	3.00	5.00	29	54.00	4.00
	30	2n	69.00	27	4.00	3.00	89	65.00	3.00
	31	2n	68.00	24	3.00	3.00	103	65.00	3.00
Ortalama			56.63	7.77	3.27	3.35	33.38	53.13	2.53
Asch3	1	2n	24.00	11	4.00	3.00	29	19.00	4.00
	2	2n	53.00	9	3.00	4.00	25	50.00	3.00
Ortalama			38.5	10	3.50	3.50	27	34.50	3.50
Twiggy	1	2n	56.00	8	4.00	5.00	34	52.00	4.00
	2	2n	52.00	4	3.00	4.00	20	49.00	3.00
Ortalama			54.00	6	3.50	4.50	27	50.50	3.50

4. TARTIŞMA

Bu tez projesi çiv türünde ginogenesis temelli haploidizasyon tekniğinin uygulanabilme potansiyelinin araştırılması amacı ile gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuçlar çiv genotiplerinin açmamış tüm çiçeklerin uyartım ortamlarında kültüre alınması ile ginogenik bitkilerin elde edilebileceğini göstermiştir. Projede yer verilen beş çiv genotipinden (dört OP seleksiyon ıslah hattı ve bir OP ticari çeşit) elde edilen ginogenesis cevapları düşük (% 0.35) ile orta düzey (% 2.92) arasında gerçekleşmiştir. Projede kullanılan uyartım ortamlarının ginogenesis cevabı üzerine önemli etkileri olduğu görülmüştür. Çiçek donörü genotiplerinden elde edilen ginogenik bitkicik üretim oranları uyartım ortamlarına göre önemli düzeyde farklılıklar göstermiştir. Ginogenesis uyartım deneylerinde en yüksek ginogenesis cevabı (%8.33) MB5 ortamına ekilmiş olan Asch3 tomurcuklarından elde edilmiştir. Üç genotipte (Asch1, Asch2 ve Asch 4) ise en yüksek cevaplar (%1.11, 0.61 ve 2.38) MMS1 ortamında kültüre konan tomurcuklardan elde edilmiştir. Projede yer verilen ticari çiv çeşidi olan Twiggy'ye ait tomurcuklardan sadece BDS ortamında bir adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu projede dört seleksiyon genotipinden toplam 40 yeşil ve köklü ginogenik bitki üretilmiştir. Flow sitometri ile yapılan analizler ginogenik çiv bitkilerin büyük bir kısmının diploid olduklarını ortaya çıkarmıştır. Bunun dışında üç adet tetraploid ve bir adet miksoploid ($n+2n$) ginogenik bitki tespit edilmiştir. Projede yer alan tüm çiçek tomurcuğu donörü genotiplerinden somatik bitkilerde üretilmiştir. Donör bitki ile genetik olarak aynı (klonal) olan somatik bitkilerin tamamının diploid oldukları tespit edilmiştir.

Farklı zamanlarda dış ortama aktarılmış olan bitkilerin gelişim performanslarının kayıt altına alınması amacı ile toprak üstü aksamaları ile ilgili veriler toplanmıştır. Miksoploid ve bazı diploid bitkilerin dış ortama alındıktan sonraki süreçte kurudukları tespit edilmiştir. Tüm ginogenik ve somatik kökenli çiv bitkileri bitki uzunluğu, yalancı gövde (sayısı, uzunluğu ve çapı), yaprak sayısı, en yaşlı yaprak uzunluğu ve çapı özellikleri açısından değerlendirilmişlerdir. Serada büyümeye devam eden bitkilerin önümüzdeki süreçte normal gelişimlerine devam etmesi, çiçeklenmesi ve tonum üretimi için kendilenmesi işlemleri devam etmektedir.

Allium'larda ginogenesis temelli haploidizasyon uyartımı çalışmaları 1980'li yıllarından itibaren rapor edilmeye başlanmıştır. Keller ve Korzun (1996) *Allium* türlerinde androgenesis temelli haploidizasyon uyartımının başarılı olmadığını rapor etmiştir. Aynı araştırmacılar bu türlerde haploidizasyon uyartımı için ginogenesis yönteminin kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Ginogenesis temelli haploidizasyon yönteminin *Allium*'larda en başarılı olarak uygulandığı tür soğan (*A. cepa*)'dır. Bu diploid türde ilk başarılı haploid bitki üretme çalışmaları 1980'li yılların sonlarından itibaren yayınlanmaya başlamıştır (Muren, 1989; Campion ve Alloni, 1990; Keller, 1990). Günümüzde ıslah çalışmalarına entegre edilmiş katlanmış haploid soğan üretim protokolü mevcuttur. Soğan dışında çok az sayıda *Allium* türünde haploidizasyon çalışması yayınlanmıştır. Ginogenesis temelli haploidizasyon uygulamasının başarılı olarak uygulandığı diğer bir önemli *Allium* türü pırasa (*A. ampeloprasum*)'dır. Alan ve diğ. (2016) tetraploid olan bu türde yeşil dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. Diğer bir tetraploid tür olan Çin çivi (*A. tuberosum*) türünde yüksek oranda ginogenesis cevabı göstermesine rağmen rejenere edilen bitkiler arasında dihaploid olanların oranının çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Kojima ve Kawaguchi, 1989). Diploid bir tür olan çiv türünde daha önceden gerçekleştirilmiş olan ginogenesis uyartımı çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada ginogenesis uyartımı işleminin çiv türünde etkinliği araştırılmış ve yer verilen tüm genotiplerde uyartım sağlanmıştır.

Allium türlerinde çiçek tomurcuğu donörü genotiplerin ginogenesis cevabı üzerinde önemli etkisi olduğu bildirilmiştir. Soğan türünde bazı genotiplerden yüksek oranda ginogenik bitki elde edilirken, bazı çeşitlerin rekalsitrant olduğu tespit edilmiştir (Alan ve diğ., 2004; Anandan ve diğ., 2014, Bohanec, 2002). Pırasada yapılan ilk ginogenesis uyartımı çalışmalarında elde edilen bitkiler arasında çok sayıda albino ortaya çıkması bu yöntemin uygulanması önünde önemli bir sorun olarak görülmüştür. Alan ve diğ. (2016) tarafından yayınlanan çalışmada elde edilen bulgular pırasa türünde çiçek donörü genotiplerin ginogenesis cevabı ve elde edilen dihaploid bitki oranları üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur.

Haploidizasyon tekniğinin, çiv gibi ıslahçıların çok az ilgisini çeken türlerde, ıslah programlarına dahil edilmesi ile yeni çeşit geliştirmeye yönelik olarak homozigot hatların üretimi çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Diğer *Allium* türlerinde olduğu gibi çiv türünde klasik kendileme yöntemi ile saf hatların geliştirilmesi çok uzun yıllar

alabilir. Ginogenesis yöntemi ile üretilen DH bitkiler tüm özellikler açısından homozigot oldukları için çiv türünde ıslah sürecinin birkaç yıla indirilmesini sağlayabilirler.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında tüm çiçek tomurcuğu eksplantlarının farklı uyartım ortamlarında kültüre alınması ile çiv genotiplerinden ginogenik ve somatik bitkinin üretilebileceği gösterilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada elde edilen sonuçlar çiv türünde soğan türünde olduğu gibi hızlandırılmış ıslah projelerinin oluşturulabileceğini göstermiştir. Günümüze kadar haploidizasyon tekniğinin uygulanabildiği 300 civarında türde uygulanabildiği bilinmektedir (Dunwell, 2010). Bu tez çalışması ile ginogenesis temelli haploidizasyon tekniğinin çiv türünde uygulanabildiği gösterilmiştir. DH bitkiler tarımı yapılan türlerde agronomik özellikleri kontrol eden genlerin haritalanması, genom sekanslarının tespit edilmesi, gen ifadesinin kontrol mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında ve hatta DNA dizisi sevişinde değişikliğe uğratılması çalışmaları için eşsiz materyaller olarak kullanılabilirler.

6. 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 Science, 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 Science, 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 Science, 173,25-31, (2007).
- Alan, A. R., Toprak, F. C. and Kaska, A. Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 125(2), 249-259, (2016).
- Anandan, 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 Journal of Genetics and Plant Breeding, 74 (4), 526-528, (2014).
- Arumuganathan, K. and Earle, E.D., “Nuclear DNA content of some important plant species by flow cytometry”, Plant Molecular Biology Reporter 9, 208–218, (1991).
- Bohanec, B., Doubled-haploid onions, eds:H.D. Rabinowitch and L Currah, Allium Crop Science:Recent Advances, CABI Publishing, Wallingford, UK, (2002), Pp: 145–158.
- Bohanec, B. and Jakse M., Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions, Plant Cell Reports, 18, 737-742, (1999).
- Campion, B. and Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules, Plant Cell Tissue Organ Culture, 20, 1-6, (1990).
- Dunstan, D. I. and Short K.C. Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa*, Physiologia Plantarum, 41, 70-72, (1977).
- Dunwell, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation, Plant Biotechnol J., 8, 4, 377-424, (2010).
- Gamborg, O.L., Miller R.A. and Rancillac M., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50, 151-158, (1968).
- Jakse M., Havey M.J., Bohanec B., Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos, Plant Cell Reports, 21, 905-910, (2003).
- Jones, R.N. and Rees, H. Nuclear DNA variation in Allium. Heredity 23: 591-605 (1968).

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).

Keller, E.R. 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: Jain S.M., Sopory S.K. and Veilleux R.E. *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 3. The Netherlands, (1996) Pp: 51-75.

Koçak, Y., Oto, G., Meydan, İ. ve Seçkin, H. Van bölgesinde yetişen *Allium schoenoprasum* L. bitkisinin toplam flavonoid, DPPH radikal söndürme, lipid peroksidasyonu ve antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 30, 147-155, (2020).

Kojima, A. and Kawaguchi, T. Apomictic nature of Chinese chive (*Allium tuberosum* rottl.) detected in unpollinated ovule culture. *Japanese Journal of Breeding*, 39, 449-456 (1989).

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

Muren, P. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion, *Hortscience*, 24, 833-834, (1989).

Schum, A., Mattiesch, L., Timmann, E. M., and Hofmann, K. “Regeneration of dihaploids via gynogenesis in *Allium porrum* L. *Gartenbauwissenschaft* 58, 227–232, (1993).

Silvertand B. Induction, maintenance and utilization of male sterility in leek (*Allium ampeloprasum* L.) PhD Thesis, Department of Plant Breeding, Agricultural, Wageningen, Netherlands (1996).

Tubic, L., Savic, J., Mitic, N., Milojevic, J., Janosevic, D., Budimir, S., and Zdravkovic-Korac, S. Cytokinins differentially affect regeneration, plant growth and antioxidative enzymes activity in chive (*Allium schoenoprasum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 124, 1–14, (2016).

Tuncer, B., Fırat, M., Yaralı, F., and Sarıkamış, F. Morphology and utilization of *Allium* L. species used as herbs in cheese around Van province in Turkey. *Acta Horticulturae* 1143, 171-178 (2016).

van der Meer, Q.P. and Hanelt, P. (1990) Leek (*Allium ampeloprasum*). In: Brewster, J.L. and Rabinowitch, H.D. (eds) *Onions and Allied Crops, III. Biochemistry, Food Science, and Minor crops*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 179-196

Zdravkovic-Korac, S., Milojevic, J., Tubic, L., Calic-Dragosavac, D., Mitic. N., Vinterhalter, B. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:237–244 (2010).