

**Türk Pırasa (*Allium ampeloprasum* L.) Islah Programlarında  
Kullanılmak Amacıyla Ginogenik Bitki Üretim Tekniğinin  
Geliştirilmesi**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 113O232**

**Proje Yürütücüsü:**

**Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN**

Araştırmacı(lar):

Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK

Bursiyer(ler):

Selda AKGÜN

Ömer Yaşar ÇIRMIKTILI

Ahmet ARIĞBOĞA

Seçil YILDIRIM

Vahit ALAN

EKİM 2016

ANKARA

## **Türk Pırasa (*Allium ampeloprasum* L.) Islah Programlarında Kullanılmak Amacıyla Ginogenik Bitki Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi**

### **ÖZET**

Projede yerli pırasa materyallerinde ginogenesis uyartımı ile ginogenik bitki üretimi ile ilgili detaylı deneyler gerçekleştirilmiştir. Ginogenik bitkiler dişi gametin erkek gamet katkısı olmadan doku kültürü ortamında gelişerek embriyo ve bitkiye dönüşümü (ginogenesis) ile elde edilirler. Tetraploid ( $2n = 4x = 32$ ) olan pırasada ginogenesis tekniğiyle elde edilen bitkiler dişi gamet hücrelerinin sahip olduğu diploid ( $n = 2x = 16$ ) seviyede kromozoma sahiptirler. Projede tam çiçek tomurcuğu eksplantlarının Dunstan ve Short (BDS), Murashige ve Skoog (MS), modifiye edilmiş MS (MMS) ve Gambrog B5 (B5) temelli ortamların hepsinde ginogenesis uyartımına cevap verdikleri bulunmuştur. Kültür ortamlarında yüksek miktarda (>50 g/l) sukroz bulunması ginogenesis uyartımı için gerekli iken bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) uyartım için gerekli olmadığı tespit edilmiştir. Proje kapsamında yer alan tüm pırasa genotiplerinde (İnegöl, Tarsus ve üç seleksiyon materyali) ginogenesis cevabı (ginogenik bitkicik verimi) elde edilmiştir. Beş Türk pırasa genotipiyle yapılan deneyde genotiplerden elde edilen ortalama ginogenesis cevabı % 0.91 olarak gerçekleşmiştir. Ginogenik bitkiciklerin yarısından fazlası gelişmeye devam ederek sağlıklı yeşil bitkiler oluşturmuşlardır. En yüksek ginogenesis cevabı (% 1,53) ve ginogenik bitki (% 0,86) Tarsus genotipine ait çiçek tomurcuklarından elde edilmiştir. Gerçekleştirilen uyartım deneylerinde toplam 356 yeşil ginogenik bitki üretilmiştir. Pırasada çekirdek DNA miktarı ölçümü için geliştirilen flow sitometri (FCM) analizi sayesinde ginogenik pırasa bitkilerinin yaklaşık üçte ikisinin diploid seviyede olduğu bulunmuştur. Serada büyütülen ginogenik bitkilerde yapılan FCM analizi ile dört diploid bitkinin spontan kromozom katlaması nedeniyle tetraploide dönüştüğü tespit edilmiştir. Genelde diploid bitkiler tetraploid materyallere göre daha küçük ince ve kısa bitkiler oluşturmuşlardır. Çiçeklenen diploid bitkiler hiç yada çok az tohum üretmişlerdir. Spontan olarak tetraploid hale gelen dört ginogenik pırasa bitkisine ait umbellerde ise yüksek miktarda kendilenmiş tohum verimi (~900) gözlenmiştir. Projede elde edilen bulgular pırasa ginogenesis uygulamalarında normal bitkisel gelişim ve tohum verimi için ginogenik bitkilerin tetraploid seviyesine getirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Allium ampeloprasum* L., *Ginogenesis*, *Flow sitometri*, *Islah*, *Poliplidi*

## **Development of A Gynogenic Plant Production Technique for Utilization in Turkish Leek (*Allium ampeloprasum* L.) Breeding Programs**

### **ABSTRACT**

Detailed experiments were carried out to produce gynogenic leek plants via gynogenesis induction. Gynogenic plants are obtained in tissue culture by the development of female gametes into zygotes and plants in the absence of contribution from male gametes. Leek is a tetraploid ( $2n = 4x = 32$ ). Therefore, gynogenic leek plants contain only diploid chromosomes ( $n = 2x = 16$ ) of female gametes. It was found that the whole flower explants were responsive to gynogenesis induction in all Dunstan and Short (BDS), Murashige and Skoog (MS), modified MS (MMS) ve Gambrog B5 (B5) based media. Results showed that the presence of sucrose at high concentrations (>50 g/l) was required in culture media but plant growth regulators (PGR) were not necessary for gynogenesis induction. Gynogenesis response (production of gynogenic plantlets) were obtained from all leek genotypes (Inegol, Tarsus and three selection materials) used in this Project. An average of 0.91 % gynogenesis response was obtained in the experiment with five Turkish leek genotypes. More than half of the gynogenic plantlets continued to grow and became healthy green plants. The highest gynogenesis response (1.53 %) and gynogenic plant (0.86) production were obtained from the flower buds from Tarsus genotype. A total of 356 green gynogenic plants were obtained from the induction experiments. Thanks to the flow cytometry (FCM) analysis developed for the measurement of nuclear DNA amount of leek two-third of the gynogenic plants were found to be diploids. Re-analysis of greenhouse grown gynogenic plants showed that four of the diploid gynogenic plants were converted to tetraploids thanks to spontaneous chromosome doubling. In general diploid plants were thinner and shorter than tetraploid materials. Flowering diploid plants produced little seeds. High numbers of selfed seeds (~900) were obtained from spontaneous tetraploids. Gynogenic plants must be converted to tetraploids for normal development and fecundity.

*Key words: Allium ampeloprasum L., Breeding, Gynogenesis, Flow cytometry, Polyploid*

## 1.GİRİŞ

*Allium* cinsine ait (Alliaceae familyası) bir tür olan pırasa (*Allium ampeloprasum* var. porrum (L.) J.Gay) Orta Doğu ve Akdeniz kökenli bir sebzedir (Jones ve Mann, 1963; Vavilov, 1926). Pırasa kendine uyumlu olmakla beraber yüksek oranda yabancı tozlanma eğilimi gösteren bir tetraploid ( $2n = 4x = 32$ ) türdür (Levan, 1940). Hayat döngüsünü iki yılda tamamlayan pırasa, ilk yıl vejetatif gelişimini tamamlayıp soğuklama ihtiyacı giderildikten sonra ikinci yıl çiçeklenerek tohum üretir. Düşük sıcaklıklara teloraslı olması, fotoperiyod ihtiyacı olmaması, soğan oluşturmaması gibi özellikleri bir sebze olarak dünyanın her yerinde üretiminin yapılabilmesine imkan vermiştir (Pink ve Innes, 1984).

Pırasa yaprakları ve yaprak kınlarından oluşan etiyolleşmiş sahte gövdeleri (kök ve yeşil aksam arasındaki beyaz kısım) için yetiştirilir. FAOSTAT 2012 yılı verilerine göre Türkiye yıllık yaklaşık 229579 bin tonluk pırasa üretimi ile 596 bin tonluk üretim yapan Endenozya'yı takip etmektedir (<http://faostat.fao.org>). Yenilebilir *Allium* türleri arasında soğan ve sarımsaktan sonra en fazla tarımı yapılan tür olan pırasada klasik ıslah yöntemleri ile istenen özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesi ile ilgili yapılan araştırmalar sınırlı sayıdadır (Pink ve Innes, 1984). Pırasa üretiminde açık tozlanan standart çeşitlerin kullanımı oldukça yaygındır. Son yıllarda Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde F1 hibrit pırasa çeşitleri ile üretim yapılmaya başlanmıştır. Dünya genelinde pırasa ıslahı çalışmaları soğuğa dayanım (kışı sert geçen alanlar için), zamansız çiçeklenme eğilimi göstermeme, koyu yeşil yaprak rengi, pırasa pası ve pırasa sarı çizgi virüsü (LYSV) hastalıklarına dayanım, yüksek kalite, yüksek verim gibi özelliklerin geliştirilmesi olarak sıralanabilir (Pink ve Innes, 1984). Konserve ve dondurulmuş pırasa ürünleri açısından, işlemede tercih edilen, uzun beyaz saplara sahip pırasa çeşitlerinin ıslahı önemlidir. Özellikle batı avrupada verim ve uniformite açısından avantajlı çeşitlerine yönelim nedeniyle yerel çiftçi çeşitlerinden oluşan gen havuzunda önemli bir genetik çeşitlilik erezyonun meydana gelmiş olduğu düşünülmektedir (Van der Meer ve Banelt, 1990).

Dünya pırasa üretiminde söz sahibi ülkeler arasında yer alan ülkemizde yetiştiricilik genellikle kıyı bölgelerinde açık tozlanan standart çeşitler ile yapılmaktadır. Ülkemizin kıyı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan standart pırasa tipleri birkaç cm çapında ve 70 cm' e kadar varabilen uzun beyaz saplar üretirken, geçiş ve soğuk bölgelerde yetiştiriciliği yapılan tipler daha kalın ve kısa beyaz saplar üretme özelliklerine sahiptirler. Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen standart çeşitler açık tozlanma nedeniyle yüksek oranda varyasyon gösterirler. Bu durum yetiştiricilik sırasında biyotik ve abiyotik streslere farklı cevaplar veren ve hasat sırasında uniform olmayan bitkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ürün kalitesi ve verimlilik açısından ticari potansiyele sahip yeni çeşitlerin ıslahına yönelik çalışmalar yapılması zorunludur.

Pırasada çiçekleme dönemi oldukça uzundur. Yüzlerce çiçek tomurcuğunun bulunduğu umbellerde gelişim alt kısımlardan başlar. Çiçeklerde protandri (anterlerdeki polenlerin dişinin reseptif olmadan olgunlaşmaları) görülür. Anterlerde bol miktarda polen üretilir ve aynı umbeldeki çiçeklerin dişi organları reseptif halde olduğu zaman kendileme gerçekleşir. İkinci yılında tohum vermesi, yabancı tozlanma, yüksek oranda heterozigotluk, kendileme depresyonu ve poliploidi gibi nedenlerden dolayı pırasada çeşit ıslahı çalışmaları çok uzun ve zahmetlidir. Yeni pırasa çeşitlerinin klasik yöntemler kullanılarak ıslah edilmeleri çok uzun yıllar alacağı için bu süreci kısaltacak biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Pırasa ıslahında uygulanabilecek biyoteknolojik yöntemler oldukça sınırlıdır. Protoplast kültürü, protoplast füzyonu, klonal çoğaltım, gen transferi, gametik embriyogenesis gibi konularda az sayıda bilimsel çalışmalar bulunmaktadır (Buiteveld vd., 1994; Peterka vd., 1997; Wang, 1996). Biyoteknolojik yöntemlerin pırasa ıslahı programlarında başarılı olarak kullanımı ile ilgili detaylı çalışmalar mevcut değildir. Pırasada embriyogenesis yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda bu türde anter kültüründe başarı sağlanamazken yumurtalık ve çiçek tomurcuğu kültürlerinden ginogenik bitkiler üretilebileceği gösterilmiştir (Keller, 1990; Schum vd., 1994; Kaska vd., 2012). Ginogenik bitki dişi gametin erkek gamet katkısı olmadan gelişerek embriyo ve bitkiye dönüşümü (ginogenesis) ile meydana gelir. Genellikle *in vitro* da gerçekleştirilen uygulamalarda kültür ortamına ekilen yumurta, yumurtalık ve tomurcuk eksplantlarına düşük sıcaklık şoku, büyüme düzenleyicileri ve diğer kimyasalların uygulanmasının ginogenesisi tetiklediği tespit edilmiştir (Sestili ve Ficcadenti, 1996). *In vitro* ortamda elde edilen ilk ginogenik haploid bitki döllenmemiş arpa yumurtalığı ekplantı kültüründen elde edilmiştir (San Noeum, 1976). Günümüze kadar aralarında üç önemli *Allium* türünün (baş soğan, pırasa ve Çin çivi) 23 bitki türünde ginogenesis uyartımının başarılı olarak uygulandığı rapor edilmiştir (Bhojwani ve Thomas, 2001). Pırasa ve baş soğan türlerinde haploidizasyon tekniklerinin geliştirilmesi çabaları hemen hemen aynı dönemde (1980 lerin ikinci yarısı) başlamıştır. Geçen süre zarfında soğanda katlanmış haploidlerin üretiminde oldukça önemli ilerlemeler sağlanmasına rağmen pırasada yapılan çalışmalarda kayda değer bir ilerleme gerçekleşmemiştir. Yayınlanan çalışmalarda bazı Avrupa kökenli pırasa genotiplerinde yumurta, yumurtalık ve tomurcuk ekplantı kullanılarak oluşturulan kültürlerden sınırlı sayıda ginogenik bitki elde edildiği belirtilmiştir (Smith vd. 1991; Schum vd., 1993). Bu çalışmalardan sonra pırasada haploidizasyon uygulamaları konusunda herhangi bir ilerleme kayda geçmemiştir. Gurubumuz tarafından gerçekleştirilen ön çalışmalarda Türk pırasa genotiplerinin ginogenesis uyartımına cevap verdikleri tespit edilmiş ve bu tekniğin pırasa ıslahında kullanılma potansiyeli ile ilgili çalışmalar başlatılmıştır (Kaska vd., 2012).

TÜBİTAK tarafından desteklenen 113O232 no.'lu proje kapsamında yapılan deneylerde beş Türk pırasa genotipinde farklı ploidi seviyelerine sahip ginogenik bitkilerin elde edilmesi, morfolojik özelliklerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bu projeye pırasada ginogenesis uyartımı için önemli şartlar tespit edilmiştir. Pırasada haploidizasyon çalışmalarında önemli bir sorun olan ploidi seviyesinin tespiti için bir flow sitometri (FCM) protokolü geliştirilerek analizlerin hızlı ve güvenilir olarak yapılması sağlanmıştır. FCM analizi ile projede kullanılan tüm donor pırasa hatlarının tetraploid olduğu ve bu hatlarda çekirdek DNA miktarı farklılığı gösteren bitkilerin bulunmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkilerin yaklaşık % 60'ının diploid olduğu ve diğerlerinin çoğunlukla tetraploid olduğu tespit edilmiştir. Doku kültüründe üretilen bitkiler dış koşullara alıştırılarak serada büyütülmüşler ve bitkilerin yalancı gövde çapı, yalancı gövde uzunluğu ve tam bitki boyları ölçülmüştür. Projede üretilen ginogenik bitkilerin bir bölümü çiçeklendiği için polen canlılığı ve tohum verimleri gibi değerler elde edilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Türkiye yıllık yaklaşık 246 bin tonluk pırasa üretimi ile 527 bin tonluk üretim yapan Endonezya'yı takip etmektedir (<http://faostat.fao.org>). Dünya pırasa üretiminde söz sahibi ülkeler arasında yer alan ülkemizde yetiştiricilik genellikle kıyı bölgelerinde standart çeşitler ile yapılmaktadır. Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen standart çeşitler yüksek oranda varyasyon gösterirler. Bu durum yetiştiricilik sırasında biyotik ve abiyotik streslere farklı cevaplar veren ve hasat sırasında uniform olmayan bitkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. *Allium* cinsine ait bir tür olan pırasa Orta Doğu ve Akdeniz kökenli bir sebzedir (Vavilov, 1926). İki yıllık yaşam döngülerine sahip olan kültür pırasaları poliploidi ( $2n=4x=32$ ), yüksek çekirdek DNA miktarı, yüksek oranda heterozigotluk, yabancı tozlanma eğilimi ve kendileme depresyonu göstermeleri gibi nedenlerden dolayı ıslahı zor sebzeler grubunda yer alırlar (Labani ve Elkington, 1987; Arumuganathan ve Earle, 1991). Pırasa çok kuvvetli olarak kendileme depresyonu göstermektedir, bu durum yüksek oranda lethal gen bulundurması ile ilişkilendirilebilir (Smith ve Crowther, 1995). İkinci yılında tohum vermesi, yabancı tozlanma, yüksek oranda heterozigotluk, kendileme depresyonu ve poliploidi gibi nedenlerden dolayı pırasada çeşit ıslahı çalışmaları çok uzun ve zahmetlidir.

Islahı uzun süren bu türde genellikle popülasyon içerisindeki seleksiyon ile agronomik karakterleri tercih edilen bireylerin seçilmesi ile ilerleme sağlanabilir. Pırasada tercih edilen agronomik özellikler yüksek verim, ürün kalitesi, abiyotik ve biyotik koşullara dayanıklılık, yüksek besin içeriği ve pişirilme kalitelerini içermektedir. Bu özellikler genellikle birden fazla gen ile kontrol edilmektedir ve açık tozlanan hatlara ait bitkiler arasında bu özelliklerin hepsini

gösterebilen çok az sayıda bitki bulunmaktadır. Hatlarda tam saflık sağlanamadığı için gerçek hibrit çeşitler üretilmemektedir. Pırasada hibrit tohum üretiminin kolaylaşmasına imkan sağlayabilecek sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) doğal olarak mevcut değildir. Bu özellik mutasyon uygulamalarında dahi elde edilememiştir. Bu özelliğin diğer *Allium* türlerinden türler arası melezleme yoluyla pırasaya taşınması veya protoplast füzyonu ile transfer edilmesine yönelik çalışmalar olmasına rağmen bu konuda somut sonuçlar sağlanamamıştır (Buiteveld vd., 1994; Peterka vd., 1997). Bundan dolayı yeni ıslah metodları geliştirilmesi gerekmektedir. Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen standart pırasa çeşitleri açık tozlanma nedeniyle yüksek oranda varyasyon gösterirler. Bu durum yetiştiricilik sırasında biyotik ve abiyotik streslere farklı cevaplar veren ve hasat sırasında uniform olmayan bitkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İkinci yılında tohum vermesi, yabancı tozlanma, yüksek oranda heterozigotluk, kendileme depresyonu ve poliploidi gibi nedenlerden dolayı pırasada çeşit ıslahı çalışmaları çok uzun ve zahmetlidir. Bu nedenlerden dolayı pırasa ıslah programlarında yararlanılabilecek olan başarılı bir ginogenesis yönteminin geliştirilmesinin bu türe ait çeşitlerin geliştirilmesine önemli katkıları olacaktır.

Bitkilerin megasporları veya dişi gametofitleri in vitro da sporofitik gelişmeye doğru yönlendirilebilir. Normalde diploid veya poliploid olan bitkilerden elde edilen gametofitik kromozom sayısına sahip bitkilere haploid denir. Haploid hücreler doğal olarak bitkilerin dişi ve erkek dokularında oluşurlar. Olgunlaşmamış erkek ve dişi gamet hücreleri, ovüllerin polenlerle döllenmesine gerek olmadan, manipüle edilerek embriyo haline getirilebilirler. Bu şekilde elde edilen haploid embriyolar donor bitkinin somatik hücrelerinde bulunması gereken normal kromozom sayılarının yarısı kadar kromozom taşırlar. Haploid embriyolardan uyartılma veya spontan kromozom katlaması yoluyla tamamen homozigot olan katlanmış haploid (DH) bitkiler üretilir (Jain ve diğ., 1996). Tamamen homozigot olan genotipler kendilenmiş tohumları ile klonal bitkiler gibi çoğaltılabilirler ve bu özellikleri kantitatif özelliklerin kalıtımını güçlendirir. Bunun sonucunda tercih edilen özelliklerin seçim etkinliğini artırır. Guha ve Maheswari (1964) *Datura innoxia* anterlerinden androgenesis yolu ile haploid bitkiler elde ederek biyoteknolojinin ıslah alanında uygulanmasına öncü olmuşlardır. Günümüzde DH metodları 250 den fazla bitki türünde uygulanabilmektedir (Maluszynski vd., 2003). Döllenmemiş dişi gametofitten (yumurta hücresi) haploid bitki üretimi işlemine ginogenesis adı verilir. Ginogenesis genellikle androgenesis uyartımına cevap vermeyen, erkek kısırlığı gösteren ve erkek ve dişi cinsiyetli taşıyan bitkileri olan türlerde haploid bitki eldesi için kullanılan bir alternatif yoldur (Thomas vd., 2000; Bhat ve Murthy, 2007). Döllenmemiş ovarı kültürü yoluyla ginogenik haploid bitkilerin üretilmesi uygulaması ilk olarak arpa bitkisinde gerçekleştirilmiştir (San Noeum, 1976). Birçok bitki türünde başarılı ginogenesis uygulamaları yapılmıştır. Baş soğan (Muren, 1989; Bohanec

vd., 1995; Geoffriau vd., 1997; Alan vd., 2004), tatlı patates (Ruth vd., 1993), lale (Van-Creij vd., 2000), mısır (Tang vd., 2006), şeker pancarı (Gurel vd., 2000), hıyar (Gemes-Juhasz vd., 2002), yazlık kabak (Shalaby, 2007), buğday (Sibi vd., 2001), pamuk (Kantartzi ve Roupakias, 2009) ve dut (Thomas vd., 1999) bu türlerden bazılarıdır. Bitkilerde bir set kromozomun bulunması resesif gen mutantlarının tespit edilmelerine imkan verir (Hermsen ve Ramana, 1981). Haploidizasyon yöntemiyle elde edilen saf hatların kendilenebilen türlerde yeni çeşitlerin oluşturulması ve yüksek verimli hibritlerin üretilmesinde ebeveyn olarak kullanılacak saf hatların oluşturulması gibi önemli avantajları vardır (Shalaby, 2007).

Pırasada kromozom sayısı yarıya indirgenmiş bitki eldesi işlemi ile diploid hatların elde edilebilmesi durumunda poliploidi ve aşırı derecede heterozigotluk gibi faktörlerin yaratmakta olduğu dezavantajlar ortadan kaldırılabilir. Tetraploid olan kültür pırasalardan elde edilecek olan diploid bitkilerin karakterize edilmesi ve donör hatlarla karşılaştırılması bu bitkilerin ıslah çalışmalarında kullanım potansiyellerinin ortaya çıkartılması açısından önemlidir. Ayrıca diploid seviyede yapılan ıslah çalışmaları tetraploidlere göre daha kısa zamanda tamamlanabileceği için haploidizasyon yöntemlerinin uygulanabilmesi bu türün ıslahı çalışmalarında büyük avantajlar sağlayabilir. Soğangillerde yapılan androgenesis denemelerinin başarısız olduğu rapor edilmiştir (Keller ve Korzun, 1996). Soğangillerde haploid embriyo eldesi sadece ginogenesis yoluyla mümkündür. Bu tekniğin en başarılı olarak kullanıldığı *Allium* türü baş soğandır (Muren, 1989; Champion ve Alloni, 1990; Keller, 1990; Bohanec ve Jakse, 1999; Alan vd., 2004). Şalot (Sulistyaningsih vd., 2002), Soğan ve *Allium roylei* melezlerinden elde edilmiş ıslah materyalleri (Alan vd., 2003), pırasa (Schum ve diğ., 1993; Kaska ve diğ., 2012) ve diğer bazı minör *Allium* sebzelerinde (Juđkevieiene vd., 2005) ginogenik bitkiler elde edilmiştir.

Soğangillerde ilk başarılı ginogenik bitki eldesi 26 yıl önce baş soğanlarda 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. Bu türlerde ovul ve ovarı eksplantlarının kültüre hazırlanmalarının zor olması nedeniyle gelişmemiş (3 mm ve daha iri) çiçek tomurcuklarının ginogenesis uyartım ortamında kültüre alınması tercih edilmektedir (Bohanec ve Jakse, 1999; Alan vd., 2003; Kaska vd., 2012). Ginogenesis uyartım ortamında kültüre alınan çiçek tomurcuklarında anterler yüksek nem yüzünden açılmadığı için tozlanma ve dölleme yoluyla zigotik embriyo oluşumunun gerçekleşme şansı yoktur (Cohat, 1994). Pırasada haploid bitki eldesinde kullanılacak olan çiçek tomurcuklarının ginogenesis uyartımına uygun gelişme safhalarında olması gerekir. Muren'e (1989) göre antesisten beş gün önce toplanan baş soğan çiçek



tomurcukları daha erken veya geç dönemlerde toplanan tomurcuklara göre ginogenesis uyarımına daha iyi cevap verirler. Laboratuvarımızda yapılan çalışmada ginogenesis uyarımı için uygun çiçek tomurcuklarının antesisten üç gün önce toplanan açmamış tomurcuklar olduğu tespit edilmiştir (Kaska vd., 2012). Genel olarak ginogenesis uyarımı için en uygun çiçek tomurcuğu gelişme döneminin, embriyo keseciğinin olgunlaşmış olduğu, antesisten 3-5 gün önceki dönem olduğu düşünülmektedir (Musial vd., 2001).

Soğangillerde ginogenesis uyarımı için farklı ortamların ginogenik bitki oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Yayınlanan çalışmalarda B5 (Gamborg vd., 1968), BDS (Dunstan ve Short, 1977) ve MS (Murashige ve Skoog, 1962) temelli ortamlar kullanılmıştır. Pırasada farklı ortamların ginogenesis uyarımı üzerine etkilerinin detaylı bir şekilde karşılaştırıldığı bir çalışma ise mevcut değildir. Schum vd. (1993) tarafından yayınlanmış olan çalışmada üç farklı pırasa genotipinden alınan ovariler MS temelli ortamlara ekilmişleridir. Kültürlerin bir kısmının farklı sürelerde düşük sıcaklık (10° C) ve karanlık (0, 3, 6 veya 12 gün) ön uygulamalarına maruz bırakıldıktan sonra standart kültür şartlarına (25° C ve 16 saat ışık) transfer edilip kültür süresi boyunca aynı koşullarda büyümeleri sağlanmıştır. Araştırmacılar genotiplerin gösterdiği ginogenik cevabın ortma eklenen bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) (1 ppm NAA, 8 ppm 2IP) ve şeker (%3 sukroz, %6 sukroz veya %3 sukroz+%1.6 mannitol kombinasyonu) gibi komponentlerden veya yapılan ön uygulamalardan etkilenmediğini belirtmişlerdir. Araştırmada genotiplerin ginogenesis uyarımına farklı cevaplar verdikleri bulunmuştur. Çalışmada kullanılan iki genotipten tetraploid, oktoploid ve miksoploidlerin bitkiler ve diğer bir genotipten tetraploid ve diploidler elde edilmiştir. Aynı çalışmada elde edilen dihaploid pırasaların bir bölümünün klorofil üretimi açısından sorunlu oldukları da kaydedilmiştir. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen araştırmada farklı pırasa genotiplerinden alınıp BDS ve MS temelli ortamlara ekilen çiçek tomurcuklarından ginogenik bitkiler üretilebileceği görülmüştür. Elde edilen diploid pırasaların yaklaşık yarısı normal bitkiler olarak gelişmeye devam etmiş ve seraya aktarılıp büyütülmüşlerdir. Farklı pırasa genotiplerinin ginogenesis uyarımına verdikleri karşılıkların aynı olması beklenmemelidir. Ancak uyarım için en uygun ortamların tespit edilmesi gerekmektedir.

*In vitro* ortamda elde edilen üretilen ginogenik pırasaların ploidi seviyelerinin tespitinde kromozom sayımı, stoma büyüklüğü ölçümü gibi metodların kullanılması mümkün olmalarına rağmen hızlı ve kesin sonuç veren flow sitometrik yolla çekirdek DNA'sı miktarı ölçümü daha pratiktir. FCM hızlı, bitkiye zarar vermeyen, farklı dokulardan elde edilen hücrelerde uygulanabilen bir metod olduğu ve çalışılan dokudaki çekirdek DNA miktarının belirlenmesini

sağladığı için tercih edilir. Tetraploid ( $2n=4x=32$ ) olan kültür pırasalarında somatik hücrelerde bulunan çekirdek DNA miktarının farklı araştırmalarca ~50 pg ile ~60 pg arasında olduğu bildirilmiştir (Arumuganathan ve Earle, 1991; Zonneveld vd. 2005). Bu durumda ginogenesis yoluyla elde edilecek olan diploid ginogenik pırasa bitkilerinin somatik hücrelerinde donör bitkinin sahip olduğu kromozom sayısının ve çekirdek DNA miktarının yarısına sahip olması beklenir. Çok büyük bir genoma sahip olan pırasanın çekirdek DNA'sının analiz edilmesinde bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle pırasa örneklerinin analizi için uygun bir FCM protokolü oluşturulmuştur.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Bitkisel Materyal ve Yetiştirme Koşulları

Projede iki açık tozlanan standart hat (İnegöl ve Tarsus) ve üç seleksiyon hattı (PAUPR2 [PR2], PAUPR4 [TK] ve PAUPR6 [PR6]) olmak üzere toplam pırasa hattı kullanılmıştır (Tablo 1). İki standart hat ilk yıl gerçekleştirilen deneylerde kullanılmıştır. İkinci yıl denemelerinde ise beş hattın tamamı kullanılmıştır. Bitkisel materyaller Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAÜ BİYOM) uygulama serası ve arazisinde büyütülmüşlerdir. Pırasa hatlarına ait bitkilerin üretilmesi amacıyla serada Ocak ayında torf ve perlit (3:1) ile doldurulmuş 104 lük viyollere tohum ekimi yapılmıştır. Yaklaşık 5 hafta içerisinde çimlenen fideler arazideki parseller dikilene kadar serada büyütülmüşlerdir (Şekil 1A). Pırasa fideleri Nisanın ikinci yarısında araziye dikilmişlerdir. İlkbahar, yaz ve sonbahar dönemleri boyunca arazide büyütülen bitkiler Aralık ayı içerisinde hasat edilip bir fungusit ve bir insektisit uygulamasıyla dezenfekte edildikten sonra naylon torbalar içerisine konmuştur (Şekil 1 B-D). Pırasalar paketler halinde 5° C ye ayarlanmış olan bir soğuk hava deposunda altı hafta boyunca depolanmıştır (Şekil 1 E). Soğuklama ihtiyacı giderilen bu bitkiler torf ve perlit (3:1) karışımı ile doldurulmuş olan 7 L saksılara dikilerek ısıtmasız cam serada standart büyütme koşulları altında yetiştirilmişlerdir (Şekil 1 F). Şubat ayı başlarında saksılara dikilen pırasalar yeni yapraklar üreterek gelişmeye devam eden bitkiler Nisan ayında çiçek sapı oluşturmaya başlamışlardır. Mayıs ayı ortalarından itibaren ise kültüre alınabilecek tomurcuklara sahip umbeller kesilerek laboratuvara getirilmişlerdir (Şekil 2A, B). Her bitkiye ait antesis aşamasında bulunan dört tomurcuktan anterler alınıp polen canlılık testleri yapılmıştır.

**Tablo 1** Açmamış çiçek tomurcuğu donörü olarak kullanılan pırasa hatları

Donör hattı <sup>a</sup>	Tip <sup>b</sup>	Sezon <sup>c</sup>	Kaynak
İnegöl	Uzun	Yaz	Standart çeşit
Tarsus	Uzun	Güz	Standart çeşit
TK	Kısa	Güz	Arazi seleksiyonu (Tarsus, Mersin)
PR2	Uzun	Güz	Arazi seleksiyonu (Denizli)
PR6	Orta	Güz	Arazi seleksiyonu (Denizli)

<sup>a</sup>Çiçek tomurcuğu eksplant donörlerinin tümü açık tozlanan (OP) hatlardır.

<sup>b</sup>Donör hatlarında yapılan tip sınıflandırması yalancı gövde uzunluğuna göre yapılmıştır. Kısa, orta ve uzun hatlar sırasıyla <40 cm, 40-50 cm ve >50 cm yalancı gövde uzunluğuna sahiptirler.

<sup>c</sup>Sezon sınıflandırması pırasa hatlarının hasat edilme sezonuna göre yapılmıştır.

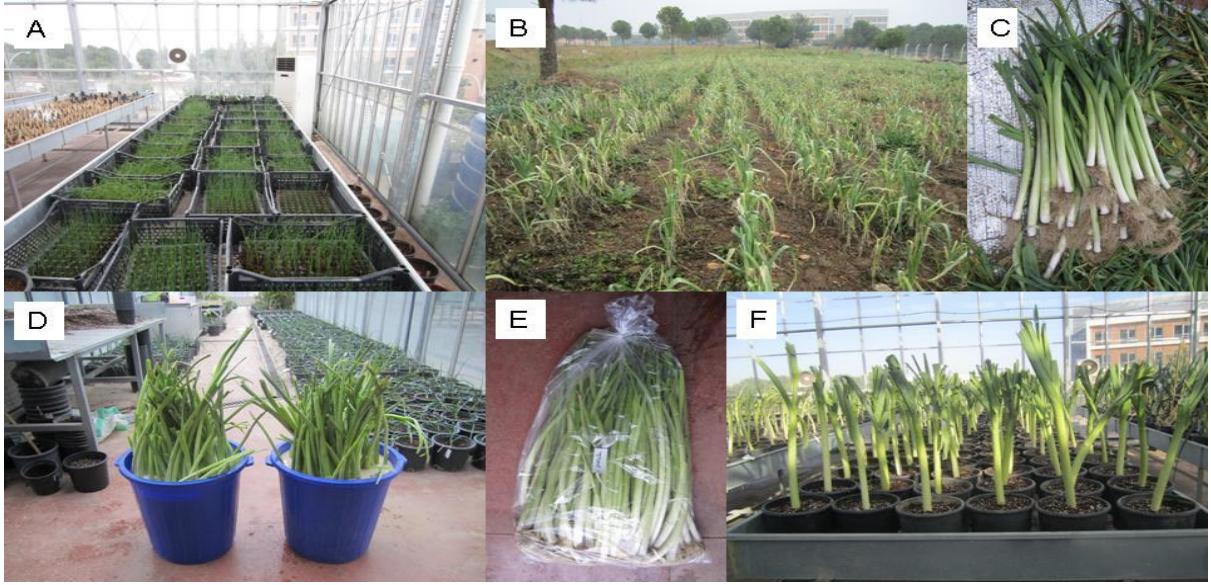
### 3.2 Ginogenesis Uyartımı Denemeleri

Deney I'de kullanılan pırasa genotipleri farklı zamanlarda çiçeklenmişlerdir. Tarsus çeşidine ait bitkiler İnegöl çeşidine ait bitkilere göre iki hafta daha erken çiçeklenmişlerdir. Bu yüzden uyartım kültürlerine Tarsus çeşidine ait donör bitkilerin umbellerinden alınan çiçek tomurcukları ile başlanmıştır. Henüz antesis aşamasına ulaşmamış en az 3 mm çapında olan tomurcuklar bir makas yardımıyla umbellerden kesilelerak toplanmıştır. Tomurcuklar %70'lik etanolde 30 saniye tutulduktan sonra %20'lik ticari yüzey temizleyici (Klorak) ve %0.1'lik Tween-20 deterjanı ile hazırlanmış sterilizasyon karışımına konularak burada 30 dakika tutulmuşlardır (Şekil 2C). Yüzey sterilizasyonundan sonra tomurcuklar steril kabin içerisinde otoklavlanmış saf su ile üç defa yıkanmışlardır. Bu tomurcuklar steril kağıtlar üzerinde serilip bir kaç dakika kurutulduktan sonra ginogenesis uyartım ortamlarına ekilmişlerdir (Şekil 2D, E). Her Petri tabağına 30 adet tomurcuk ekimi yapılmıştır. Petriler iki sıra parafilm ile kapatılmıştır. Proje kapsamında birinci ve ikinci yılda olmak üzere iki ginogenesis uyartım deneyi gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1 Deney I

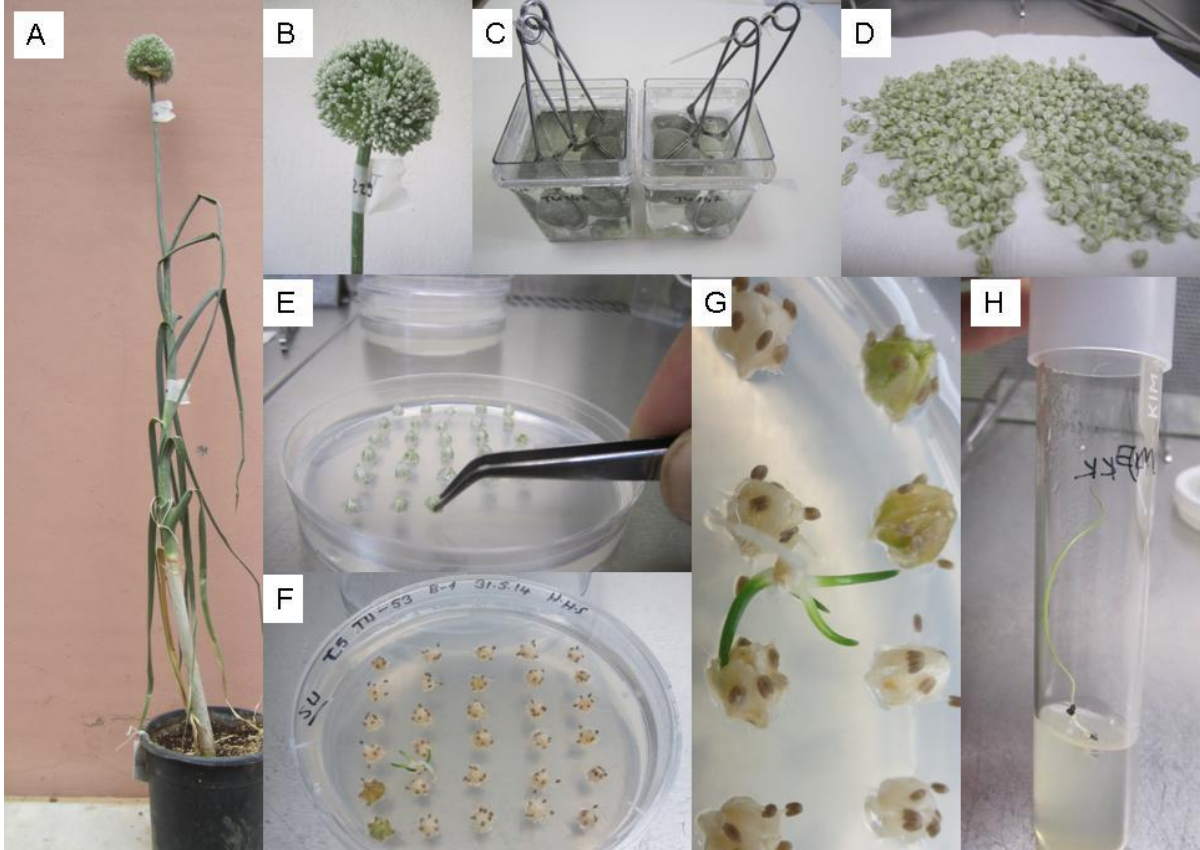
Projenin ilk yılında pırasada ginogenesis uyartımı cevabına etkisi olabilecek kültür ortamlarının kompozisyonu ve düşük sıcaklık ön uygulamasının etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla İnegöl ve Tarsus genotiplerine ait bitkilerden alınan yaklaşık 80 bin adet açmamış çiçek tomurcuğu eksplantı hazırlanarak 44 farklı uyartım ortamına ekilmişlerdir (Tablo 2, Tablo 3). Bu uyartım ortamlarının 14 adeti BDS (Bohanec ve Jakse, 1999), 12 adeti MS (Murashige ve Skoog, 1962), 11 adeti modifiye MS (Schum vd., 1993) ve 7 adeti B5 (Gamborg vd., 1968) temellidir. Uyartım ortamlarının bazıları bitki büyüme düzenleyiciler (BBD) içermezken, bazıları farklı miktarlarda oksin (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)), sitokinin (6-benzylaminopurine (BAP), 6-(gamma, gamma-Dimethylallylamino) purine

## Şekil 1. Projede kullanılan pırasa genotiplerine ait bitkilerin üretimi



A. Cam serada büyütilen pırasa fideleri. B. Arazide büyütilen pırasa bitkileri. C. Araziden toplanıp temizlenen pırasa bitkileri. D. Arazide büyütilen pırasa bitkilerinin dezenfekte edilmeleri. E. Pırasa bitkilerinin soğuklama ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla paketlenmesi. F. Pırasa bitkilerinin çiçeklenmelerinin sağlanması amacıyla yeniden saksılara dikilerek serada büyütülmeleri.

## Şekil 2. Pırasada ginogenesis uyartımı ve ginogenik bitki üretimi aşamaları



A. Çiçeklenme aşamasındaki bir pırasa bitkisi. B. Çiçek tomurcuklarını bulunduran bir umbel. C. Tomurcuk eksplantlarının yüzey sterilizasyonu. D. Sterilize edilmiş tomurcuk eksplantları. E. Ginogenesis uyartım kültürüne ekim. F. Uyarım kültüründe ginogenik bitkicığın tomurcuktan çıkışı. G. Bir ginogenik pırasa bitkicığı. H. Büyüme ortamı içeren tüpe alınmış bir ginogenik pırasa bitkicığı.

**Tablo 2.** Deney I kapsamında kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri

Uyartım ortamı	İçerik					
	Oksin		Sitokinin		Karbon	Katılaştırıcı
	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	2iP (mg/l)	Sukroz (g/l)	Agar (g/l)
<b><sup>a</sup>BDS temelli</b>						
A	2	-	2	-	100	7
A1	2	-	2	-	50	7
A2	1	-	1	-	100	7
A3	1	-	1	-	50	7
A4	-	-	-	-	100	7
A5	-	-	-	-	50	7
A6	-	-	2	-	100	7
A7	-	-	2	-	50	7
A8	2	-	-	-	100	7
A9	2	-	-	-	50	7
A10	1	-	-	-	100	7
A11	1	-	-	-	50	7
A12	-	-	1	-	100	7
A13	-	-	1	-	50	7
<b><sup>b</sup>MS temelli</b>						
B	-	-	-	-	30	8
B1	-	-	2	-	30	8
B2	2	-	-	-	30	8
B3	2	-	2	-	30	8
B4	2	-	2	-	15	8
B5	2	-	2	-	100	8
B6	-	-	1	-	100	8
B7	1	-	-	-	100	8
B8	1	-	1	-	100	8
B9	-	-	2	-	100	8
B10	2	-	-	-	100	8
B11	-	-	-	-	100	8
<b><sup>c</sup>Modifiye MS (MMS) temelli</b>						
C	-	1	-	8	100	7
C1	-	1	-	8	50	7
C2	-	-	-	8	100	7
C3	-	-	-	8	50	7
C4	-	1	-	-	100	7
C5	-	1	-	-	50	7
C6	-	-	-	4	50	7
C7	-	0.5	-	4	100	7
C8	-	-	-	-	100	7
C9	-	-	-	-	50	7
C10	-	-	-	4	100	7
<b><sup>d</sup>B5 temelli</b>						
D	-	-	-	-	75	7
D1	2	-	2	-	100	7
D2	1	-	1	-	75	7
D3	2	-	-	-	75	7
D4	-	-	2	-	75	7
D5	-	-	1	-	75	7
D6	1	-	-	-	75	7

<sup>a</sup>Bohanec ve Jakse (1999).<sup>b</sup>Murashige ve Skoog (1962)<sup>c</sup>Schum vd. (1993).<sup>d</sup>Gamborg vd. (1968).

**Tablo 3.** Deney I'de ginogenesis uyartım ortamlarına yapılan pırasa çiçek tomurcuğu ekimleri

Uyartım ortamı	Genotip				Toplam
	İnegöl <sup>a</sup>		Tarsus		
	Ön uygulama <sup>b</sup>	Normal <sup>c</sup>	Ön uygulama	Normal	
<b>A</b>	450	690	450	810	<b>2400</b>
<b>A1</b>	360	630	450	1200	<b>2640</b>
<b>A2</b>	330	840	450	480	<b>2100</b>
<b>A3</b>	450	520	450	720	<b>2140</b>
<b>A4</b>	150	90	120	150	<b>510</b>
<b>A5</b>	30	120	120	210	<b>480</b>
<b>A6</b>	420	570	450	630	<b>2070</b>
<b>A7</b>	600	450	420	730	<b>2200</b>
<b>A8</b>	450	630	390	420	<b>1890</b>
<b>A9</b>	450	540	270	1020	<b>2280</b>
<b>A10</b>	450	660	420	1120	<b>2650</b>
<b>A11</b>	450	510	420	1090	<b>2470</b>
<b>A12</b>	240	630	450	1080	<b>2400</b>
<b>A13</b>	330	510	360	850	<b>2050</b>
<b>B</b>	150	200	420	210	<b>980</b>
<b>B1</b>	450	280	420	720	<b>1870</b>
<b>B2</b>	360	570	330	750	<b>2010</b>
<b>B3</b>	240	840	360	450	<b>1890</b>
<b>B4</b>	420	0	450	480	<b>1350</b>
<b>B5</b>	450	450	300	810	<b>2010</b>
<b>B6</b>	450	500	450	450	<b>1850</b>
<b>B7</b>	330	750	420	450	<b>1950</b>
<b>B8</b>	330	600	420	570	<b>1920</b>
<b>B9</b>	480	650	390	870	<b>2390</b>
<b>B10</b>	450	540	450	870	<b>2310</b>
<b>B11</b>	300	0	150	150	<b>600</b>
<b>C</b>	390	550	390	690	<b>2020</b>
<b>C1</b>	420	520	630	600	<b>2170</b>
<b>C2</b>	390	660	360	610	<b>2020</b>
<b>C3</b>	510	360	450	1020	<b>2340</b>
<b>C4</b>	300	780	390	450	<b>1920</b>
<b>C5</b>	420	530	420	150	<b>1520</b>
<b>C6</b>	390	510	420	540	<b>1860</b>
<b>C7</b>	300	660	510	720	<b>2190</b>
<b>C8</b>	120	90	180	120	<b>510</b>
<b>C9</b>	30	180	150	150	<b>510</b>
<b>C10</b>	570	645	420	150	<b>1785</b>
<b>D</b>	90	120	120	150	<b>480</b>
<b>D1</b>	450	390	480	840	<b>2160</b>
<b>D2</b>	330	950	360	870	<b>2510</b>
<b>D3</b>	330	500	390	570	<b>1790</b>
<b>D4</b>	540	660	390	330	<b>1920</b>
<b>D5</b>	420	630	390	510	<b>1950</b>
<b>D6</b>	420	580	420	660	<b>2080</b>
<b>Toplam</b>	<b>15990</b>	<b>22085</b>	<b>16650</b>	<b>26420</b>	<b>81145</b>

<sup>a</sup>Normal büyütme şartlarında tutulan B4 ve B11 uyartım ortamlarında bulunan İnegöl çeşidine ait kültürler mikrobiyal kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiştir.

<sup>b</sup>Kültür tabakları ilk iki hafta süresince 16 saat ışık/15° C ve 8 saat karanlık/15° C de tutulmuşlardır.

<sup>c</sup>Kültür tabakları tüm deney süresi boyunca 16 saat ışık/22° C ve 8 saat karanlık/17° C de tutulmuşlardır.

(2iP)) veya her iki gruba ait BBD içermektedir. Tüm uyartım ortamlarında karbon kaynağı olarak sukroz kullanılmıştır. Bununla beraber sukroz konsantrasyonunun ginogenesis cevabı üzerine olabilecek olan etkisinin test edilmesi amacıyla bazı uyartım ortamları farklı miktarlarda sukroz ile hazırlanmıştır. Tüm uyartım ortamlarında pH 5,75 olarak ayarlanmıştır. Katılaştırıcı ajan (Difco Bacto) eklenmesinden sonra ortamlar 121° C de 15 dakika otoklavlanarak setril hale getirilmişlerdir. Steril kabin içerisinde her Petri tabağına (90x15 mm) yaklaşık 25 ml uyartım ortamı dökülmüş ve burada katılması beklenmiştir. Her Petri tabağına 30 adet açmamış çiçek tomurcuğu eksplantı konulmuş ve her uygulama için 15 adet Petri tabağı hazırlanmıştır (450 tomurcuk). Hazırlanan kültürlerin yaklaşık yarısı başlangıçtan itibaren ilk 14 gün boyunca soğuk ön uygulamasına (16 saat ışık/15° C ve 8 saat karanlık/15° C) tabi tutulmuşlardır. Bu kültürler ön uygulama sonrasında kültürlerin diğer yarısının tutulduğu (16 saat ışık/22° C ve 8 saat karanlık/17° C) büyütme odasına alınmışlardır. Kültürler haftalık olarak gözlemlenerek elde edilen veriler kayıt altına alınmışlardır. İlk haftalarda mikrobiyal kontaminasyon bulduran kültürler uzaklaştırılmıştır. Kontaminasyonlar nedeniyle oluşan kayıplar göz önüne alınarak fazladan tomurcuk ekimleri yapılmıştır. Tarsus çeşidine göre yaklaşık iki hafta daha geç çiçeklenen İnegöl çeşidine ait kültürlerde yüksek oranda gözlenen mikrobiyal kontaminasyon nedeniyle yeni kültürlerin oluşturulması için büyük çaba harcanmıştır. Yeni kültürlerin oluşturulmaya çalışıldığı dönemde serada bazı günlerde gündüz hava sıcaklığı 35° C'yi aşarak 45° C'ye kadar yükselmiştir.

Kültürlerde ginogenik kallus veya bitkicik çıkışları yanında somatik kökenli kallus ve sürgünlerin oluşumu takip edilmeye çalışılmıştır. Ginogenesis uyartımına olumlu karşılık veren çiçek tomurcukları ginogenik bitkilerin hızlı büyümelerinin sağlanması amacıyla EM ortamı (Jakse vd., 2003) içeren Petri tabaklarına transfer edilmişlerdir. Daha sonra tomurcuklardan çıkmakta olan ginogenik bitkiler gelişmelerine devam etmeleri için 12 ml MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı içeren tüplere transfer edilmişlerdir (Şekil 2H). Uyartım ortamlarındaki tomurcuklardan elde edilen tüm bitkicikler tüplere alınmışlardır. Denemelerde elde edilen somatik bitkilerin bazıları ginogenik bitkilerle karşılaştırmak amacıyla büyütülmüşlerdir. Gelişmeye devam eden bitkilerde ploidi testi yapılmıştır.

### 3.2.2 Deney II

Projenin ikinci yılında, Tarsus ve İnegöl çeşitleri yanında üç ıslah hattından (TK, PR2 ve PR6) alınan çiçek tomurcukları eksplantları kullanılarak ginogenik bitki üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde toplam yedi uyartım ortamının beş pırasa hattına ait tomurcuklarda ortaya çıkaracağı ginogenesis cevabın tespit edilmesi hedeflenmiştir (Tablo 4). Kullanılan uyartım ortamlarının iki adeti BDS, üç adeti MS ve iki adeti B5 temellidir. Bu ortamlardan üçü (A, B11 ve D7) BBD

**Tablo 4.** Deney II’de kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri

Uyartım ortamı	İçerik					
	Oksin		Sitokinin		Karbon	Katılaştırıcı
	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	2iP (mg/l)	Sukroz (g/l)	Agar (g/l)
<b><sup>a</sup>BDS temelli</b>						
A	2	-	2	-	100	7
A4	-	-	-	-	100	7
<b><sup>b</sup>MS temelli</b>						
B5	2	-	2	-	100	8
B11	-	-	-	-	100	8
B12	-	1	-	8	100	8
<b><sup>c</sup>B5 temelli</b>						
D1	2	-	2	-	100	7
D7	-	-	-	-	100	7

<sup>a</sup>Bohanec ve Jakse (1999).

<sup>b</sup>Murashige ve Skoog (1962).

<sup>c</sup>Gamborg vd. (1968).

**Tablo 5.** Deney II’de kullanılan uyartım ortamlarında kültüre alınan beş pırasa genotipine ait çiçek tomurcukları

Uyartım ortamı	Genotipler <sup>a</sup>					
	İnegöl	Tarsus	TK	PR2	PR6	Toplam
<b>A</b>	600	690	600	120	150	<b>2160</b>
<b>A4</b>	750	720	780	785	1230	<b>4265</b>
<b>B5</b>	801	600	630	300	240	<b>2571</b>
<b>B11</b>	750	690	690	1170	1230	<b>4530</b>
<b>B12</b>	750	630	690	1080	1260	<b>4410</b>
<b>D1</b>	720	570	750	90	90	<b>2220</b>
<b>D7</b>	750	750	720	1110	1200	<b>4530</b>
<b>Toplam</b>	<b>5121</b>	<b>4650</b>	<b>4860</b>	<b>4655</b>	<b>5400</b>	<b>24686</b>

<sup>a</sup>İnegöl ve Tarsus hatları açık tozlanan standart çeşitlerdir. TK, PR2 ve PR6 açık tozlanan seleksiyon materyalleridir.



içermezken, üçü 2,4-D (2 mg/l) ve BAP (2 mg/l) ve biri 2ip (8 mg/l) ve NAA (1 mg/l) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Yedi ortamın hepsinde 100 g/l sukroz kullanılmıştır. Uyarım ortamlarının hazırlanması ile ilgili diğer detaylar Deney I'de verildiği gibidir.

Çalışmada yer alan her pırasa hattından yaklaşık beş bin çiçek tomurcuğu (~25 bin) kullanılarak ıslah programları için yeterli sayıda ginogenik pırasa bitkileri üretilmeye çalışılmıştır (Tablo 5). Ginogenesis uyarımı ile ilgili uygulamalar Deney I'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.3 Flow sitometri (FCM) ile çekirdek DNAsı miktarı belirleme ve ploidi seviyesi tespiti**

Farklı kaynaklarda tetraploid pırasa genomunun büyüklüğü ~50 pg/2C ve ~60 pg/2C verilmiştir (Arumuganathan ve Earle, 1991; Zonneveld vd. 2005). Çok büyük bir genoma sahip olan pırasa bitkilerinde FCM ile ploidi seviyesi belirleme işlemi gerçekleştirilebilmek amacıyla pratik bir yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir. Projede FCM ile ploidi seviyesi belirlenmesi için ilk aşamada tohumdan yetiştirilen donör bitkilerin çekirdek deoksiribonükleik asit (DNA) miktarları tespit edilmiştir. Alan vd. (2007a) tarafından yayınlanmış olan protokol modifiye edilerek pırasa çekirdek DNA sınır ölçümü için bir yöntem geliştirilmiştir. Çekirdek DNA miktarı 10,1 pg/2C olarak tespit edilmiş olan arpa (*Hordeum vulgare*) içsel kontrol olarak kullanılmıştır (Arumuganathan ve Earle, 1991). Genellikle DNA miktarı hesaplanmak istenen bitkiden ve içsel kontrol olarak kullanılan bitkiden eşit miktarlarda taze yaprak dokusu alınması önerilmektedir (Alan vd., 2007a). FCM prosedürünün uygulanması özetle şöyledir. Pırasa ve içsel kontrol bitkisine ait taze yapraklar (her bitkiden yaklaşık 50 mg kadar) bir makas yardımıyla kesilip ıslak buz kutusunda bekletilen 65x15 mm'lik Petri tabaklarına konur. Yaprak örneklerinin bulunduğu Petri tabaklarına 1.5 ml çekirdek izolasyon tamponu (NIB; Tablo 6) konur ve yapraklar bir jilet yardımı ile homojenize edilir. Çekirdek süspansiyonu naylon filtre ile süzülerek 1,5 ml'lik Eppendorf tüpünde toplanır. Örnekler 8000 rpm'de 5 saniye santrifüj edilir. Tüplerdeki süpernatant boşaltılır ve tüp dibinde kalan çekirdek peletinin bir süre kurumaması beklenir. Daha sonra tüplere 300 µl NIB eklenir ve tüpler vortekslenir. Boyama amacı ile her tüpe optimal boyamayı sağlayacak olan miktarda PI eklenir. FCM analizi için Petri tabaklarına konan pırasa ve arpa (*Hordeum vulgare* cv. Scarpia) yaprak örnekleri soğuk NIB'de homojenize edilmiştir. Pırasanın çekirdek DNA larının iyi boyanması için uygun propidyum iyodür (PI) miktarının belirlenmesi ve boyama için gerekli koşulların optimize edilmesi için Alan vd. (2007a) tarafından kullanılan protokole bazı değişikliklere gidilmiştir. Her pırasa donör hatlarına ait fidelerden hazırlanan örneklerle yapılan boyama denemesinde tüplere 1, 5 veya 10 mg/ml konsantrasyonları olarak hazırlanmış PI'dan 10 µl eklenmiştir. Çekirdek DNA bulunduran tüplerinin yarısı 38° C ye ayarlanmış su banyosunda tutulmuşlardır. Tüplerin diğer yarısında oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra

örnekler FCM analizine kadar ıslak buz kutusunda bekletilmişlerdir. Tüm örnekler hazırlandıkları gün analiz edilmişlerdir. FCM analizi için arpaya ait 2C piki 50 ile 100 kanalları arasına gelecek şekilde konumlandırılmıştır. Pırasa materyallerinin DNA miktarları Dolezel ve Bartos (2005) tarafından geliştirilmiş olan fomüle göre hesaplanmıştır.

DNA miktarı hesaplamada kullanılan formül:

“Örneğin nükleer DNA miktarı = (örnek pırasa bitkisinden elde edilen floresan değeri/ arpa'dan elde edilen floresan değeri) X 10,1 pg (içsel kontrol olarak kullanılan arpa'nın DNA miktarı)” .

Projede uyarım kültürlerinden elde edilen ve analiz için yeterli miktarda yaprak örneği toplanabilen tüm bitkiler FCM ile analiz edilmiştir. Aklimize olan ve serada büyüyen tüm ginogenik bitkilerde muhtemel ploidi değişimlerinin tespiti edilmesi için ikinci kez analiz yapılmıştır. Pırasa bitkilerinin ploidi seviyeleri sahip oldukları çekirdek DNA sı miktarının içsel standartla (arpa) karşılaştırılmasıyla tespit edilmiştir. Miksoploidi durumunun tespit edilmesi için 2C (G0/G1) ve 4C (G2/M) piklerinde ölçülen çekirdeklerin oranları hesaplanmıştır. Örneklerde 2C ve 4C de bulunan çekirdeklerin oranlarının aynı olması veya 4C de bulunan çekirdeklerin 2C de bulunan çekirdeklerden daha fazla olması durumunda örneğin alındığı bitkinin miksoploid olduğuna karar verilmiştir.

**Tablo 6.** Çekirdek izolasyon tamponu (NIB, pH 5,75) kompozisyonu (100 ml için).

Kimyasal	Kimyasal miktarı	Final konsantrasyonu <sup>a</sup>
HEPES	360 mg	15 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	37.22 mg	1 mM
KCl	597 mg	80mM
NaCl	116.9 mg	20 mM
Triton X-100	200 ul	% 0.2 (v/v)
Sukroz	10.3 g	300 mM
Spermin	17.4 mg	0.5 mM
PVP-40	1 g	%1

### **3.4 Bitkilerin *In vivo* Koşullara Alıştırılmaları ve Büyütülmeleri**

Kültürlerden elde edilen bitkileri tüplerden çıkartılmış ve kök kısımlarındaki besi ortamı kalıntıları musluk suyu ile temizlendikten sonra otoklavlanmış torf ve perlit karışımı (2:1) içeren küçük saksılara dikilmişlerdir. Saksılar steril su ile sulandıktan sonra transparan bir naylon torba ile örtülmüş, 17° C/18 saat aydınlık için ayarlanmış olan büyütme kabinine konmuşlardır. Bu işlemde iki hafta sonra naylon torbada küçük açıklıklar oluşturulmuş ve bir ay kadar sonrada naylon tamamen uzaklaştırılmıştır. Bitkilerin gelişim durumlarına göre büyütme kabininden sera ortamına transfer edilmeleri sağlanmıştır. Isıtmasız cam serada 7 L lik saksılara aktarılan bitkilerin burada büyümeleri ve çiçeklenmeleri sağlanmıştır. Dış ortama alıştırılan bitkilerin büyümeleri takip edilecek ve sahip oldukları özellikler kayıt altına alınmıştır. Tüm bitkilerde ilk yıl morfolojik özellikleri kayıt altına alınmıştır. Projenin ilk aşamasında üretilen bitkiler ikinci yıl çiçeklenme, polen canlılığı ve tohum verimi potansiyelleri açısından karşılaştırılmışlardır.

### **3.5 Çiçeklenen Ginogenik Bitkilerde Polen Canlılığı Testi**

Laboratuvara getirilen her pırasa umbellerinden, polen canlılık testi yapmak amacıyla, henüz antesis aşamasına yeni ulaşmış dörder tomurcuk alınmıştır. Her bir tomurcuktan birer anter alınarak bir lam üzere yerleştirilmiştir. Anterler üzerine bir damla Asetokarmin (0,01 g/ml) damlatıldıktan sonra ezilerek polenlerin serbest kalarak boyanması sağlanmıştır. Boyanmış örnekler üzerine bir lamel yerleştirildikten sonra her bitkiden 200-400 polen bir ışık mikroskobu (40x) yardımıyla gözlenmişlerdir. Dolgun ve pembe renkli polenler sağlıklı ve verimli (fertil), büzük ve iyi boyanmayan polenler ise verimsiz (steril) olarak kabul edilmişlerdir. Yapılan canlılık testinde % 80 ve daha fazla canlı polen üreten bitkiler verimli olarak kabul edilmişlerdir. Çiçek tomurcuğu donörü olarak kullanılan tüm bitkilerde ginogenesis uyartım deneylerine dahil edilmeden önce polen canlılığı testi yapılmıştır. Çiçeklenme aşamasında olan ginogenik ve somatik kökenli bitkilerde tomurcuk ve anterler büyüklükleri gözlenmiştir.

### **3.6 Ginogenik Bitkilerde Tohum Üretimi**

Mayıs ayında çiçeklenmeye başlayan pırasa umbellerinde bulunan çiçek tomurcukları farklı zamanlarda antesis seviyesine ulaşır. Bir umbeldeki tomurcukların tamamen açması uzun bir süre alır (yaklaşık bir ay). Isıtmasız cam sera içerisinde böceklerden arındırılmış bir bölmede tutulan bitkilerin çiçekleri her sabah bir temiz yağlı boyası fırçası yardımıyla kendi polenleriyle kendilenmiştir. Bu işlem tüm umbellerde çiçeklenmenin tamamlanmasına kadar devam ettirilmiştir. Umbeller üzerlerindeki çiçekler kuruyup tohumlar görünmeye başlayınca bitkilerden kesilerek tamamen kurumaları için kasalarda bekletilmişlerdir. Kuruyan tohumlar

temizlenerek sayılmışlardır. Kendileme ve tohum elde etme işlemleri Deney I kapsamında üretilip 2016 yılında çiçeklenen Tarsus donörüne ait materyallerde gerçekleştirilmiştir.

### **3.7 İstatistiksel Analiz**

Ginogenesis uyartım deneyleri (I ve II) 2014 ve 2015 yıllarında gerçekleştirilmiştir. Deney I kapsamında iki OP standart pırasa çeşidine ait açmamış çiçek tomurcuklarının 44 farklı uyartım ortamında soğuk önuygulamalı ve önuygulamasız olarak hazırlanan kültürlerde gösterdikleri ginogenesis cevapları test edilmiştir. Deney II kapsamında beş OP pırasa genotipinden alınan tomurcukların yedi farklı uyartım ortamında önuygulamasız olarak kültüre edilmesiyle ginogenesis cevabı uyartımı ve ginogenik bitki üretimi hedeflenmiştir. Deneylerde aynı içeriğe sahip uyartım ortamı ve aynı genotipe ait tomurcukları bulduran her Petri tabağı bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. Tekerrürlerin sayısı donör pırasa materyallerinden uygun çiçek tomurcuklarının bulunmasına göre üç ile 42 arasında değişmektedir. Ginogenik cevap (kültüre alınmış tomurcuklarda ginogenik bitkiciklerin üretimi) ve ginogenik bitkilerin üretimindeki farklılıklar her deneysel üniteye rejenerasyon oranları alınarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar MINİTAB İstatistiksel Paket programı kullanılarak Tukey ( $P<0,05$ ) ile test edilmiştir. Serada büyütülen bitkilerin yalancı gövde çapları, yalancı gövde uzunlukları, tam bitki boyları ve tohum verimleri aynı şekilde Tukey ( $P<0,05$ ) ile test edilmiştir.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Pırasada Ginogenesis Uyartımının Optimizasyonuna Yönelik Uygulamalar**

#### **4.1.1 Deney I**

Projenin ilk aşamasında gerçekleştirilen Deney I kapsamında İnegöl ve Tarsus pırasa çeşitlerine ait bitkilerden alınan 82 bin civarında açmamış çiçek tomurcuğu eksplantı kullanılmıştır. Deney I'de İnegöl ve Tarsus donör bitkilerinin umbellerinden alınan açmamış tomurcuklarının BDS, MS modifiye MS (MMS) ve B5 temelli ortamlarda (toplam 44 besi ortamı) soğuk önuygulamalı ve önuygulamasız olarak kültüre edilmelerinin ginogenesis uyartımına verdikleri cevaplar gözlenmiş ve karşılaştırılmıştır (Tablo 7 ve 8). İnegöl ve Tarsus çeşitlerinden alınan tomurcuklar genelde BDS, MS, MMS ve B5 temelli uyartım ortamlarının büyük bir çoğunluğunda ginogenesis cevabı göstermiştir. Pırasa tomurcuklarının ginogenesis cevabı göstermesi kültüre alınmış tomurcuklarda ginogenik bitkiciklerin üretilmesi anlamında kullanılmıştır. Kültürlerde önuygulama ve genotip etkisi hesaba katılmaksızın yapılan karşılaştırmada deney I'de elde edilen en yüksek ginogenesis cevapları A4 (% 3, 33), B11 (% 3, 33)

6,67), C4 (% 3,33) ve D5 (% 3,22) ortamlarında oluşturulan kültürlerden elde edilmiştir. Bu ortamlardan A4 ve B11 ortamları BBD içermezken, C4 ortamı 1 mg/l NAA ve D5 1 mg/l BAP içermektedir. İlk üç ortam (A4, B11 ve C4) 100 g/l sukroz içerirken D5 ortamında ise 75 g/l sukroz bulunmaktadır. İki pırasa genotipine ait tomurcukların B, B1, B4 ve C2 ortamlarında ginogenesis cevabı göstermedikleri ortaya çıkmıştır. Bu ortamlardan B, B1 ve B4 MS temellidir. B ortamı BBD içermez ve 30 g/l sukroz ile hazırlanmıştır. B1 ortamı 2 mg/l BAP ve 30 g/l sukroz ile hazırlanmıştır. B4 ortamı ise 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l BAP ile 15 g/l sukroz içermektedir. MMS temelli olan C2 ortamında ise 8 mg/l 2iP ve 100 g/l sukroz ile hazırlanmıştır.

Deney I kapsamında İnegöl donöründen 36 ve Tarsus donöründen 191 olmak üzere toplam 227 ginogenik bitki elde edilmiştir. Kültür tüplerinde sağlıklı olarak büyümeye devam eden ginogenik bitkiler sahip oldukları ploidi seviyelerinin tespiti için FCM ile analiz edilmişlerdir.

#### **4.1.1.1 İnegöl Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

İnegöl genotipine ait tomurcuklarla gerçekleştirilen çalışmalarda önyuğulamaya tabi tutulan 15990 tomurcuktan toplam 50 (% 0,31) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 7). Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 29 tanesi (% 0,18) gelişmeye devam ederek büyümüşlerdir (% 58). Ön uygulamasız olarak kültürde tutulan 22085 tomurcuktan toplam 14 (% 0,06) ginogenik bitkicik üretilmiştir. Bunların yarısı (% 0,03) gelişmeye devam ederek bitki haline dönüşmüştür (% 50). Hem BBD içeren hemde BBD içermeyen ortamlarda kültüre alınmış olan İnegöl çeşidine ait tomurcuklarda ginogenik bitkicik gelişimi gözlenmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi önyuğulamalı veya önyuğulamasız olarak farklı uyartım ortamlarındaki kültürlerden elde edilen ginogenik bitkicik oranları arasında önyuğulamasız BDS temelli ortamda oluşturulan kültürler dışında önemli farkların bulunmadığını göstermiştir.

İnegöl genotipi ile gerçekleştirilen önyuğulamalı kültürlerde en yüksek ginogenesis cevabı BDS temelli uyartım ortamlarında gözlenmiştir. Önyuğulamalı BDS temelli ortamlarda ortalama % 0,36 oranında ginogenik bitkicik üretimi gerçekleşmiştir. Önyuğulamalı A3, A6, A7, A8, A10 ve A12 kültürlerinde % 0,42 ile 1,33 arasında değişen oranlarda ginogenesis uyartımı (ginogenik bitkicik üretimi) sağlanmıştır. Diğer önyuğulamalı BDS temelli uyartım kültürlerinde ise ginogenesis uyartımı gerçekleşmemiştir. Önyuğulamalı BDS ortamlarında üretilen ginogenik bitkiciklerin 12 adeti (% 0,23) tüpte gelişmeye devam ederek bitki haline gelmiştir (% 63,15) Ön uygulamanın yapılmadığı BDS temelli ortamlarda ginogenik bitkicik üretimi % 0,15 oranında gerçekleşmiştir. Bu kültürlerde ginogenik cevap A3, A4, A6 ve A8 ortamlarında %

0,16 ile 3,33 arasındaki oranlarında gerçekleşmiştir. BBD içermeyen A4 ortamında önuygulmasız olarak kültüre edilen İnegöl genotipine ait tomurcuklarda diğer ortamlara göre önemli oranda daha yüksek ginogenesis cevabı sağlamıştır. Önuygulmasız olarak A4 ortamına ekilen İnegöl çeşidine ait 90 tomurcuktan üç ginogenik bitkicik (% 3,33) elde edilmiştir. Bu kültürden elde edilen bitkiciklerin iki tanesi (% 2,22) tüpte büyümeye devam etmiştir (% 66,67). Önuygulamasız BDS kültürlerinden elde edilen ginogenik bitkiciklerin altı tanesi (% 0,08) tüpe aktarıldıktan sonra bitki aşamasına gelmiştir (% 54,54).

İnegöl çeşidine ait tomurcukların önuygulamalı olarak MS temelli ortamlarda kültüre edilmesi ile 11 ginogenik bitkicik (% 0,25) elde edilmiştir. Önuygulamalı B5, B6 ve B11 kodlu ortamlarda % 0,22 ile 1,78 arasında ginogenik bitkicik eldesi sağlanmıştır. Bu bitkilerin sekiz adeti (% 0,18) bitki haline dönüşmüştür (% 72,73). Ginogenik bitkicik üretiminin sağlandığı B11 ortamı BBD içermemektedir. İnegöl çeşidine ait tomurcuklarla önuygulamasız olarak MS temelli ortamlarda oluşturulan kültürlerde ginogenesis uyarımı gözlenmemiştir. Önuygulama yapılmamış MS temelli tomurcuk kültürleri mikrobiyal kontaminasyon nedeniyle hemen hemen tamamen kaybedilmiş olduğu için yeniden hazırlanmıştır. Yeniden hazırlanan kültürlerde ginogenesis cevabı gözlenmemiştir.

Önuygulamalı olarak modifiye MS (MMS) temelli ortamlarda kültüre alınmış olan İnegöl çeşidine ait çiçek tomurcuklarında 13 adet ginogenik bitkicik (% 0,33) gelişimi gözlenmiştir. C1, C3, C4, C6, C7 ve C10 kodlu ortamlarda İnegöl tomurcuklarından elde edilen ginogenik cevaplar % 0,24 ile 1,18 arasında gerçekleşmiştir. Bu bitkilerin altı adeti (% 0,15) gelişmeye devam ederek bitkiye dönüşmüştür (% 46,15). Önuygulama yapılmamış MMS temelli tomurcuk kültürlerinin çoğu mikrobiyal kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiş olduğu için bu kültürler yeniden hazırlanmıştır. Yeniden hazırlanan kültürlerde ginogenesis cevabı gözlenmemiştir.

Önuygulamalı olarak B5 temelli ortamlarda kültüre alınmış olan İnegöl çeşidine ait çiçek tomurcuklarında yedi adet ginogenik bitkicik (% 0,27) gelişimi gözlenmiştir. D, D2, D3 ve D4 ortamlarında önuygulamalı olarak oluşturulan kültürlerde % 0,30 ile 1,11 arasında ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Bu bitkiciklerin sadece üç adeti (% 0,12) bitkiye dönüşmüştür (% 42,86). Önuygulama yapılmayan B5 temelli ortamlarda İnegöl çeşidine ait tomurcuklarla başlatılan kültürlerde üç adet ginogenik bitkicik (% 0,08) üretilmiştir. Önuygulamasız olarak ekilen İnegöl çeşidine ait tomurcuklardan sadece D4 ortamında kültüre alınmış olanlarda % 0,45 oranında ginogenesis cevabı gözlenmiştir. Bitkiciklerin sadece bir tanesi (% 0,03) gelişmeye devam ederek bitki haline gelmiştir (% 33,3).

#### 4.1.1.2. Tarsus Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı

Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla kurulan önyulamaya tabi tutulmuş 16650 tomurcuktan toplam 87 (% 0,52) ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 8). Bu uygulamadan elde edilen 51 bitkicik (% 0,31) gelişmeye devam ederek büyümüşlerdir (% 58,62). Aynı genotipten alınan ve önyulamaya tabi tutulmayan 27320 tomurcukla oluşturulan kültürlerden toplam 226 (% 0,83) ginogenik bitkicik üretilmiştir. Bunlardan 140 bitkicik (% 0,51) gelişmeye devam ederek bitki haline dönüşmüştür (% 61,94). Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla önyulamalı ve önyulamasız olarak oluşturulan ginogenesis uyarım ortamlarının büyük bir çoğunluğunda ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizlere göre Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla önyulamalı olarak gerçekleştirilen kültürlerden elde edilen ginogenesis cevap oranları arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Aynı çeşide ait tomurcuklarla önyulamasız olarak gerçekleştirilen kültürlerden elde edilen ginogenesis cevap oranları arasında ise önemli farklılıklar bulunmuştur.

Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla önyulama yapılmış BDS temelli ortamlarda oluşturulan kültürlerde 30 ginogenik bitkicik (% 0,57) elde edilmiştir. Önyulamalı A, A1, A2, A3, A4, A5, A8 ve A12 kültürlerinde % 0,44 ile 2,00 arasında değişen oranlarda ginogenesis uyarımı sağlanmıştır. Diğer önyulamalı BDS temelli uyarım kültürlerinde ise ginogenesis uyarımı gerçekleşmemiştir. Bu uygulamada elde edilen 19 bitkicik (% 0,36) gelişmeye devam ederek büyümüştür (% 63,33). Aynı çeşide ait tomurcuklarla önyulamasız olarak BDS temelli ortamlarda oluşturulan kültürlerde 84 ginogenik bitkicik (% 0,80) üretilmiştir. A, A5 ve A7 haricindeki BDS temelli kültürlerde % 0,10 ile 2,62 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevabı gözlenmiştir. Bunlardan 61 bitkicik (% 0,58) gelişmeye devam ederek bitki haline gelmiştir (% 72,62).

MS temelli ortamlarda önyulamalı kültürlere ekilen Tarsus çeşidine ait tomurcuklardan 11 ginogenik bitkicik (% 0,24) elde edilmiştir. Önyulamalı B5, B7, B8 ve B9 kültürlerine ekilmiş olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklarından % 0,26 ile 1,43 arasında değişen oranlarda ginogenesis uyarımı sağlanmıştır. Ginogenik bitkiciklerden altı tanesi (% 0,13) bitkiye dönüşmüştür (% 54,55). Aynı çeşide ait tomurcuklarla oluşturulan önyulamasız MS temelli kültürlerde 48 ginogenik bitkicik (% 0,70) elde edilmiştir. B, B1 ve B4 dışındaki diğer MS temelli kültürlerde % 0,13 ile 6,67 arasında ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Tarsus çeşidine ait tomurcuklar en yüksek ginogenesis cevabı önyulamasız olarak B11 ortamında oluşturulan kültürlerde göstermişlerdir. Önyulamasız B11 kültüründe bulunan Tarsus çeşidine ait 150 tomurcuktan 10 ginogenik bitkicik (% 6,67) elde edilmiştir. Bu ortamda elde edilen tüm bitkicikler gelişerek bitkiye dönüşmüşlerdir. Tarsus çeşidine ait tomurcukların BBD içermeyen B11 ortamında gösterdikleri ginogenesis cevabı miktarı Deney I'de elde edilen en yüksek

ginogenesis başarısı oranıdır. Önyuğulamasız olarak MS temelli kùltùrlerden elde edilen 34 (% 50) bitkicik gelişerek bitkiye dönüşmüştür (% 74,47).

MMS temelli ortamlarda önyuğulamalı kùltùrlere ekilen Tarsus çeşidine ait tomurcuklardan toplam 22 ginogenik bitkicik (% 0,51) elde edilmiştir. Önyuğulamalı sekiz MMS temelli ortamda (C, C1, C4, C6, C7, C8, C9 ve C10) ekilmiş olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklarından % 0,16 ile 1,54 arasında değişen oranlarda ginogenesis uyartımı sağlanmıştır. Bunlardan 13 ginogenik bitki (% 0,30) üretilmiştir (% 59,09). Önyuğulamasız olarak MMS kùltùrlere ekilmiş olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklardan toplam 41 (% 0,72) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Önyuğulamasız yedi MMS temelli ortamda (C, C3, C4, C5, C6, C8 ve C10) kùltùrlere ekilmiş olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklarından % 0,29 ile 3,33 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevabı gözlenmiştir. Önyuğulamasız C4 kùltüründe bulunan Tarsus çeşidine ait 450 tomurcuktan 15 ginogenik bitkicik (% 3,33) elde edilmiştir. Bu ortamda elde edilen bitkiciklerden yedi tanesi (% 1,56) gelişerek bitkiye dönüşmüşlerdir (% 46,6). Tarsus çeşidine ait tomurcukların 1 mg/l NAA içeren C4 ortamında gösterdikleri ginogenesis cevabı miktarı Deney I'de elde edilen yüksek ginogenesis başarısı oranlarından biridir. Önyuğulamasız olarak MMS temelli kùltùrlerden elde edilen 16 (% 0,28) bitkicik gelişerek bitkiye dönüşmüştür (% 36,36).

Önyuğulamalı olarak B5 temelli ortamlarda kùltùre alınmış olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklarında 24 ginogenik bitkicik (% 0,94) gelişimi gözlenmiştir. Önyuğulamalı kùltùrlerde bulunan Tarsus çeşidine ait tomurcuklarda D ortamı dışındaki ortamlarda (D1, D2, D3, D4, D5 ve D6) % 0,26 ile 1,66 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Önyuğulamalı B5 temelli kùltùrlerden elde edilen bitkiciklerin 13 tanesi (% 0,51) bitkiye dönüşmüştür (% 54,16). Önyuğulama yapılmayan B5 temelli ortamlarda Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla başlatılan kùltùrlerde 53 ginogenik bitkicik (% 1,23) üretilmiştir. Önyuğulamasız olarak B5 temelli ortamlarda kùltùre alınmış olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklar D1, D2, D5 ve D6 ortamlarında % 0,15 ile 3,22 arasında ginogenesis cevabı göstermişlerdir. Deney I de B5 temelli kùltùrlerde görülen en yüksek ginogenesis cevabı önyuğulamasız olarak D5 ortamına ekilmiş olan Tarsus çeşidine ait tomurcuklar göstermiştir. Sadece 1 mg/l BAP içeren D5 ortamına ekilmiş olan 900 tomurcuktan 29 ginogenik bitkicik (% 3,22) üretilmiştir. Bu kùltürde edilen bitkiciklerin 14 tanesi (% 1,56) gelişerek bitkiye dönüşmüştür (% 48,28). Önyuğulamasız olarak B5 temelli kùltùrlerden elde edilen bitkiciklerin 29 tanesi (% 0,67) gelişerek bitkiye dönüşmüştür (% 54,72).



**Tablo 7. Deney I kapsamında farklı ginogenesis uyartım ortamlarında kültüre alınan İnegöl genotipine ait çiçek tomurcuklarında gözlenen ginogenik cevaplar**

Genotip								
İnegöl		Önyuğulama <sup>a</sup>			Önyuğulamasız <sup>b</sup>			
Uyartım ortamı	Ekilen tomurcuk	Ginogenik bitkicik (%) <sup>c</sup>	Ginogenik bitki (%) <sup>c</sup>	Bitkiye dönüşüm oranı <sup>d</sup>	Ekilen tomurcuk	Ginogenik bitkicik (%) <sup>c</sup>	Ginogenik bitki (%) <sup>c</sup>	Bitkiye dönüşüm oranı <sup>d</sup>
A	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	690	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A1	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	630	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A2	330	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	840	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A3	450	3 (0,67)A	2 (0,45)A	66,67	520	6 (1,11)B	4 (0,74)A	66,67
A4	150	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	90	3 (3,33)A	2 (2,22)A	66,67
A5	30	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	120	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A6	420	3 (0,71)A	1 (0,24)A	33,33	570	1 (0,18)B	0 (0,00)A	0
A7	600	3 (0,50)A	0 (0,00)A	0	450	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A8	450	6 (1,33)A	6 (1,33)A	100	630	1 (0,16)B	0 (0,00)A	0
A9	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	540	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A10	450	3 (0,67)A	2 (0,44)A	66,67	660	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A11	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	510	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A12	240	1 (0,42)A	1 (0,42)A	100	630	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
A13	330	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	510	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
<b>ΣBDS</b>	<b>5160</b>	<b>19 (0.36)</b>	<b>12 (0.23)</b>	<b>63,15</b>	<b>7390</b>	<b>11 (0.15)</b>	<b>6 (0.08)</b>	<b>54,54</b>
B	150	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	200	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B1	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	280	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B2	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	570	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B3	240	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	840	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B4	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	0	-	-	-
B5	450	8 (1,78)A	7 (1,56)A	87,5	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B6	450	1 (0,22)A	0 (0,00)A	0	500	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B7	330	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	750	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B8	330	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	600	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B9	480	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	650	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B10	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	540	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
B11	300	2 (0,60)A	1 (0,30)A	50	0	-	-	-
<b>ΣMS</b>	<b>4410</b>	<b>11 (0.25)</b>	<b>8 (0.18)</b>	<b>72,73</b>	<b>5380</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
C	390	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	550	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C1	420	1 (0,24)A	0 (0,00)A	0	520	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C2	390	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	660	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C3	510	6 (1,18)A	4 (0,78)A	66,67	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C4	300	1 (0,33)A	0 (0,00)A	0	780	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C5	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	530	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C6	390	1 (0,26)A	1 (0,26)A	100	510	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C7	300	1 (0,33)A	0 (0,00)A	0	660	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C8	120	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	90	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C9	30	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	180	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
C10	570	3 (0,53)A	1 (0,18)A	33,33	645	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
<b>ΣMMS</b>	<b>3840</b>	<b>13 (0.33)</b>	<b>6 (0.15)</b>	<b>46,15</b>	<b>5485</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
D	90	1 (1,11)A	0 (0,00)A	0	120	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
D1	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	390	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
D2	330	1 (0,30)A	0 (0,00)A	0	950	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
D3	330	1 (0,30)A	0 (0,00)A	0	500	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
D4	540	4 (0,74)A	3 (0,37)A	75	660	3 (0,45)A	1 (0,15)A	33,33
D5	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	630	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
D6	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	580	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
<b>ΣB5</b>	<b>2580</b>	<b>7 (0.27)</b>	<b>3 (0.12)</b>	<b>42,86</b>	<b>3830</b>	<b>3 (0.08)</b>	<b>1 (0.03)</b>	<b>33,3</b>
<b>Toplam</b>	<b>15990</b>	<b>50 (0,31)</b>	<b>29 (0,18)</b>	<b>58</b>	<b>22085</b>	<b>14 (0,06)</b>	<b>7 (0,03)</b>	<b>50</b>

<sup>a</sup>Tomurcuklar uyartım ortamlarına ekildikten sonra 15° C'de 14 gün düşük sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Tomurcuklar daha sonra normal sıcaklık şartlarına alınmışlardır.

<sup>b</sup>Tomurcuklara herhangi bir sıcaklık uygulaması yapılmamıştır.

<sup>c</sup>Aynı harfleri almış değerler arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır (Tukey, P>0.05).

<sup>d</sup>Ginogenik bitkiye dönüşüm oranı, ginogenik bitkicik sayısına göre yüzdelik alınarak hesaplanmıştır.

**Tablo 8. Deney I kapsamında farklı ginogenesis uyartım ortamlarında kültüre alınan Tarsus genotipine ait çiçek tomurcuklarında gözlenen ginogenik cevaplar**

Genotip								
Tarsus		Ön uygulama <sup>a</sup>			Ön uygulamasız <sup>b</sup>			
Uyartım ortamı	Ekilen tomurcuk	Ginogenik bitkicik (%) <sup>c</sup>	Ginogenik bitki (%) <sup>c</sup>	Bitkiye dönüşüm oranı <sup>d</sup>	Ekilen tomurcuk	Ginogenik bitkicik (%) <sup>c</sup>	Ginogenik bitki (%) <sup>c</sup>	Bitkiye dönüşüm oranı <sup>d</sup>
A	450	9 (2,00)A	6 (1,33)A	66,66	810	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
A1	450	3 (0,67)A	3 (0,67)A	100	1200	12 (1,00)A	9 (0,75)A	75
A2	450	5 (1,11)A	1 (0,22)A	20	480	6 (1,25)A	3 (0,63)A	50
A3	450	4 (0,89)A	3 (0,67)A	75	720	1 (0,14)A	1 (0,14)A	100
A4	120	2 (1,67)A	2 (1,67)A	100	150	1 (0,67)A	0 (0,00)A	0
A5	120	2 (1,67)A	2 (1,67)A	100	210	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
A6	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	630	14 (2,22)A	13 (2,06)A	92,86
A7	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	730	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0
A8	390	3 (0,77)A	0 (0,00)A	0	420	11 (2,62)A	9 (2,14)A	81,82
A9	270	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	1020	1 (0,10)A	0 (0,00)A	0
A10	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	1120	17 (1,49)A	13 (1,14)A	76,47
A11	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	1090	11 (0,99)A	7 (0,64)A	63,64
A12	450	2 (0,44)A	2 (0,44)A	100	1080	9 (0,83)A	6 (0,56)A	66,67
A13	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	850	1 (0,12)A	0 (0,00)A	0
<b>ΣBDS</b>	<b>5220</b>	<b>30 (0.57)</b>	<b>19 (0.36)</b>	<b>63,33</b>	<b>10510</b>	<b>84 (0.80)</b>	<b>61 (0.58)</b>	<b>72,62</b>
B	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	210	0 (0,00)B	0 (0,00)B	0
B1	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	720	0 (0,00)B	0 (0,00)B	0
B2	330	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	750	1 (0,13)B	1 (0,13)B	100
B3	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	450	2 (0,44)B	2 (0,44)B	100
B4	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	480	0 (0,00)B	0 (0,00)B	0
B5	300	2 (0,67)A	1 (0,33)A	50	810	9 (1,11)B	9 (1,11)B	100
B6	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	450	5 (1,11)B	2 (0,44)B	40
B7	420	6 (1,43)A	3 (0,71)A	50	450	3 (0,67)B	1 (0,22)B	33,3
B8	420	2 (0,48)A	1 (0,24)A	50	570	5 (0,88)B	4 (0,70)B	80
B9	390	1 (0,26)A	1 (0,26)A	100	870	3 (0,34)B	1 (0,11)B	33,3
B10	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	870	10 (1,15)B	4 (0,46)B	0,40
B11	150	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	150	10 (6,67)A	10 (6,67)A	100
<b>ΣMS</b>	<b>4560</b>	<b>11 (0.24)</b>	<b>6 (0.13)</b>	<b>54,55</b>	<b>6780</b>	<b>48 (0.70)</b>	<b>34 (0.50)</b>	<b>74,47</b>
C	390	3 (0,77)A	2 (0,51)A	66,66	690	10 (1,45)B	4 (0,58)A	40
C1	630	1 (0,16)A	0 (0,00)A	0	600	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
C2	360	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	610	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
C3	450	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	1020	3 (0,29)B	2 (0,20)A	66,66
C4	390	6 (1,54)A	3 (0,77)A	50	450	15 (3,33)A	7 (1,56)A	46,66
C5	420	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	420	6 (1,43)B	2 (0,48)A	33,33
C6	420	3 (0,71)A	1 (0,24)A	33,33	540	1 (0,19)B	0 (0,00)A	0
C7	510	5 (0,98)A	4 (0,78)A	80	720	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
C8	180	1 (0,56)A	1 (0,56)A	100	120	2 (1,67)B	0 (0,00)A	0
C9	150	1 (0,67)A	1 (0,67)A	100	150	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
C10	420	2 (0,48)A	1 (0,24)A	0	390	4 (1,03)B	1 (0,26)A	25
<b>ΣMMS</b>	<b>4320</b>	<b>22 (0.51)</b>	<b>13 (0.30)</b>	<b>59,09</b>	<b>5710</b>	<b>41 (0.72)</b>	<b>16 (0.28)</b>	<b>36,36</b>
D	120	0 (0,00)A	0 (0,00)A	0	150	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
D1	480	5 (1,04)A	4 (0,83)A	80	840	12 (1,43)B	8 (0,95)A	66,66
D2	360	6 (1,66)A	1 (0,28)A	16,66	870	11 (1,26)B	7 (0,81)A	63,63
D3	390	6 (1,54)A	4 (1,03)A	66,66	570	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
D4	390	3 (0,77)A	3 (0,77)A	100	330	0 (0,00)B	0 (0,00)A	0
D5	390	1 (0,26)A	0 (0,00)A	0	900	29 (3,22)A	14 (1,56)A	48,28
D6	420	3 (0,71)A	1 (0,24)A	33,33	660	1 (0,15)B	0 (0,00)A	0
<b>ΣB5</b>	<b>2550</b>	<b>24 (0.94)</b>	<b>13 (0.51)</b>	<b>54,16</b>	<b>4320</b>	<b>53 (1.23)</b>	<b>29 (0.67)</b>	<b>54,72</b>
<b>Toplam</b>	<b>16650</b>	<b>87 (0,52)</b>	<b>51 (0,31)</b>	<b>58,62</b>	<b>27320</b>	<b>226 (0,83)</b>	<b>140 (0,51)</b>	<b>61,94</b>

<sup>a</sup>Tomurcuklar uyartım ortamlarına ekildikten sonra 15° C'de 14 gün düşük sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Tomurcuklar daha sonra normal sıcaklık şartlarına alınmışlardır.

<sup>b</sup>Tomurcuklara herhangi bir sıcaklık uygulaması yapılmamıştır.

<sup>c</sup>Aynı harfleri almış değerler arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır (Tukey, P>0.05).

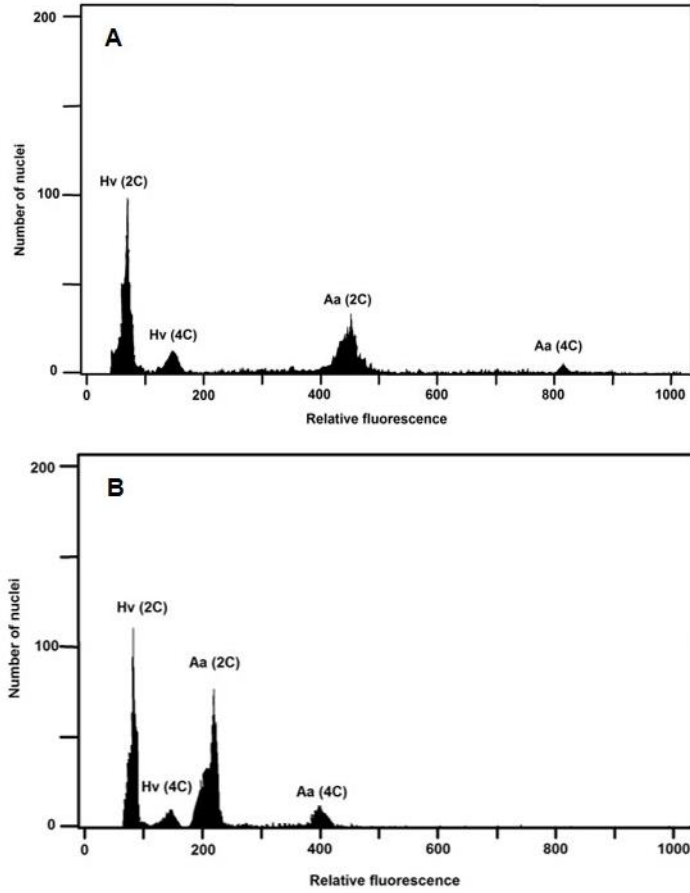
<sup>d</sup>Ginogenik bitkiye dönüşüm oranı, ginogenik bitkicik sayısına göre yüzdelik alınarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.1.3 Deney I Kapsamında Kullanılan Donör Pırasa Bitkileri ve *In vitro* Kùltürlerden Elde Edilen Bitkilerde FCM Analizi ile Ploidi Seviyesi Ölçümleri

İlk aşamada FCM analizi ile ÷lkemizde yoğun olarak tarımı yapılan kùltür pırasalarının çekirdek DNA miktarının tespiti için güvenilir bir yöntem oluşturulmuştur. Bu amaçla Alan vd. (2007a) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek pırasa örneklerinin analizi sağlanmıştır. Pırasa örneklerinde kullanılabilcek protokolda içsel kontrol olarak kullanılan arpa yapraklarının 10 mg olarak kullanımı, çekirdek DNA sının çökertilmesi amacıyla uygulanan sntrifigasyon işleminin yapılmaması, PI miktarının (1 mg/ml PI'dan her örnek için 10 ul) değıştirilmemesi ve örneklerin PI eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmesi gerekmektedir. Bu işlemden sonra ıslak buzda tutulan örnekler aynı gün FCM de analiz edilmişlerdir. Pırasa çekirdek DNA sı miktarı tespiti için donör genotiplere ait tohumlardan üretilmiş olan 3-4 yapraklı fideler kullanılmıştır. FCM analizi sonucunda tetraploid pırasanın somatik hücrelerinde ~60 pg/2C DNA bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durumda diploid ginogenik bitkilerin somatik hücrelerinde ~30 pg/2C DNA bulunması beklenmektedir (Şekil 3A, B). FCM analizi için yeterli miktarda yaprak üretmiş olan toplam 141 ginogenik bitkide ploidi analizi yapılmıştır (Tablo 9). Ginogenik bitkilerin yaklaşık %70 lik kısmının diploid ( $1n = 2x$ ), olduğu tespit edilmiştir. FCM analizleri ginogenesis yöntemi ile İnegöl ve Tarsus genotiplerinin her ikisinden de kromozom sayısı yarılanmış bitkilerin başarıyla üretildiğini göstermiştir. İnegöl donöründen elde edilen 28 ginogenik bitkiden 14 tanesinde (% 50) ve Tarsus dönöründen elde edilen 113 ginogenik bitkiden 81 tanesinde (% 71,68) ~30 pg/2C DNA ya bulunduğu tespit edilmiştir.

Toplamda test edilen 141 ginogenik bitkiden 95 tanesinin (% 67,38) diploid ( $2x$ ) oldukları tespit edilmiştir. İnegöl donöründen elde edilen bir ginogenik bitkinin diploid ve tetraploid hücreler için mixoploid ( $2x+4x$ ) olduğu bunun dışındaki tüm ginogenik bitkilerin tetraploid ( $4x$ ) olduğu bulunmuştur. Uyarım ortamlarında kùltüre konmuş olan İnegöl ve Tarsus donör bitkilerine ait tomurcukların bazal kısımlarından elde edilen somatik bitkilerde yapılan FCM analizinde tamamının tetraploid oldukları tespit edilmiştir. Aklimize edildikten sonra serada büyütölen ginogenik bitkilerde yapılan ikinci FCM analizi sayesinde *in vitro* aşamada diploid sınıfına konmuş olan dört ginogenik bitkinin büyüme sürecinde meydana gelen spontan kromozom katlaması ile tetraploid bitkilere dönüştükleri tespit edilmiştir. Bu ginogenik bitkiler spontan tetraploid olarak sınıflandırılmıştır.

**Şekil 3.** İçsel kontrol olarak arpanın (Hv) kullanıldığı tetraploid ve diploid pırasa (Aa) materyallerinin FCM analizinde elde edilen histogramlar



A. Tetraploid ( $2n = 4x$ ) pırasa fidesi. B. Diploid ( $1n = 2x$ ) ginogenik pırasa bitkisi. 2C ve 4C pikleri G0/G1 ve G2/M aşamalarını göstermektedir.

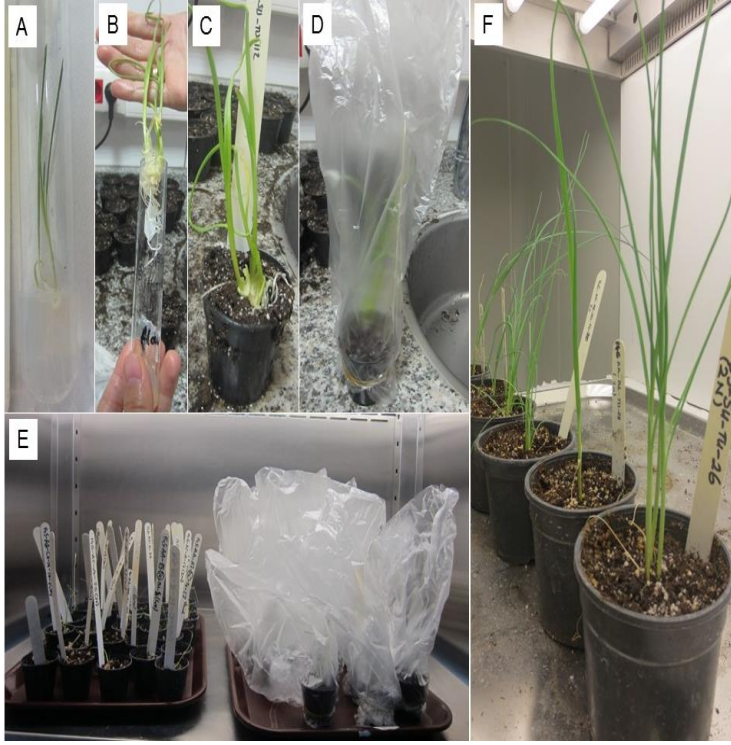
**Tablo 9.** Deney I kapsamında İnegöl ve Tarsus pırasa genotiplerinden elde edilen ginogenik bitkilerin ploidi seviyeleri

Genotip	Ön uygulama (+/-)	Analiz edilen bitki sayısı	Ploidi seviyesi		
			2x, no. (%)	2x+4x, no (%)	4x, no. (%)
İnegöl	+	19	8 (44.44)	0	11 (61.11)
	-	9	6 (66.66)	1 (11.11)	2 (22.22)
Tarsus	+	31	22 (70.97)	0	9 (29.03)
	-	82	59 (71.95)	0	23 (28.05)
<b>Toplam</b>		<b>141</b>	<b>95 (67.38)</b>	<b>1 (0.72)</b>	<b>45 (31.92)</b>

#### **4.1.1.4 Deney I Kapsamında İnegöl ve Tarsus Pırasa Genotiplerine Ait Ginogenik, Somatik ve Tohumdan Üretilmiş Bitkilerin Serada Büyütülmesi ve Karakterize Edilmesi**

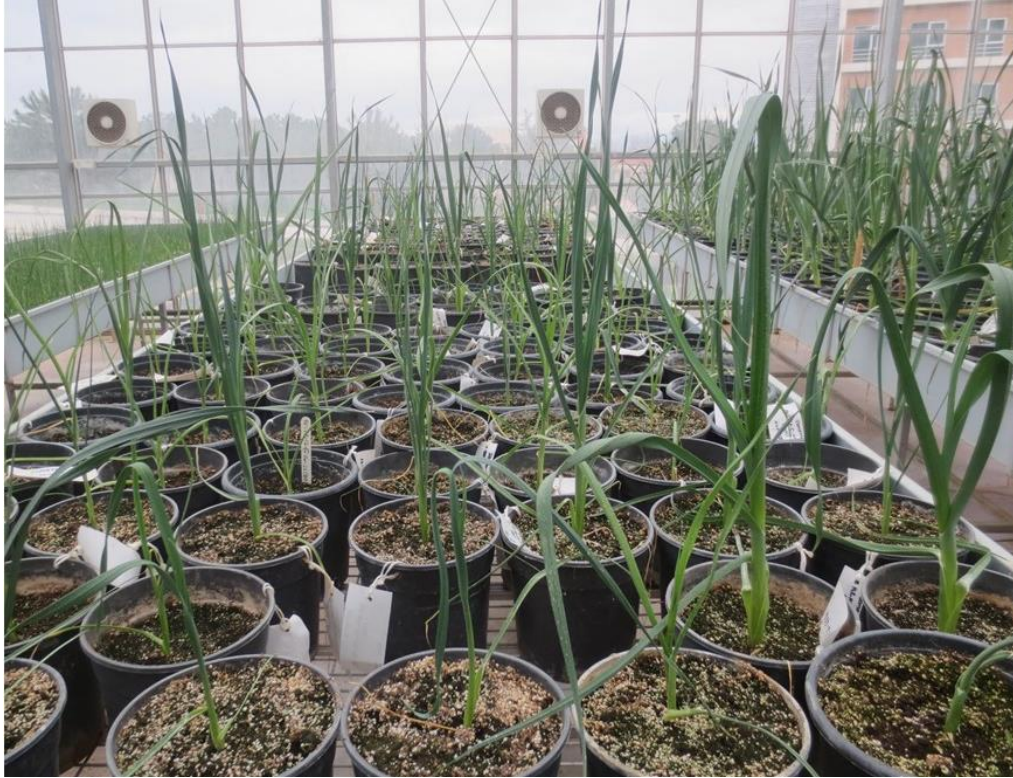
Deney I kapsamında *in vitro* kültürlerde üretilen ginogenik bitkiler, somatik bitkiler ve donör hatlara ait tohumların MS ortamında çimlendirilmesiyle elde edilen fideler kültür ortamından çıkartılarak dış ortama aklimize edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4A-F). Bu aşamada bazı ginogenik ve somatik kökenli bitkilerde kayıplar meydana gelmiştir. İnegöl donör materyalinden elde edilmiş olan sekiz diploid ginogenik bitki (% 57,14) ve 11 tetraploid ginogenik bitki (% 84, 62 ) aklimize olmuştur. Tarsus donör materyalinden üretilmiş olan 38 diploid ginogenik bitki (% 46,91) ve 30 tetraploid ginogenik bitki (% 93,75) aklimize olmuştur. İnegöl donör materyalinden elde edilen 48 somatik kökenli bitki ve 10 fide ile Tarsus donör materyalinden elde edilen 161 somatik kökenli bitki ve 10 fide aklimize edilerek kontrol materyali olarak büyütülmüşlerdir. Ağustos ayında yapılan gözlemlerde yalancı gövde çapı, yalancı gövde uzunluğu ve tüm bitki uzunluğu ölçümleri yapılmıştır (Tablo 10; Şekil 5). İnegöl çeşidine ait materyallerde yapılan ölçümlerde diploid ginogenik bitkilerin karşılaştırıldıkları tetraploid bitkilere göre daha ince yalancı gövde ve daha kısa bitki uzunluğuna sahip oldukları tespit edilmiştir. İnegöl çeşidine ait materyallerde yalancı gövde uzunluğu için yapılan ölçümlerde materyaller arasında önemli farklar görülmemiştir. Tarsus çeşidine ait materyallerde diploid ve tetraploid ginogenik bitkilerin somatik ve tohumdan üretilen bitkilere göre daha ince yalancı gövdelere sahip oldukları bulunmuştur. Diploid ginogenik bitkilerin boylarının tetraploid olan diğer bitkilerden önemli oranda daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Yalancı gövde uzunluğu ölçümlerinde diploid ve tetraploid ginogenik bitkiler ile tohumdan üretilmiş bitkiler arasında önemli bir fark bulunmazken somatik bitkilerin en uzun yalancı gövdelere sahip olduğu gözlenmiştir.

**Şekil 4.** Ginogenik pırasa bitkilerinin dış ortama aklimize edilmeleri



A. Kültür tüpünde bulunan bir ginogenik pırasa bitkisi. B. Ginogenik bitkinin tüpten çıkartılması. C. Besi ortamından temizlenmiş ginogenik bitkinin küçük saksıya aktarılması. D. Ginogenik bitkinin naylon poşet ile muhafaza edilmesi. E. Dış ortama adaptasyonun sağlanması için ısı ve ışık ayarlı kabinde büyütme. F. Dış koşullara adapte olmuş ve seraya transfer edilmeye hazır ginogenik bitkiler.

**Şekil 5.** Deney I kapsamında elde edilen ginogenik pırasa bitkilerinin serada büyütülmeleri



**Tablo 10.** İnegöl ve Tarsus pırsa hatlarına ait ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen bitkilerin morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması.

Genotip	Kaynak (ginogenik/ somatik/ tohumdan)	Ploidi Seviyesi	Bitki Sayısı	Yalancı gövde çapı (mm) <sup>a</sup>	Yalancı gövde uzunluğu (cm) <sup>a</sup>	Bitki uzunluğu (cm) <sup>a</sup>
İnegöl	Ginogenik	2x	8	15.98 B	30 A	40.63 B
	Ginogenik	4x	11	21.85 AB	28.64 A	78,18 A
	Somatik	4x	48	17,87 B	39.69 A	79.60 A
	Tohumdan	4x	10	23.22 A	31,3 A	81.6 A
Tarsus	Ginogenik	2x	38	12 B	18.5 B	49.43 B
	Ginogenik	4x	30	12.08 B	28 B	76.30 A
	Somatik	4x	161	15.60 A	37.42 A	85.32 A
	Tohumdan	4x	10	19 A	20.10 B	70.7 A

<sup>a</sup>Aynı harfleri almış değerler arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır (Tukey, P>0.05).

#### 4.1.2 Deney II

Deney II kapsamında gerçekleştirilen ginogenesis uyarımı uygulamalarında beş pırsa donör materyaline ait bitkilerden alınan yaklaşık 25 bin açmamış çiçek tomurcuğu BDS, MS ve B5 temelli yedi farklı uyarım ortamında kültüre alınmışlardır. Çiçek tomurcuğu kültürleri ve bunlardan elde edilen bitkiler 18 saat aydınlık/25<sup>0</sup> C ve 6 saat karanlık/17<sup>0</sup> C'ye ayarlanmış olan bir büyütme odasında tutulmuşlardır. Bu deneyde geçen yılda büyük soruna neden olan ve *in vitro* ortamda kontrolü mümkün olmayan trips hareketi nedeniyle kültüre konulan çiçek tomurcuğu sayısı yüksek tutulmuştur. Bu deneyde beş pırsa genotipinde BDS, MS ve B5 temelli uyarım ortamlarında oluşturulan kültürlerin büyük bir çoğunluğunda ginogenesis cevabı gözlenmiştir (Tablo 11). Yapılan istatistiksel değerlendirmede genotiplerin farklı uyarım ortamlarına verdikleri ginogenesis cevapları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Deney II'de elde edilen en yüksek ginogenesis cevapları Tarsus çeşidine ait çiçek tomurcuklarıyla kurulan A (% 4, 49) ve B5 (% 3,67) kültürlerinden elde edilmiştir. En yüksek ginogenesis cevapları İnegöl tomurcuklarında A ortamında (%1, 33), TK tomurcuklarında D7 ortamında (% 2,22), PR2 tomurcuklarında B5 ortamında (% 2,00) ve PR6 tomurcuklarında B5 ortamında (% 2,50) tespit edilmiştir. Deney II kapsamında tüm pırsa donör hatlarından toplam 129 ginogenik bitki elde edilmiştir. Bunlardan büyümeye devam edenlerin FCM ile ploidi seviyeleri belirlenmiştir.

**Tablo 11.** Deney II kapsamında beş pırasa genotipine ait çiçek tomurcuklarıyla oluşturulan kültürlerde elde edilen ginogenik cevaplar

Pırasa genotipi <sup>a</sup>	Ginogenesis uyartım ortamı	Ekilen tomurcuk sayısı	Ginogenik bitkicik no. (%) <sup>b</sup>	Ginogenik bitki no. (%) <sup>b</sup>	Ginogenik bitkiye dönüşüm (%)
İnegöl	A	600	8 (1,33)A	2 (0,33)A	25
	A4	750	3 (0,40)A	2 (0,27)A	66,67
	B5	801	9 (1,12)A	3 (0,38)A	33,33
	B11	750	5 (0,66)A	4 (0,53)A	80
	B12	750	5 (0,66)A	1 (0,13)A	20
	D1	720	4 (0,55)A	1 (0,14)A	25
	D7	750	4 (0,53)A	0A	0
<b>Σİnegöl</b>		<b>5121</b>	<b>38 (0,74)</b>	<b>13 (0,25)</b>	<b>34,21</b>
Tarsus	A	690	31 (4,49)A	20 (2,90)A	64,52
	A4	720	5 (0,70)A	1 (0,14)A	20
	B5	600	22 (3,67)A	17 (2,83)A	77,27
	B11	690	3 (0,44)A	0A	0
	B12	630	2 (0,32)A	0A	0
	D1	570	1 (0,18)A	1 (0,18)A	100
	D7	750	7 (0,93)A	1 (0,13)A	14,29
<b>ΣTarsus</b>		<b>4650</b>	<b>71 (1,53)</b>	<b>40 (0,86)</b>	<b>56,34</b>
TK	A	600	9 (1,50)A	6 (1,00)A	66,67
	A4	780	0A	0A	0
	B5	630	5 (0,79)A	3 (0,48)A	60
	B11	690	4 (0,58)A	3 (0,44)A	75
	B12	690	2 (0,29)A	0A	0
	D1	750	12 (1,6)A	10 (1,33)A	83,33
	D7	720	16 (2,22)A	10 (1,39)A	62,5
<b>ΣTK</b>		<b>4860</b>	<b>48 (0,99)</b>	<b>32 (0,66)</b>	<b>66,67</b>
PR2	A	120	0A	0A	0
	A4	785	0A	0A	0
	B5	300	6 (2,00)A	4 (1,33)A	66,67
	B11	1170	3 (0,26)A	3 (0,26)A	100
	B12	1080	6 (1,11)A	1 (0,370)A	16,66
	D1	90	0A	0A	0
	D7	1110	1 (0,09)A	0A	0
<b>ΣPR2</b>		<b>4655</b>	<b>16 (0,34)</b>	<b>8 (0,17)</b>	<b>50</b>
PR6	A	150	2 (1,33)A	1 (0,66)A	50
	A4	1230	17 (1,38)A	11 (0,89)A	64,71
	B5	240	5 (2,50)A	5 (2,50)A	100
	B11	1230	7 (0,57)A	5 (0,41)A	71,43
	B12	1260	6 (0,48)A	1 (0,08)A	16,67
	D1	90	0A	0A	0
	D7	1200	14 (0,16)A	13 (1,08)A	92,86
<b>ΣPR6</b>		<b>5400</b>	<b>51 (0,94)</b>	<b>36 (0,66)</b>	<b>70,59</b>
<b>Toplam</b>		<b>24686</b>	<b>224 (0,91)</b>	<b>129 (0,52)</b>	<b>57,59</b>

<sup>a</sup>İnegöl ve Tarsus hatları açık tozlanan standart çeşitlerdir. TK, PR2 ve PR6 açık tozlanan seleksiyon materyalleridir.

<sup>b</sup>Aynı harfleri almış değerler arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır (Tukey, P>0.05).



#### **4.1.2.1 Deney II'de İnegöl Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

Deney II kapsamında İnegöl çeşidine ait bitkilerden alınan tomurcuklarla gerçekleştirilen kültürlerden toplam 38 (% 0, 74) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 11). Hem BBD içeren hemde BBD içermeyen ortamlarda kültüre alınmış olan İnegöl çeşidine ait tomurcuklarda ginogenik bitkicik gelişimi gözlenmiştir. İnegöl tomurcukları ile kurulmuş olan kültürlerde % 0,40 ile 1,33 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevabı elde edilmiştir. İnegöl çeşidinden elde edilen ginogenik bitkiciklerin 13 tanesi (% 0,25) gelişmeye devam ederek büyümüşlerdir (% 34,21).

#### **4.1.2.2 Deney II'de Tarsus Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

Deney II kapsamında oluşturulan ginogenesis uyarım kültürleri arasında en yüksek ginogenesis cevabı Tarsus çeşidine ait tomurcuklardan elde edilmiştir (Tablo 11). Tarsus çeşidine ait tomurcuklarla oluşturulan kültürlerinden toplam 71 (% 1, 53) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu çeşide ait tomurcuklarla oluşturulan tüm kültürlerde ginogenesis cevabı gözlenmiştir. En yüksek cevaplar A (% 4, 49) ve B5 (% 3,67) kültürlerinden elde edilmiştir. Diğer ortamlarda % 0,18 ile % 0,93 arasında değişen ginogenesis cevapları gözlenmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 40 tanesi (% 0,86) gelişmeye devam ederek büyümüşlerdir (% 56,34).

#### **4.1.2.3 Deney II'de TK Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

TK donör materyaline ait bitkilerden alınan tomurcuklarla oluşturulan kültürlerinden toplam 48 (% 0,99) ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 11). A4 ortamı dışındaki diğer altı ortamda oluşturulan kültürlerde ginogenesis uyarımı sağlanmıştır. TK tomurcuklarında elde edilen en yüksek ginogenesis cevabı % 2,22 ile D7 ortamında gözlenmiştir. Bu genotipe ait tomurcuklar diğer ortamlarda % 0,29 ile % 1,60 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevapları göstermişlerdir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 32 tanesi (% 0, 66) gelişmeye devam ederek bitki haline dönmüşlerdir (% 66,67).

#### **4.1.2.4 Deney II'de PR2 Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

Deney II kapsamında oluşturulan ginogenesis uyarım kültürlerinde en düşük ginogenik bitkicik üretimi PR2 donörüne ait bitkilerden alınan tomurcuklarda gözlenmiştir (Tablo 11). PR2 tomurcukları ile oluşturulan kültürlerden toplam 16 (% 0,34) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. PR tomurcuklarında elde edilen en yüksek ginogenesis cevabı % 2,00 ile B5 ortamında elde edilmiştir. Üç ortamda (A, A4 ve D1) oluşturulan kültürlerde ginogenik bitkicik gelişimi

sağlanamamıştır. Diğer dört ortamda oluşturulan kültürlerde % 0,09 ile % 1,11 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevapları elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 8 tanesi (% 0,17) gelişmeye devam ederek bitki haline dönmüşlerdir (% 50).

#### **4.1.2.5 Deney II'de PR6 Genotipine Ait Tomurcuk Eksplantlarında Ginogenesis Uyarımı**

PR6 donör materyaline ait bitkilerden alınan tomurcuklarla oluşturulan kültürlerinden toplam 51 (% 0,94) ginogenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 11). D1 ortamı dışındaki diğer altı ortamda oluşturulan kültürlerde ginogenesis uyarımı sağlanmıştır. PR6 tomurcuklarında gözlenen en yüksek ginogenesis cevabı % 2,50 ile D5 ortamında elde edilmiştir. Bu genotipe ait tomurcuklar diğer ortamlarda % 0,16 ile % 1,38 arasında değişen oranlarda ginogenesis cevapları göstermişlerdir. Elde edilen PR6 kaynaklı ginogenik bitkiciklerin 36 tanesi (% 0,66) gelişmeye devam ederek bitki haline dönmüşlerdir (% 70,59).

#### **4.1.2.6 Deney II *In vitro* Kültürlerden Elde Edilen Bitkilerde FCM ile Ploidi Seviyesi Ölçümleri**

Deney II kapsamında oluşturulan ginogenesis kültürlerinden elde edilen ve FCM analizi için yeterli miktarda (~50 mg) yaprak dokusu alınabilen bitkilerde ploidi seviyeleri belirlenmiştir (Tablo 12). Beş genotipten elde edilen 87 ginogenik bitkide yapılan analizde ginogenik bitkilerin 55 tanesinin (% 63,22) somatik hücrelerinde ~30 pg/2C DNA bulunduğu ve diploid (2x) oldukları tespit edilmiştir. Yirmi altı ginogenik bitki (% 29,89) somatik hücrelerinde ~60 pg/2C DNA bulunduğu için tetraploid (4x) sınıfına konmuşlardır. PR6 materyaline ait kültürlerden elde edilen dört ginogenik bitkinin (% 4,60) hücrelerinde ~116 pg/2C DNA bulunduğu tespit edilmiş ve bu bitkiler oktoploid (8x) sınıfına konmuştur. PR2 ve PR6 donör materyallerinden elde edilen birer ginogenik bitkinin (% 2,30) dokularında benzer oranlarda diploid ve tetraploid hücreler buldukları için bunlar mixoploid (2x+4x) sınıfına yerleştirilmiştir. Uyarım ortamlarında elde edilen somatik bitkilerde yapılan FCM analizinde tamamının tetraploid oldukları tespit edilmiştir.

#### **4.1.2.7 Deney II Kapsamında Üretilen Ginogenik, Somatik ve Tohumdan Üretilmiş Bitkilerin Serada Büyütülmesi ve Karakterize Edilmesi**

Deney II kapsamında 2015 ve 2016 döneminde üretilen ginogenik bitkilerin bazıları dış ortama aklimasyonu sırasında kaybedilmiştir. En yüksek kayıplar diploid ve mikroploid ginogenik bitkilerde gözlenmiştir. Dış ortama aktarılan mixoploidlerin tümü kaybedilmiş ve 59 diploid ginogenik bitkinin sadece 19 tanesi (% 32,20) aklimasyon ve sonrasında hayatta kalabilmiştir (Tablo 13). Tetraploid ginogenik bitkiler diploidlere göre oldukça yüksek oranda (% 87,10)

aklimize olarak serada büyümeye devam etmişlerdir. Oktoploid ginogenik bitkilerin üç tanesi (% 75) hayatta kalarak büyümeye devam etmiştir. Beş pırasa donör hattını temsil eden somatik kökenli ve tohumdan üretilmiş bitkiler yalancı gövde çapı, yalancı gövde uzunluğu ve tüm bitki uzunluğu ölçümleri sırasında kontrol materyali olarak kullanılmıştır. Bu sezonda sera sıcaklığının aşırı yükselmesi pırasa materyallerinin gelişimini olumsuz olarak etkilemiştir. Özellikle tohumdan üretilen donör materyallerin büyüme ve gelişimi açısından beklenen seviyelere ulaşamamıştır. Serada büyütülen bitkiler Ağustos ayında üç morfolojik özellik açısından karşılaştırılmıştır (Tablo 13; Şekil 6).

İnegöl donör materyalinden üretilen materyallerde yapılan ölçümlerde diploid ginogenik bitkilerin karşılaştırıldıkları tetraploid bitkilere göre daha ince ve kısa yalancı gövdeye ve daha kısa bitki uzunluğuna sahip oldukları tespit edilmiştir. Tetraploid ginogenik bitkilerde ölçülen değerler somatik kökenli ve tohumdan üretilmiş bitkilerde ölçülenlerden önemli derecede farklı bulunmamıştır.

Tarsus çeşidine ait materyallerde diploid ve tetraploid ginogenik bitkilerin tohumdan üretilen bitkilere benzer yalancı gövde çapına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu gruptaki diploid bitkilerde tetraploid ginogenik ve tohumdan üretilen bitkilere göre daha kısa yalancı gövdeye uzunluğu ölçülmüştür. Ayrıca toplam bitki boyu açısından diploid ginogenik bitkiler tetraploid ginogenik bitkilerden oldukça kısa bitkiler oluşturmuşlardır.

TK donör materyallerinden üretilen bitkiler arasında yapılan değerlendirmede üç özellik açısından en bariz fark bitki boyu ölçümlerinde görülmüştür. Bu grupta diploid ginogenik bitkilerin diğer materyallere göre daha ince yalancı gövde çapı, daha kısa yalancı gövde boyu ve daha kısa bitki boyuna sahip oldukları görülmüştür.

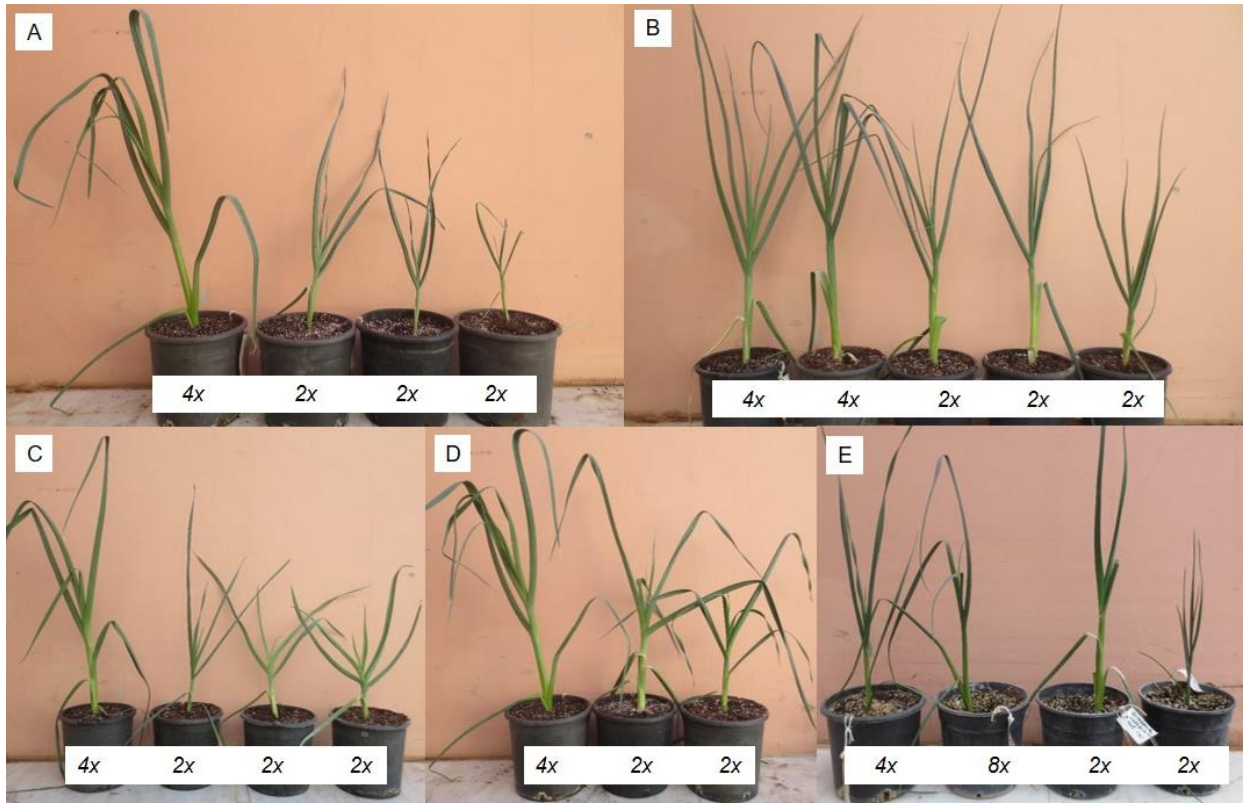
Yapılan ölçümlerde PR2 donör materyallerinden üretilen bitkiler arasındada en küçük yapıya sahip olan bitkilerin diploid ginogenik bitkiler oldukları tespit edilmiştir. PR2 materyallerinden elde edilen bitkisel ölçüm değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmamıştır.

PR6 donör materyallerinden üretilen bitkilerde diğer dört donör grubundaki materyallerde gözleendiği gibi en küçük yapıya sahip olanlar diploid ginogenik bitkilerdir. Diploid, tetraploid ve oktoploid bitkilerin birbirlerine yakın yalancı gövde kalınlığına sahip oldukları ve bunların yalancı gövde uzunluklarının somatik ve tohumdan üretilmiş bitkilere göre daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Diploid ginogenik bitkiler diğer materyallerden önemli derecede daha kısa boylu bitkiler oluşturmuşlardır.

**Tablo 12. Deney II kapsamında üretilen ginogenik bitkilerinin ploidi seviyeleri.**

Genotip	Test				
	edilen bitki	2x, no. (%)	2x+4x, no (%)	4x, no. (%)	8x, no. (%)
İnegöl	13	9 (69,23)	0	4(30,77)	0
Tarsus	27	19 (70,37)	0	8 (29,63)	0
TK	22	15 (68,18)	0	7 (31,82)	0
PR2	8	4 (50)	1 (12,5)	3 (37,5)	0
PR6	26	12 (46,15)	1 (3,85)	9 (34,62)	4 (15,39)
<b>Toplam</b>	<b>87</b>	<b>55 (63,22)</b>	<b>2 (2,30)</b>	<b>26 (29,89)</b>	<b>4 (4,60)</b>

**Şekil 6.** Deney II kapsamında beş pırasa donöründen elde edilen diploid (2x), tetraploid (4x) ve oktoploid (8x) ginogenik pırasa bitkileri



A. İnegöl donöründen elde edilen ginogenik bitkiler. B. Tarsus donöründen elde edilen ginogenik bitkiler. C. TK donöründen elde edilen ginogenik bitkiler. D. PR2 donöründen elde edilen ginogenik bitkiler. E. PR6 donöründen elde edilen ginogenik bitkiler.

**Tablo 13. Deney II kapsamında beş pırasa hattından elden ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen bitkilerin bazı morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması**

Genotip	Kaynak (ginogenik/ somatik/ tohumdan)	Ploidi Seviyesi	Bitki Sayısı	Yalancı gövde çapı (mm)	Yalancı gövde uzunluğu (cm)	Bitki uzunluğu (cm)
İnegöl	Ginogenik	2x	3	4,67 C	8,77 B	39,37 B
	Ginogenik	4x	4	13,59 AB	19 A	72,75 A
	Somatik	4x	24	16,08 A	18,88 A	72,29 A
	Tohumdan	4x	13	12,71 B	18,05 A	66,69 A
Tarsus	Ginogenik	2x	6	7,31 B	9,33 C	43 B
	Ginogenik	4x	4	12,01 B	20 A	74,25 A
	Somatik	4x	14	11,46 A	13,14 BC	64,07 A
	Tohumdan	4x	13	9,73 AB	15,92 AB	50,31 B
TK	Ginogenik	2x	3	5,98 B	7,83 C	30,20 B
	Ginogenik	4x	7	13,27 A	17,43 A	69,43 A
	Somatik	4x	23	10,14 AB	13,61 AB	59,43 A
	Tohumdan	4x	12	10,44 AB	12,42 BC	57,17 A
PR2	Ginogenik	2x	4	13,06 A	14 B	32,75 B
	Ginogenik	4x	3	16,37 A	15,5 AB	62,53 AB
	Somatik	4x	24	21,04 A	27,38 AB	77,5 A
	Tohumdan	4x	10	21,1 A	35,5 A	74,3 A
PR6	Ginogenik	2x	3	15,17 BC	13 C	34,5 C
	Ginogenik	4x	9	16,84 BC	19,22 C	76,11 B
	Ginogenik	8x	3	22,21 AB	23,57 BC	96,33 A
	Somatik	4x	4	11,38 C	41,5 AB	93 AB
	Tohumdan	4x	10	27,9 A	42,2 A	91,6 A

#### 4.1.1.5 Üretilen Ginogenik, Somatik ve Tohumdan Üretilmiş Bitkilerde Çiçeklenme ve Tohum Verimi

Deney I kapsamında büyütülen ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen bitkiler iki yıl boyunca ısıtmasız cam serada büyütülerek çiçeklenmeleri sağlanmaya çalışılmıştır. Bu süreçte önemli sayıda bitki kaybedilmiştir. *In vitro* aşamasında diploid oldukları bilinen ginogenik bitkilerin dördünün dış ortama aklimize edildikten sonra serada büyütülürken yapılan FCM analizinde spontan olarak tetraploid bitkilere dönüştüğü tespit edilmiştir. İnegöl donöründen elde edilen diploid ve tetraploid ginogenik bitkilerin tümü çiçeklenme aşamasına varamadan önce

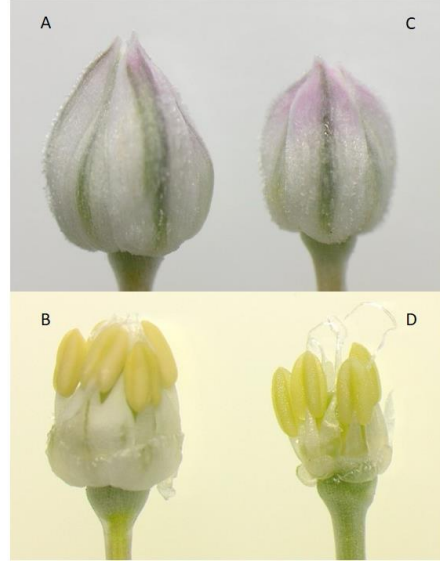
ölmüşlerdir. Tarsus donöründen üretilen sekiz diploid, dört spontan tetraploid ve sekiz tetraploid ginogenik bitki çiçeklenmişlerdir (Tablo 14). Diploid ginogenik bitkileri genelde morfolojik olarak tetraploidlere göre daha küçük yapıda büyümüşler ve daha küçük çiçek tomurcukları oluşturmuşlardır (Şekil 7 ve 8). Diploid ginogenik bitkilerde polen canlılık oranlarının yaklaşık olarak % 20 civarında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14). Çiçeklenen diploid bitkilerden beş tanesinde hiç tohum oluşmamıştır. Verimli olan üç diploid bitkiden 2, 5 ve 30 adet tohum elde edilmiştir. Tetraploid seviyede olan tüm bitkilerde yüksek polen canlılığı ve değişen sayılarda tohum verimi elde edilmiştir. Spontan olarak tetraploid seviyeye yükselen ginogenik bitkilerde ortalama 897 tohum elde edilmiştir. Tetraploid ginogenik bitkilerde ve somatik bitkilerde benzer miktarlarda (289 ve 249) tohum verimi gözlenmiştir. Tohumda üretilen yedi bitkide ortalama tohum verimi ise 690 adet olarak bulunmuştur.

**Şekil 7.** Deney I de Tarsus donöründen üretilen materyallerde çiçeklenme



A. Tarsus donörüne ait tohumdan üretilen bitkiler. B. Tarsus donöründen elde edilmiş olan somatik kökenli bitkiler. C. Diploid ginogenik bitkiler. D. Tetraploid ginogenik bitkiler.

**Şekil 8.** Tetraploid ve diploid ginogenik pırasa bitkilerine ait antesis öncesi aşamadaki çiçek tomurcukları ve anterlerin karşılaştırılması



A. Tetraploid donör pırasa bitkisine ait tam çiçek tomurcuğu. B. Tetraploid pırasa bitkisine ait çiçek tomurcuğunda anterlerinin görünümü. C. Diploid ginogenik pırasa bitkisine ait tam çiçek tomurcuğu. D. Diploid pırasa bitkisine ait çiçek tomurcuğunda anterlerinin görünümü

**Tablo 14.** Ginogenik pırasa hatlarının polen canlılık ve tohum verim değerlerinin karşılaştırılması.

Genotip	Kaynak (ginogenik/somatik/tohumdan)	Ploidi Seviyesi	Çiçeklenen bitki sayısı	Polen canlılığı (%)	Tohum verimi (adet) <sup>a</sup>
Tarsus	Ginogenik	2x	8	~20	5 AB
	Ginogenik	Spontan 4x	4	~80	897 A
	Ginogenik	4x	8	~80	289 AB
	Somatik	4x	36	~80	249 AB
	Tohumdan	4x	7	~80	690 A

<sup>a</sup>Aynı harfleri almış değerler arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır (Tukey,  $P>0.05$ ).

## 5.TARTIŞMA

Pırasa ıslahında başarıyla uygulanabilmesi için haplodizasyon yönteminin gametik hücrelerden çok sayıda sağlıklı bitki üretmeye olanak sağlaması gerekmektedir. Pırasada haploidizasyon ile ilgili ilk çalışmalar yaklaşık 25 yıl önce yayınlanmıştır. Pırasada haploidizasyon ile ilgili ilk çalışmalar yaklaşık 25 yıl önce yayınlanmıştır. Keller ve Korzun (1996) yaptıkları detaylı çalışmalar sonunda pırasada anter kültürlerinin (androgenesis) başarılı sonuçlar vermediğini belirtmişlerdir. Smith vd. (1991) ve Schum vd. (1993) tetraploid

( $2n = 4x = 32$ ) olan bu türde ginogenesis yöntemi ile gametik kromozom sayılarına sahip ( $n = 2x = 16$ ) bitkilerin üretilebileceğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar Batı Avrupa kökenli pırasa donör materyallerinden hazırlanan tozlanmamış ovül (yumurta), ovarı (yumurtalık) ve tüm çiçek tomurcuğu eksplantlarını değişik miktarlarda BBD ve karbon kaynağı içeren katılaştırılmış BDS, MMS (modifiye MS) ve B5 ortamlarında kültüre almışlardır. Üretilen ginogenik bitkilerin sadece küçük bir kısmının diploid ve yeşil olduğu bildirilmiş ama üretilen diploid bitkilerin özellikleri ilgili herhangi bir bilgi verilmemiştir. Bu çalışmaların yayınlanmasından sonra geçen süreçte bu alanda herhangi bir ilerleme kaydedilmemiştir.

Türk pırasa genotiplerinden ginogenik bitki üretilmesi için TÜBİTAK-TOVAG 113O232 numaralı proje kapsamında detaylı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında ülkemizde yaygın olarak üretimi yapılan iki OP standart çeşit (İnegöl ve Tarsus) ve üç seleksiyon materyalinde ginogenesis uyarımı deneyleri (deney I ve II) yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneylerde ginogenesis uyarımının sağlanmasında önemli olan etmenler tespit edilmeye çalışılmış, elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin hızlı ve güvenilir olarak tespiti gerçekleştirilmiş, ginogenik bitkilerin dış ortama aklimize edilerek morfolojik özellikleri gözlemiş ve çiçeklenmeleri sağlanarak tohum verimlilikleri test edilmiştir.

Projenin ilk aşamasında (deney I) İnegöl ve Tarsus donör materyallerine ait bitkilerden alınan 80 binden fazla tam çiçek tomurcuğu kullanılarak BDS, MS, MMS ve B5 temelli 44 uyarım ortamında soğuk önyuğulamalı ve önyuğulamasız uyarım kültürleri oluşturulmuştur. Bu iki OP standart çeşitlerden farklı uyarım ortamlarında elde edilen ginogenik bitkilerde üretim oranları cevap yok (% 0) ile yüksek cevap (% >2,00) arasında bulunmuştur. Deney I kapsamında oluşturulan ginogenesis kültürlerinin 40 tanesinde ginogenesis uyarımı sağlanmıştır. Ginogenesis cevabı alınamayan dört (B, B1, B4 ve C2) ortamdaki üç tanesi 30 g/l ve daha az sukroz içermektedir. Tarsus donör materyallerine ait tomurcuklardan elde edilen ginogenesis cevabının (% 0,71) İnegöl donör materyallerinden alınan tomurcuklardan elde edilenden cevaptan (% 0,10) daha yüksek olduğu görülmüştür. İnegöl çeşidinde elde edilen en yüksek cevap (% 3,33) A4 ortamında kültüre alınan tomurcuklarda görülmüştür. Tarsus çeşidinde ise en yüksek cevap (% 6,67) B11 ortamında kültüre alınmış olan tomurcuklarda elde edilmiştir. A4 BDS temelli ve B11 MS temelli ortamlardır. Bu ortamların ortak özellikleri içeriklerinde BBD bulundurmayıp 100 g/l sukroz ile hazırlanmış olmalarıdır. İki pırasa OP donör materyallerinin tomurcuk kültürlerine iki haftalık soğuk (15°C) önyuğulaması yapılmasına verdikleri cevaplar arasında önemli sayılabilecek farklar görülmüştür. Genelde İnegöl donör materyallerine ait tomurcuklarla oluşturulan kültürlerde soğuk önyuğulaması yapılması (% 0,31) önyuğulama yapılmayanlara (% 0,06) göre daha yüksek ginogenesis cevabı elde edilmesini sağlamıştır. Tarsus donör materyallerinden alınan tomurcuklarla oluşturulan kültürlerde ise önyuğulama yapılması bir avantaj sağlamamıştır. Bu genotipte önyuğulamalı kültürlerde (% 0,52)



önuygulamasız kùltürlere (% 0,83) göre daha düşük ginogenesis cevabı elde edilmiştir. Deney I'de her iki pırasa donör materyallerinden toplam 377 ginogenik bitkicik üretilmiş, bunların 227 (% ~0,28) yeşil ginogenik bitkiler olarak büyümüşür (% 60) büyümeye devam ederek. Deney I'den elde sonuçlar pırasa tomurcuklarında ginogenesis uyartımının BDS, MS, MMS ve B5 temelli kùltürlerin tümünde gerçekleşebileceğini, ginogenesis başarısında ortamın sukroz içeriğinin önemli olduğunu, içeriğinde BBD bulunmayan uyartım ortamlarında da ginogenik gelişimin başarıyla gerçekleşebileceğini ve donör bitkilerin genetik kökeninin uyartım kùltürlerinde elde edilen ginogenesis başarısını etkilediğini görülmüşür.

Projenin ikinci aşamasında beş pırasa donör materyallerine (İnegöl, Tarsus, TK, PR2 ve PR6) ait bitkilerden alınan 25 bin kadar tomurcukla önuygulamasız olarak oluşturulan ve 100 g/l sukroz içeren BDS, MS ve B5 temelli kùltürlerde uyartım ortamında BBD bulunup bulunmamasının genotiplerin gösterecekleri ginogenesis cevabını nasıl etkilediği tespit edilmeye çalışılmıştır. Beş donör pırasa materyaline ait bitkilerden alınan tomurcuklar BDS, MS ve B5 temel ortamlarının tümünde ginogenesis cevabı vermişlerdir. Elde edilen veriler pırasa tomurcuklarının BBD içermeyen ortamlarda oluşturulan kùltürlerde de ginogenik bitkicik üretebildiklerini ve bu ortamlarda elde edilen ginogenik bitkicik oranlarının BBD içeren ortamlarda elde edilenlerde önemli oranda farklılık olmadığını göstermiştir. Bu bulgu pırasada ginogenesis uyartımı için BBD kullanımının elzem olmadığını göstermektedir. Genotiplerin gösterdikleri ginogenesis cevapları ve bunlardan elde edilen ginogenik bitkilerin oranları arasında dikkate değer farklar görülmüşür. En yüksek ginogenik bitkicik üretim oranı (% 1,53) Tarsus donör bitkilerinde gözlenmiştir. Bunu yaklaşık % 1 ginogenik bitkicik üretimine sahip iki seleksiyon hattı (TK ve PR6) izlemiştir. İnegöl (% 0,74) ve PR2 (% 0,34) ise düşük ginogenik bitki üretim performansına sahip olmuşlardır. Deney II' de beş donör materyalinden toplam 224 (% 0,91) ginogenik bitkicik üretilmiş ve bunların 129 (% 0,52) tanesi gelişmeye devam ederek bitkiye dönüşmüşür (% 58). Bu projede yüksek oranda ginogenesis cevabı uyartımı sağlayan ortamlar diğer pırasa genotiplerinde de ginogenik bitki üretimi amacıyla kullanılabilir.

İnegöl ve Tarsus genotiplerinde deney I'de elde edilen ginogenik bitkicik ve ginogenik bitki üretimi oran olarak deney II'de en az iki kat yükselmiştir. Bununla beraber ginogenik bitkiciklerin bitkiye dönüşüm oranlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Ginogenik bitkiciklerin yaklaşık % 60 kadarı gelişmeye devam ederken % 40 oranında bitkicik kayda değer gelişme göstermeyerek kaybedilmilerdir. Ginogenik pırasa bitkiciklerinde bitkiye dönüşüm konusunda gözlenen sorunlarla soğan ginogenesis çalışmalarında da karşılaşılmıştır (Alan vd., 2004). Ginogenik bitkiciklerin gelişmelerine devam etmeyerek bitki boyutuna dönüşmemelerinde genetik faktörler etkili olabilir. Yüksek derecede heterozigotluk özelliği gösteren tetraploid bir bitki olan pırasa hücrelerinde letal sonuçları olabilecek gen mutasyonlarıyla ortaya çıkan resesif alleller aynı genlerin yabani tip dominant allelleriyle maskelenirler. Haploidizasyon

uygulamasıyla elde edilen diploid bitkilerde letaliteye neden olan resesif allellerin homozigotlaşması ile bu allellerin bitki gelişimine olumsuz etkileri ortaya çıkabilir. Ginogenik bitkilerin gelişimlerinde görülen sorunun diğer bir nedeninde ginogenesis uyartımı uygulamasında üretilen embriyoların gelişmeye devam ederek bitkiye dönüşümleri için gereken bazı faktörlerin kültür ortamında bulunmaması olabilir. Ginogenik embriyolar döllenme sonucu oluşmadıkları için normal zigotik embriyolardaki gibi endosperm dokusuna sahip değildirler. Bu nedenle ginogenesis uyartımı ortamının bu dezavantajı dengeleyecek şekilde hazırlanmış olmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu alanda detaylı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Genel olarak Türk pırasa genotipleri Smith vd. (1991) ve Schum vd. (1993) tarafından Batı Avrupa genotiplerinde tespit edilen oranlara benzer ginogenesis cevapları göstermişlerdir. Pırasada bazı genotiplerin ginogenesis verdikleri cevaplar çok düşük seviyelerde olabileceği gibi yüksek oranlarda ginogenik üretim cevabı verebilen genotiplerde mevcuttur. Soğan ginogenesis uyartımı çalışmalarında elde edilen veriler ginogenesis uyartımına verilen cevabın çok sayıda resesif genle kontrol edildiğini işaret etmektedir (Alan vd., 2003; Jakse vd., 2010). Pırasada da ginogenesis uyartımına gösterilen cevabın soğandakine benzer şekilde kompleks genetik temellere sahip olduğu düşünülebilir. Ginogenesis tekniğinin ıslah programlarına entegre edilmesi durumunda ıslah materyallerinin ginogenesis cevap verenler arasından seçilmesi bu tekniğin ıslah programlarında kullanım etkinliğini arttıracaktır.

Daha önce yayınlanmış pırasa ginogenesis çalışmalarında elde edilen diploid bitkilerin sayısının oldukça azdır. Smith vd. (1991) tarafından üretilen 23 ginogenik pırasa bitkisi arasında sadece bir bitkinin (% 4,35) diploid olduğu tespit edilmiştir. Schum vd. (1993) bir donör pırasa materyalinden üç tanesi albino olan toplam sekiz diploid ginogenik bitki elde etmiştir. Albinizm bitkinin etkin olarak fotosentez yapmasına engel teşkil eden bir durum olduğu için istenmeyen bir durumdur. Projede gerçekleştirilen deneylerde beş pırasa genotipinden üretilip FCM analizi yapılan 228 ginogenik bitkiden 150 tanesinin (% 65,79) diploid olduğu tespit edilmiştir. FCM analizine göre üç bitkininde (% 1,32) diploid ve tetraploid hücrelerden oluşan miksploidler olduğu bulunmuştur. Ginogenik pırasa bitkileri arasında  $2x+4x$  miksploidlerin olması diploid gametik embriyoların gelişimi sırasında kendiliğinden gelişen spontan kromozom katlaması olaylarının olabileceğini işaret etmektedir. Bu bulgu ginogenik bitkiler arasında tetraploid ve oktaploid bitkiler bulunmasında açıklayabilir. Eğer tetraploid bitkiler diploid embriyolarda spontan kromozom katlamasıyla ortaya çıkıyorlarsa bu tip bitkilerin elde edilmesi uyartım yolu ile kromozom katlaması yapılmasına gerek kalmayacağı için avantajlı olabilir. Diğer yandan Tetraploid ve oktaploid bitkiler somatik hücrelerdende kaynaklanmış olabilecekleri için kökenlerinin güvenilir moleküler analizlerle tespit edilmesi zorunludur.

Yeni üretilmiş ginogenik pırasa bitkiciklerinin ploidi seviyelerinin belirlenmesi işleminde kullanılabilecek güvenilir bir morfolojik değerlendirme metodu mevcut değildir. Ginogenik bitkilerde ploidi tespiti yapmak için kullanılabilecek en güvenilir metod kök uçlarındaki hücrelerde metafaz aşamasındaki kromozomların sayılmasıdır (Schum vd., 1993). Farklılaşmış dokularda kromozom sayımı yapmak mümkün olmadığı için kullanımı konusunda sınırları vardır (Keller ve Korzun, 1996). FCM analizi çekirdek DNA miktarlar değerlerine göre ginogenik bitkilerin ploidi sınıflarına ayrılmasına olanak sağlar (Alan vd., 2003). Bu analiz tekniği çekirdek DNA izolasyonu mümkün olan bütün bitki dokularında ploidi seviyesi belirleme imkanı verir ve bitkilerin farklı gelişim dönemlerinden yeniden analiz edilebilmesine olanak sağlar.

Pırasada daha önce yayınlanmış olan ginogenesis çalışmalarında elde edilen bitkilerin sadece *in vitro* kültürlerinde gözlemlenen özellikleri rapor edilmiştir. Bu proje kapsamında elde edilen ginogenik bitkiler dış ortama aklimize edilerek serada büyütülmüşlerdir. Ginogenik bitkiler donör materyallerden üretilen somatik ve tohumdan üretilmiş bitkilerle karşılaştırılmıştır. Aklimasyon sırasında ve sonrasında diploid ginogenik bitkilerde ise önemli kayıplar görülmüş ve bitkilerin yaklaşık yarısı kaybedilmiştir. Ortaya çıkan kayıplar çoğunlukla serada aşırı yüksek sıcaklıklar ve soğan sineği zararı gibi kontrolü zor çevresel koşullar nedeniyle ortaya çıkmıştır. Diploid ginogenik bitkiler kaynaklandıkları donör materyallere göre genelde daha küçük yapıda oldukları için bakım işlemleri sırasında özene ihtiyaç duymaktadırlar. Tetraploid ginogenik bitkiler aklimasyon ve serada daha az kayıp vermiş ve çoğunlukla kaynaklandıkları donör materyallere yakın boyutlarda bitkiler oluşturmuşlardır. Serada büyütülen ginogenik bitkilerde gerçekleştirilen ikinci FCM analizinde deney I kapsamında Tarsus donör genotipinden elde edilen dört diploid bitkinin spontan olarak tetraploid seviyeye çıktığı tespit edilmiştir. Deney I kapsamında Tarsus donör genotipinden elde edilmiş olan 20 ginogenik (sekiz diploid, dört spontan tetraploid ve sekiz tetraploid) bitki 2016 yaz döneminde çiçeklenmiştir. Diploid bitkilerin umbellerinde bulunan çiçek tomurcuklarının tetraploid olanlara göre önemli oranda küçük kaldığı, anterlerinin daha küçük olduğu ve az sayıda canlı polen içerdiği gözlenmiştir. Çiçeklenen diploid ginogenik pırasa bitkilerinin hiç ya da çok az sayıda (ortalama 5 adet) tohum verime sahip olduğu belirlenmiştir. Spontan tetraploid ginogenik bitkilerde çiçek tomurcukları ve anterler diğer tetraploid (ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen) bitkilerdeki gibi normal boyutlara sahip olarak gelişmişlerdir. Bu ginogenik bitki gurubundaki bitkilerin anterlerinde yüksek oranda canlı polen üretimi gözlenmiştir. Karşılaştırılan materyaller arasında en yüksek tohum verimi ortalaması 897 adet ile spontan tetraploid ginogenik bitkilerden elde edilmiştir. Bu veriler ginogenesis uygulamasıyla diploid seviyeye indirilmiş olan pırasa bitkilerinde kromozom katlaması uygulamasıyla güçlü ve yüksek tohum verimine sahip hatların geliştirilebileceğini işaret etmektedir. Bu hatların hibrit pırasa çeşitleri üretilmesinde

polen donörü olarak kullanılma potansiyeli çok yüksektir. Hyde vd. (2012) tarafından yayınlanan çalışmada ginogenesis tekniğiyle elde edilen edilen DH soğan hatlarının hibrit çeşitlerin üretiminde ebeveyn olarak kullanılmasının hibrit çeşitlerde verim ve uniformiteyi arttırdığı gösterilmiştir.

## 6. SONUÇ

Gerçekleştirilen 113O232 no.lu projede Türk pırasa genotiplerinde ginogenesis tekniği uygulanarak gametik kromozom sayısına sahip çok sayıda bitkinin üretilbileceği gösterilmiştir. Türk pırasa materyallerinde uygulanabilecek ginogenik bitki üretimi ve güvenilir ve hızlı ploidi seviyesi belirleme yöntemleri geliştirilmiştir. Proje sonuçları pırasada ginogenesis uygulamasında elde edilen diploid bitkilerin dikkatle gözlemlenmesi gerektiğini ve normal bitkisel gelişim ve tohum verimi için ginogenik bitkilerin tetraploid seviyesine getirilmesi gerektiğini göstermektedir. Diploid pırasa bitkilerinin yeniden tetraploid seviyeye dönüştürülebilmesi için Alan vd. (2007b) tarafından soğan için geliştirilmiş olan uyartılmış veya spontan kromozom katlaması stratejileri uygulanabilir. Birçok bitki türünde başarı ile uygulanabilen haploidizasyon yönteminin pırasa türündede uygulanabilmesi durumunda yeni pırasa hatlarının geliştirilmesinin daha kısa sürede gerçekleştirilmesi mümkün hale getirilebilir. Bu projeye pırasa türü için geliştirilen ginogenesis uyartım tekniğinin tüm dünyada pırasa ıslahı çalışmalarında kullanılması fırsatı ortaya çıkarılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

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

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

Alan, A. R., Zeng, H., Assani, A., Shi, W. I., McRae, H. E., Murch, S. J., Saxena, P. K. 2007a. "Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term, *in vitro* maintained cultures", Plant Cell Reports 26,1345–1355

- Alan, A. R., Lim, W., Mutschler, M. A., Earle, E. D. 2007b. "Complementary strategies for ploid manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.)", *Plant Science* 173, 25–31
- Arumuganathan, K., Earle, E. D. 1991. "Nuclear DNA content of some important plant species", *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 208-218.
- Bhat, J. G., Murthy, H.N. 2007. "Factors affecting in vitro gynogenic haploid production in Niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.)", *Plant Growth Regul* 52, 241–248.
- Bhojwani, S. S., Thomas, T. D. 2001. "*In vitro gynogenesis*. Current Trends in the Embryology of Angiosperms". Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 489–507.
- Buiteveld, J., Fransz, P. F., Creemers-Molenaar, J. 1994. "Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.)", *Plant Sci.* 100, 195–202.
- Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A., Javornik, B. 1995. "Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants", *Plant Sci.* 104, 215–224.
- Bohanec, B., Jakse M. 1999. "Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions", *Plant Cell Reports*, 18, 737-742.
- Campion, B., Alloni C. 1990. "Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 20, 1-6.
- Cohat, J. 1994. "Obtention chez l'échalote (*Allium cepa* L. var *aggregatum*) de plantes haploïdes gynogénétiques par culture *in vitro* de boutons floraux", *Agronomie*, 14, 299–304.
- Dolezel, J., Bartos, J. 2005. "Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size", *Annals of Botany*, 95(1),99-110.
- Dunstan, D. I., Short, K.C. 1977. "Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa*", *Physiologia Plantarum*, 41, 70-72.
- Gamborg, O. L., Miller R. A., Rancillac M. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells", *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristo'f, Z. 2002. "Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Plant Cell Rep* 21,105–111.

- Geoffriau, E., Kahane, R., Rancillac, M. 1997. "Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.), Euphytica, 94, 37-44.
- Guha, S., Maheswari, S. C. 1964. "In vitro production of embryos from anthers of *Datura*", Nature 204,497
- Gurel, S., Gurel, E., Kaya, Z. 2000. "Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)". Plant Cell Rep 19,1155–1159.
- Hermesen, J. G. Th., Ramana, M. A. 1981. "Philosophical transactions of the royal society" London B 292,499–507.
- Hyde, P. T., Earle, E. D., Mutschler, M. A. 2012 "Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) Lines and their impact on hybrid performance", HortScience 47,1690–1695.
- Jain, S., Mohan, S. K., Sopory, Veilleux, R. E. 1996. *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic, Dordrecht, p 317.
- Jakse, M., Hirschegger, P., Bohanec, B., Havey, M. J. 2010. "Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration", Journal of the American Society for Horticultural Science, 135,67-73.
- Jones, H. and L. Mann. 1963. Onions and their allies. New York: Interscience Publishers.
- Juokevieiene, D., Stanys, V., Bobinas, E. 2005. "Gynogenesis peculiarities of *Allium* L. vegetables grown in Lithuania", Biologija, 3,6–9.
- Kantartzik, Roupakias, G. 2009. "In vitro gynogenesis in cotton (*Gossypium* sp.)", Plant Tissue Cult 96, 53–57.
- Kaska, A., Celebi-Toprak, F., and Alan, A. R. 2012. "Gynogenesis Induction in Edible *Alliums*". Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium April 12-14 2012 Kayseri, Turkey Journal of Biotechnology Volume 161 pp. 18
- Keller, J. 1990. "Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)", Euphytica, 47, 241–247.
- Keller, E. R. J., Korzun, L. 1996. Sayfa 51-75. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species, In vitro Haploid Production in Higher Plants, Editörler: Jain, S. M., Sopory, S. K. and Veilleux, R. E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Labani, R. M., Elkington, T. T. 1987. "Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (Liliaceae)" *Hereditas* 59, 119-128.
- Levan, A. 1940. "Note on the somatic chromosomes of some *Colchicum* species", *Hereditas*, 26, 317-320.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. 2003. "Doubled haploid production in crop plants: a manual". Kluwer Academic, London
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cell culture", *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Muren, P. 1989. "Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion", *Hortscience*, 24, 833-834.
- Musial, K., Bohanec, B., Przywara, L. 2001. "Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)", *Sexual Plant Reproduction*, 13, 335-341.
- Peterka, H., Budahn, H., Schrader, O. 1997. "Interspecific hybrids between onion (*Allium cepa* L.) with S-cytoplasm and leek (*Allium ampeloprasum* L.)", *Theo. Appl. Genet.* 94,383-389.
- Pink, D.A.C. and Innes, N.L. 1984. "Recent trends in the breeding of minor field vegetables crops for the UK", *Plant Breed Abstr.* 54, 197.
- Ruth, S. K., Stephen, L. S., John, C.B. 1993. "Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species". *Plant Cell Tiss Organ Cult* 32,77-82.
- San Noeum, L. H. 1976. Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fécondes". *Ann Amelior Plant*, 26, 751-754.
- Sestili, S., Ficcadenti, N. 1996. Syf 263-247. *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants. 3rd Ed. Irradiated pollen for haploid production. Editörler: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE, Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
- Schum, A., Mattiesch, I., Timmann, E., Hofmann, M. 1993 "Regeneration of diploids via gynogenesis in *Allium porrum* L.", *Gartenbauwissenschaft.* 58,227-232.
- Schum, A., Junge H., Mattiesch, L. 1994. "Plant regeneration from protoplasts of *Allium porrum* L. *Gartenbauwissenschaft* 59, 26-30.
- Shalaby, T. A. 2007. "Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.)", *Sci Hortic*, 115,1-6.

Sibi, M. L., Kobbaissi, A., Shekafandeh, A. 2001. "Green haploid plants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs.)". Euphytica, 122,351–359.

Smith, B., Godwin, R. M., Harvey, E., Werner, C. P. 1991. "Gynogenesis from whole flower buds in bulb onion (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.)", J Genet Breed 45,353-358.

Smith, B. M., Crowther, T. C. 1995. "Inbreeding depression and single cross hybrids in leek (*Allium ampeloprasum* ssp. Porrum)", Euphytica 86, 87-94.

Sulistyaningsih, E., Yamashita, K., Tashiro, Y. 2002. "Haploid induction from F1 hybrids between CMS shallot with *Allium galanthum* cytoplasm and common onion by unpollinated flower culture", Euphytica, 125, 139–144.

Tang, F., Tao, Y., Zhao, T., Wang, G. 2006. "In vitro production of haploid and double haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*)", Plant Cell Tissue Organ Cult, 84,233–237.

Thomas, Dennis, T., Bhatnagar, A. K., Razdan, M. K., Bhojwani, S. S. 1999. "A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba* L." Euphytica, 110, 169–173.

Thomas., W. T. B., Newton, A. C., Wilson, A., Booth, A., Macaulay, M., Keith, R. 2000. "Development of recombinant chromosome substitution lines: a barley resource", SCRI annual report 1999/2000, pp 99–100.

Van-Creij, M. G. M., Kerckhoffs, D. M. F. J., De Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Van Tuyl, J. M. 2000. "The effect of medium composition on ovary-slice culture and ovule culture in interspecific *Tulipa gesneriana* crosses", Plant Cell Tiss Organ Cult, 60,61–67.

Van der Meer, Q. P., Hanelt, P. 1990 Syf 179-196. Leek *Allium ampeloprosome* L. Onion and Alhed Crops. Editörler: Brewster, J. L., Rabinowitch, II.D., Biochemistry, Food Science, and Minor Crops. CRC Pres, Boca Raton, Florida.

Vavilov, N. I. 1926. "Studies on the origins of cultivated plants", Bull. Appl Bot and Plant Breed 16,1-245.

Wang, H. 1996. "Genetic engineering. Male sterility in leek (*Allium porum* L.) Ph.D thesis, Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen, Belgium.

<http://faostat.fao.org>



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ALİ RAMAZAN ALAN
Proje No:	113O232
Proje Başlığı:	Türk Pırasa ( <i>Allium ampeloprasum</i> L.) Islah Programlarında Kullanılmak Amacıyla Ginogenik Bitki Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. BİTKİ GENETİĞİ VE TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/10/2013 - 15/10/2016
Onaylanan Bütçe:	404000.0
Harcanan Bütçe:	371701.37
Öz:	<p>Projede yerli pırasa materyallerinde ginogenesis uyartımı ile ginogenik bitki üretimi ile ilgili detaylı deneyler gerçekleştirilmiştir. Ginogenik bitkiler dişi gametin erkek gamet katkısı olmadan doku kültürü ortamında gelişerek embriyo ve bitkiye dönüşümü ile elde edilirler. Tetraploid olan pırasada ginogenesis tekniğiyle elde edilen bitkiler dişi gamet hücresinin sahip olduğu diploid seviyede kromozom sahiptirler. Projede tam çiçek tomurcuğu eksplantlarının Dunstan ve Short, Murashige ve Skoog, modifiye edilmiş MS ve Gambrog B5 temelli ortamların hepsinde ginogenesis uyartımına cevap verdikleri bulunmuştur. Kültür ortamlarında yüksek miktarda sukroz bulunması ginogenesis uyartımı için gerekli iken bitki büyüme düzenleyicilerinin uyartım için gerekli olmadığı tespit edilmiştir. Proje kapsamında yer alan tüm pırasa genotiplerinde (İnegöl, Tarsus ve üç seleksiyon materyali) ginogenesis cevabı (ginogenik bitkicik verimi) elde edilmiştir. Beş Türk pırasa genotipiyle yapılan deneyde genotiplerden elde edilen ortalama ginogenesis cevabı % 0.91 olarak gerçekleşmiştir. Ginogenik bitkiciklerin yarısından fazlası gelişmeye devam ederek sağlıklı yeşil bitkiler oluşturmuşlardır. En yüksek ginogenesis cevabı (% 1,53) ve ginogenik bitki (% 0,86) Tarsus genotipine ait çiçek tomurcuklarından elde edilmiştir. Gerçekleştirilen uyartım deneylerinde toplam 356 yeşil ginogenik bitki üretilmiştir. Pırasada çekirdek DNA miktarı ölçümü için geliştirilen flow sitometri (FCM) analizi sayesinde ginogenik pırasa bitkilerinin yaklaşık üçte ikisinin diploid seviyede olduğu bulunmuştur. Serada büyütülen ginogenik bitkilerde yapılan FCM analizi ile dört diploid bitkinin spontan kromozom katlaması nedeniyle tetraploide dönüştüğü tespit edilmiştir. Genelde diploid bitkiler tetraploid materyallere göre daha küçük ince ve kısa bitkiler oluşturmuşlardır. Çiçeklenen diploid bitkiler hiç yada çok az tohum üretmişlerdir. Spontan olarak tetraploid hale gelen dört ginogenik pırasa bitkisine ait umbellerde ise yüksek miktarda kendilenmiş tohum verimi (900) gözlenmiştir. Projede elde edilen bulgular pırasa ginogenesis uygulamalarında normal bitkisel gelişim ve tohum verimi için ginogenik bitkilerin tetraploid seviyesine getirilmesi gerektiğini göstermektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	<i>Allium ampeloprasum</i> L., Ginogenesis, Flow sitometri, Islah, Poliploidi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<ol style="list-style-type: none"><li>1- Ploidy manipulation strategies for economically important <i>Allium</i> crops (Makale - İndekli Makale),</li><li>2- Production and evaluation of gynogenetic leek (<i>Allium ampeloprasum</i> L.) plants (Makale - İndekli Makale),</li><li>3- Optimization of gynogenesis induction in leek (<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>) (Makale - İndekli Makale),</li><li>4- Optimization of gynogenesis induction in leek (<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>Porrum</i>) (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</li><li>5- Ploidy Reduction Techniques for Tetraploid <i>Alliums</i> (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</li></ol>