

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

**TÜRK PIRASA (*Allium ampeloprasum* L.) GENOTİPLERİNDEN  
ÜRETİLEN GİNOGENİK BİTKİLERİN KARAKTERİZASYONU  
VE BİYOİNFORMATİK AÇIDAN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TUĞÇE ZEHRA MENDANOĞLU**

**DENİZLİ, OCAK - 2025**

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



TÜRK PIRASA (*Allium ampeloprasum* L.) GENOTİPLERİNDEN  
ÜRETİLEN GİNOGENİK BİTKİLERİN KARAKTERİZASYONU  
VE BİYOİNFORMATİK AÇIDAN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE ZEHRA MENDANOĞLU

DENİZLİ, OCAK - 2025

**Bu tez alışması PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL  
ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ (PAUBAP)  
tarafından 2016FEBE030 nolu proje ile desteklenmiştir.**

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

TUĞÇE ZEHRA MENDANOĞLU

## ÖZET

**TÜRK PIRASA (*Allium ampeloprasum* L.) GENOTİPLERİNDEN ÜRETİLEN  
GINOGENİK BİTKİLERİN KARAKTERİZASYONU VE  
BİYOİNFORMATİK AÇIDAN İNCELENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TUĞÇE ZEHRA MENDANOĞLU  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜY. ABDULLAH MELEKOĞLU)**

**DENİZLİ, OCAK - 2025**

*Allium ampeloprasum* ile genotipten ginogenik bitki üretilmiş ve bunlara hangi şartların etkilediği belirlenmiştir. Bu türde ginogenesis uyartımına en uygun medyaların %0,22 ginogenik bitkicik üretilen BDSD (2,4-D ve 100 g/l sukroz) ve %0,21 ginogenik bitkicik üretilen BDSA, somatik sürgün uyartımı için en uygun meydanında %5,50 somatik sürgün üretilen BDSC olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar *A. ampeloprasum* türünde de ginogenesis uyartımı ve somatik sürgün uyartımında medyanın ve genotipin güçlü etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerin ginogenik açıdan incelenmesi sonucunda *A. ampeloprasum* bitkilerin çoğunlukla diploid bir kısmının da tetraploid olduğu göstermiş ve bu genetik özelliğin araştırılması için yöntemler tartışılmıştır. Bu tez çalışmasında yer alan materyallerinin hepsi ginogenesis ve somatik sürgün uyartımına cevap vermişlerdir. Elde edilen veriler yenilebilir *Allium* türlerinde yapılmak istenen ıslah ve klonal çoğaltım uygulamalarının *in vitro* düzeyde gerçekleştirilebilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışması bu yönüyle ülkemizde yenilebilir *Allium* biyoteknolojisi ile ilgili ginogenik olarak bitkiler üretilmesi gösterilmiş ve bunların genetik açısından incelenmesi ve ilgili yöntemler ileriye yönelik çalışmaların planlanması açısından tartışılmıştır. Ülkemiz bitki türlerin ekonomik açısından öneme sahip türler benzer yöntemlerle üretilmesi, bunların genetik ve biyoinformatik açıdan incelenmesinin önemi vurgulanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Allium ampeloprasum*, biyoinformatik, dihaploid (DH) ginogenesis, ıslah, klonal çoğaltım, kromozom katlaması.

## ABSTRACT

### CHARACTERISATION STUDY AND BIOINFORMATICS PERSPECTIVE OF GINOGENIC PLANTS PRODUCED FROM TURKISH LEEK (*Allium ampeloprasum* L.) GENOTYPES

MSC THESIS

TUĞÇE ZEHRA MENDANOĞLU

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR:DR. ABDULLAH MELEKOĞLU)

DENİZLİ, JANUARY 2025

Gynogenic plants were produced from *Allium ampeloprasum* genotypes and the conditions affecting them were determined. It was found that the most suitable media for ginogenesis stimulation in this species were BDSD (2,4-D and 100 g/l sucrose), which produced 0.22% ginogenic plants, and BDSA, which produced 0.21% ginogenic plants, while the most suitable media for somatic shoot stimulation was BDSC, which produced 5.50% somatic shoots. These results indicate that media and genotype have strong effects on ginogenesis induction and somatic shoot induction in *A. ampeloprasum* species. As a result of the ginogenic analyses of these plants, it was shown that *A. ampeloprasum* plants are mostly diploid and some of them are tetraploid and methods to investigate this genetic feature are discussed. All materials in this thesis responded to ginogenesis and somatic shoot stimulation. The data obtained show that it is possible to realise the desired breeding and clonal propagation applications in edible *Allium* species at the *in vitro* level. In this aspect of this thesis study, the ginogenic production of plants related to edible *Allium* biotechnology in our country has been demonstrated and their genetic study and related methods have been discussed in terms of planning future studies. The importance of producing economically important plant species in our country with similar methods and their genetic and bioinformatic analysis was emphasised.

**KEYWORDS:** *Allium ampeloprasum*, bioinformatics, dihaploid (DH) ginogenesis, reclamation, clonal propagation, chromosome doubling.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>5</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>6</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>7</b>
1.1. <i>Allium ampeloprasum</i> Genel Özellikleri .....	8
1.1.1. <i>Allium ampeloprasum</i> Morfolojik Özellikleri .....	8
1.1.2. <i>Allium ampeloprasum</i> 'un Genetik Özelliklerine Biyoinformatik Yaklaşımlar.....	9
1.1.3. <i>Allium ampeloprasum</i> ile Yapılan Çalışmalar .....	10
1.2. Ginogenesis .....	12
1.3. Poliploidi .....	13
1.4. Kromozom Katlama Çalışmaları.....	15
1.4.1. Poliploidinin Avantajları.....	18
1.4.2. Ploidinin Belirlenmesi .....	19
<b>2. YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
2.1. Bitki Materyali .....	21
2.2. Bitkisel Materyallerde Çekirdek DNA Miktarı Analizi ve Ploidi Tespiti.....	22
2.3. Kromozom Katlama Uygulaması .....	24
2.4. Kontaminasyonda Timentin İşlemi .....	29
2.5. Bitkilerin Dış Koşullara Aktarılması.....	30
2.5.1. Viollere Transfer Etme .....	30
2.5.2. Serada 7 litrelik Saksılara Alınması ve İzlenmesi .....	32
2.5.3. Kromozom Katlaması Yapılan Ginogenik Pırsalarda Polen Canlılığının Belirlenmesi.....	33
2.5.4. Seradaki Pırsaların Durumlarının Gözlenmesi .....	34
2.6. Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi.....	34
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>35</b>
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>40</b>
4.1. <i>A. ampeloprasum</i> genotiplerinde ginogenesis uyartımı .....	40
4.2. <i>A. ampeloprasum</i> 'da Somatik Sürgün Uyartımı ve Genetik Araştırmalar .....	41
4.3. <i>A. ampeloprasum</i> 'da Genetik ve Biyoinformatik Çalışmaların Islah Açısından Önemi ve Öneriler .....	41
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>46</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>52</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1:** A. Pırasanın çiçeklenmeye başladığı evre. B. Açmayan tomurcuk kullanılır (çiçek umbeli) C. Çiçek tomurcukları sterilize edilir. D. Sterilizasyon sonrası tomurcuklar kurulama kâğıdı üzerine bırakılır. E. Tomurcuklar ginogenesis kültürüne yerleştirilir. F. Uyartım için kültüre alınır ve izlenir. G. Ginogenik hale gelmiş bitki H. Uzama ve büyüme için tüpe ekilen ginogenik bitki..... 22
- Şekil 2.2:** 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). 24
- Şekil 2.3:** Altılı platenin her bir yuvasına antimitotik ajan olan APM, MS medyasına eklenerek yuvalara doldurulur ve ardından bitki eksplantları yerleştirilir. Platteye uygulanan kimyasal ve konsantrasyonu yazılır..... 26
- Şekil 2.4:** Yıkama işleminden sonra bitki parçaları steril bir kağıt üzerinde kuruması içine yatırılır. Böylece fazla sularından kurtulmuş olur..... 27
- Şekil 2.5:** Bitki eksplantlarının hormon içermeyen MS besiyeri içeren megenta kutularına, bebek şişesi ya da tüplere ekimi yapılır. Yıkanan ve kurulan bitki parçaları uzama medyasına ekilmektedir. Üzerine uygulaması ve tarihi yazılmaktadır. .... 27
- Şekil 2.6:** Pırasa bitkilerinin dış ortama aklimize edilmeleri (A. Tüpte büyümesi beklenen ginogenik pırasa bitkisi. B. Tüpten bitki dikaktlice çıkarılır. C. agardan temizlenen bitki küçük saksılardaki toprağa ekilir. D. Saksıya poşet geçirilerek korunur). .... 30
- Şekil 2.7:** Pırasa bitkilerinin 7 litrelik saksılara alınması. Büyütme kabininden ısıtmasız seraya alınarak dış koşullara alışmaları sağlanmıştır..... 33
- Şekil 3.1:** Nisan 2016 itibarıyla elde edilen boy ölçümlerinin ortalama verilerin farklı medya ortamlarında karşılaştırılmalı olarak boxplot grafikleri..... 37
- Şekil 3.2:** Nisan 2016 itibarıyla elde edilen toplam boy ölçümlerinin karşılaştırılmalı grafikleri..... 38
- Şekil 3.3:** Nisan 2016 itibarıyla elde edilen yalancı gövde boy ölçümlerinin karşılaştırılmalı grafikleri..... 38
- Şekil 3.4:** Nisan 2016 itibarıyla elde edilen bitki gövde çaplarının karşılaştırılmalı grafikleri..... 39



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Deney’de kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri.....	21
<b>Tablo 2.2:</b> NIB* (Nuclei isolation buffer) içeriği. ....	22
<b>Tablo 2.3:</b> Elde edilen ginogenik bitkilerin farklı <i>A. ampelopresum</i> genotiplerine göre ploidi seviyeleri. ....	23
<b>Tablo 2.4:</b> Deneyde kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri. ....	25
<b>Tablo 2.5:</b> Toplam kromozom katlaması uygulamasına maruz kalmış bitki sayısı. .	28
<b>Tablo 2.6:</b> Farklı kimyasal ve konsantrasyona tabi tutularak kromozom katlama çalışmasında kullanılan bitki numaraları (Kullanılan bitkilerin numaraları ve ait oldukları ebeveyn hattı ile birlikte maruz oldukları kimyasal ajan birlikte verilmiştir. Tüm ginogenik pırasalar 4 farklı pırasa ebeveyn hattından ileri gelmiştir: Tarsus Uzun, Tarsus Kısa, İnegöl ve Kartal Kalem. 1, 2, 3, 4, 5, 6 numaralı bitkiler kontrol bitkileri olup antimitotik bir kimyasal ile işlem görmemiştir). ....	28
<b>Tablo 2.7:</b> Uzama medyasına aktarılan bitki sayısı. ....	29
<b>Tablo 2.8:</b> Timentin işlemi gören bitki sayısı. ....	29
<b>Tablo 2.9:</b> Viollere aktarılan bitki sayıları ve tarihleri. ....	31
<b>Tablo 2.10:</b> Seradaki büyütme kabinine alınan bitki sayıları ve tarihleri. ....	31
<b>Tablo 2.11:</b> Kromozom Katlaması Yapılan Ginogenik Diploid Bitkilerin Sırasıyla Dış Koşullara Aktarımı (Uzama medyasında bazı bitkiler kardeşlenip ayrılınca bitki sayısı 138’e çıkmıştır. %42’si küçük viollere aktarılabilmıştır. Viollerdeki bitkilerin ise % 53’ü 7 litrelik büyük saksılara aktararak bir sonraki büyüme aşamasına geçebilmişlerdir)...	32
<b>Tablo 2.12:</b> Seradaki 7 litrelik saksılarda gelişen ve büyüyen pırasa bitkileri.....	33
<b>Tablo 3.1:</b> Farklı pırasa genotipinden gelen pırasa bitkilerinin kromozom katlamasından sonra aktarıldıkları serada yapılan ölçüm ortalamaları (Kontrol olarak tutulan bitkilerin yanı sıra TU: tarsus uuzun, TK: tarsus kısa, KK: kartalkalem ve İNG: inegöl pırasa hatlarından gelen ve dış koşullara alıştırılması için seraya aktarılan pırasaların çap, boy ve yalancı gövde uzunluk ortalamalarıdır). ....	37

## ÖNSÖZ

Araştırmama ve çalışmama yön vererek, önemli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN'a ve Sayın Prof. Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK'a çok teşekkür ederim. Tezimin tamamlanması için bana rehberlik eden ve cesaretlendiren Danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Abdullah MELEKOĞLU hocama, değerli katkıları ve emekleri dolayısıyla Sayın Prof. Dr. Yakup KASKA hocama ve Dr. Sevay Ayşe ULUBELİ'ye çok değerli emekleri için teşekkürlerimi bir borç bilirim. Maddi manevi destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan canım annem Neşe GÜNAY'a da ayrıca müteşşekkirim.

Tuğçe Zehra MENDANOĞLU

## 1. GİRİŞ

Dünyada tarımın önemi şüphe götürmez bir gerçektir. Tüm ülkelerin kalkınmasında, zirai donanımın katkısı çok büyüktür. Tarım ürünlerinin elde ediminde, teknolojik araç-gereçlerin kullanımının yanında yadsınmaz bir hakikat var ki o da ıslah çalışmalarının hız kazanmasıdır. Zirai yetiştiricilikte hedeflenen; kaliteli ve yeterli gıdanın ihtiyaç sahiplerine ulaştırılmasıdır. Bu durum da ıslah çalışmalarını ilerlemeye ve gelişmeye zorlamıştır. Bitki soylarını iyileştirme çalışmaları, ürünleri üreticinin ve tüketicinin talep ettiği şekle ve miktara getirmek doğrultusunda devam etmektedir. Üstün sayılan karakter ve özelliklere sahip bitkileri her defasında döllenmeye zorlamak, bu özellikleri veren genlerin popülasyonda tekrar sıklığını artması demektir. O halde ıslah, seçmektir. Tercih edilen karakter ve genleri seçmekle, bunları taşıyan soyların üretimini sağlamış ve dolayısıyla bitki soylarının gelişimine müdahale etmiş oluruz. Çünkü tercih edilen özelliklerin ebeveynlerde toplanması ve gelecek nesle bu özellikleri aktarması istenmektedir. Yapılan bu bilinçli çalışmalar, klasik ıslah yöntemidir. Klasik ıslah çalışmaları, önemli özelliklerin korunmasını sağladığı gibi bilgi açısından da kaynaklık etmektedir. Ancak her zaman başarılı olamamaktadır. Bitki büyümesi ve gelişmesinde kontrol edilemeyen pek çok nedenden dolayı, klasik genetik yöntemleri seçilen iyi karakter ve özellikleri her zaman yeni nesle aktaramayabilir. Verimi arttırmak için uygulansa da klasik ıslah denemeleri zahmetli olmakta ve çok zaman almaktadır. Bunun yerine geçebilecek ise laboratuvar koşullarında denenilen çağdaş genetik yöntemleridir. Çünkü çağdaş ıslah yöntemleri daha kolay ve daha kısa sürede sonuç getirmektedir. Özellikle saf hatların oluşturulmasında çağdaş yöntemler, süreyi 4-5 yıl kadar azaltmıştır. Bu yöntemlerin önünü açtığı yeni gelişmeler ile homozigot genotipe sahip saf bitki hatları elde edilebilmekte ve hibrit çalışmalarında kullanılmak üzere verimli hale getirilmektedir.

Ülke tarımında önemli yeri olan pırasanın (*Allium ampeloprasum*) hibritleştirme çalışmaları için önce saf hatlara ulaşılması gereklidir. Saf hat elde etmede ve onların da tohum üretebilir hale gelmesinde biyoteknolojik çalışmalar denenmiştir. Pırasalarda ginogenesis başarısı sonucu, saf bireylere ulaşılmış ve verimli şekilde bu genetiği diğer jenerasyona aktarması için kromozom katlama uygulamasına tabi tutulmuştur. Pırasa bitkisinde genotipin istenilen yönde değişmesi modern ıslah metotlarının başarısıdır.

## 1.1. *Allium ampeloprasum* Genel Özellikleri

Pırasa bitkisi Kapalı Tohumlu şubesine mensup Monokotileden sınıfına ait Asparagales takımında yer alan *Alliaceae* familyasına bağlı olup, soğan ve sarımsak gibi yakın akraba türleri ile birlikte *Allium* cinsine dahildir. Çoğunlukla Akdeniz ülkelerinde yaygınlık gösteren pırasa bitkisi, ülkemizde yaygın üretilen ve özellikle kışın tüketimi olan sebze grubuna girmektedir. Pırasanın uyum gösterdiği iklim gereği en çok Ege ve Akdeniz ve Marmara Bölgelerinde bulunmaktadır. Dünyada da oldukça yaygın ve farklı çeşitlerde yetiştirilir. Bunun sebebi; pırasanın gün uzunluğuna karşı duyarlı olmamasıdır (De Clercq ve Bockstaele 2002). Pırasa (*Allium ampeloprasum*), hem tohum hem de fide ile üretilmektedir. Pırasa bitkisi iki yıllıktır. İlk yılda vejetatif kısımlar gelişmiştir, ikinci yılda ise çiçeklenerek tohum verebilir. Eğer pırasadan tohum elde etmek istenirse ikinci yılın sonunda çiçeklenme beklenmelidir.

Tüketicinin hem yaz hem kış tercih ettiği pırasa bitkisi K, A, B ve C vitaminleri açısından zengindir. Demir minerali bakımından zengin oluşu gıda önemini arttırmaktadır. Kaempferol (flavonoid) ve folatı bol miktarda içermektedir. Polifenol içeriği (antioksidan) sayesinde dokuları serbest radikallere karşı korur.

### 1.1.1. *Allium ampeloprasum* Morfolojik Özellikleri

Pırasa bitkisi çok farklı morfolojik özelliklere sahiptir. Toprağa iyi bağlanan saçak kök yapısına sahiptir. Kökler yanlara fazlaca dağılım yapmaz, dikey olarak daha derinlere inmektedir. *A. ampeloprasum*'da dikkat çeken yapraklar alt kısımlarındaki sarılma kısımlarından sürekli kardeşlenirler. Yeni çıkan yaprağın, içinden çıktığı eski uzun yaprakla birleştiği mesafe, türünü tespit etmede yardımcı olur. Bu özellik farklı varyantlar gösterir ve yöreye göre değişir (Van der Meer ve Hanelt 1990). Pırasa bitkisinin uzun yaprakları mumsudur. Genelde ilk çıkan yapraklar giderek en dışta kalır ve dışarıdaki yaprağa en yaşlısı diyebiliriz. Pırasada yaprak ayasının genişliği ve yeşil renginin koyuluğu mevsime göre değişkenlik gösterir. Örneğin kışın tüketiciye sunulan pırasalarda yaprak ayası daha geniş ve daha koyu yeşildir. Köklerden sürgün sistemine doğru gövde önce beyaz sonra giderek yeşilleşen kısımlar içerir ve birbiri içerisinden çıkan uzun yaprakları taşımaktadır. Yenilebilir olan da aksa kadar gelen gövde kısmıdır. Ticari olarak tercih edilen, yenilebilir gövde kısmının (beyaz kısmının) uzun olmasıdır. Pırasa bitkisi aynı

soğanlarda görüldüğü üzere umbel şeklinde çiçeklere sahiptir. Tozlaşması, eklembacaklılarla gerçekleşir. Ekildiğinden itibaren sonraki yıl çiçeklenmesi beklenir. Çiçekleri beyaz yahut mor renkte olabilir. Soğanlarda olduğu gibi önce bir çiçek başı ortaya çıkar ancak bu başlık bir zar içindedir. İki hafta içerisinde başlığı örten zar yırtılır ve tomurcuk biçimindeyken çiçekler patlar ve açılır. Çiçekler tohum taslağı çiftler olan bir meyveye döner. Pırasa çiçeklerinde hem erkek hem dişi organ bulunmaktadır. Bir umbelde altışar şekilde duran çoklu çiçeklere sahiptir. Çiçekleri, yabancı tozlaşmaya oldukça elverişlidir. İslahta istenen kendileşme, pırasa çiçeklerinde oldukça zordur. Yavaş büyüyen iki yıllık türlerde yüksek oranda dışardan tozlaşma gerçekleşir (Berninger ve Buret 1967). Açık tozlaşan bitkilerde tek tipleştirme çalışmaları sonuç vermemektedir (De Clercq ve Van Bockstaele 2002). Açık tozlaşan pırasalarda kendileşme zorluğu, pırasada homozigot genetik hattın ortaya çıkmasında problem arz etmektedir (Smith ve Crowther 1995).

Pırasa tohumu, soğan tohumuna benzemekte ancak soğan tohumundan daha küçük ve oval formdadır. Tohumlar siyah renktedir. Tohumların kendine has keskin kokuları vardır. Pırasa tohumu çimlenirken önce bir yaprak sonra ikinci yaprak ortaya çıkar ve uzar. Kış soğukluğuna dayanabilen pırasa bitkisi kuraklığı sevmemektedir. Ülkemizde yaygın şekilde yetiştirilen pırasa bitkisi pH'ı 6,5 olan azotlu toprakları sevmektedir. Kuraklık veya -5 derecenin altındaki sıcaklık ve toprak biçimi pırasa verimini etkilemektedir.

### **1.1.2. *Allium ampeloprasum*'un Genetik Özelliklerine Biyoinformatik Yaklaşımlar**

*Allium ampeloprasum* (pırasa), genetik çeşitliliği fazla olan poliploid bir bitkidir. Heterozigot allellerin çok olması, çok farklı karakterlerin ortaya çıkmasını sağladığından, ekonomik anlamda değerli özelliklere sahip homozigot bireylerin üretimine ihtiyaç vardır. İstenilen özellikte üretim yapılabilmesi için mutlaka biyoinformatik tanımlama ve analiz sonuçlarına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu bakımdan bitkinin bilimsel olarak üretimi ancak bazı biyoinformatik yaklaşımların kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Çok fazla genotipe sahip büyük bir genom içermekte olması sebebiyle (Labani ve Elkington 1987, Arumuganathan ve Earle 1991) heterozigot alleller oluşturduğundan, homozigot karakterlere sahip bireylerin elde edilmesi zorlaştırmaktadır. Çekirdeğinin büyük olması ve genotip çeşitliliğinin

yüksek olması, pırasanın seleksiyon ıslahına da engel oluşturmaktadır. Tüketicie giden ve piyasa değeri olan yenilebilir pırasaların ( $2n=4x=32$ ) kromozom sayısı; tetraploittir (Van der Meer ve Hanelt 1990).

Bitkinin tetraploit olması, somatik doku hücrelerinde her bir kromozomdan 4 takıma sahip olması anlamına gelmektedir. Ancak DNA ağırlığı değişken olabilmektedir. Somatik hücrelerde ( $2n$ ) DNA ağırlığı 24, 32, 40, 48, 56 pikogram gibi değişen değerlerde olabilir (Van der Meer ve Hanelt 1990). Genomundaki değişime açıklama getirilen *Allium ampeloprasum* için farklı görüşler bulunmaktadır. Genomun duplike olmasını otoploidi ile açıklayan grup (Berninger ve Buret 1967, Schweisguth 1970), pırasaların tetrasomik bir genetik gösterdiğini belirtmişlerdir. Otoploidide var olan türün genomu katlanma ypmıştır. Ayrıca pırasalarda resesif öldürücü ve zararlı genlerin frekansı oldukça yüksektir. Kendileşme depresyonu göstermektedir. Kendileşse bile canlılık ve tohum üretim kayıplarının fazla olabilmektedir (Berninger ve Buret 1967, Schweisguth 1970).

Bir diğer görüş ise *Allium ampeloprasum*'un melezlenebilecek yakın akrabaları ile allotetraploit oluşturmasıdır (Koul ve Gohil 1970, Khazanedari ve diğ. 1995) **Alloploidler**, 2 veya 3 primitive (ilkel) türün genomlarının bir araya gelmesi ile oluşan yeni türlerdir. Pırasanın yüksek heterozigotluk göstermesi, alloploidi görüşünü desteklemektedir.

### **1.1.3. *Allium ampeloprasum* ile Yapılan Çalışmalar**

*Allium ampeloprasum*'un genetik yapısı korunacak şekilde çoğaltılması, çeşitli organların kullanılması ile ya da kallus yapısının kültürde rejenere olmasıyla yapılır. Kalluslardan doku kültürü şartlarında pırasa bitkiciklerinin üretilmesi denenmiştir (Novak 1981, Hong ve Debergh 1995). Bunla beraber meristamatik yapıların, çiçeğinin açmamış halinden, çiçek ya da yaprak sapından alına yapıların medyaya alınarak çoğaltılması ile organ kültürü de çalışılmıştır (Novak ve Havel 1981, Juokevieiene ve diğ. 2005). Pırasa ıslahında, pırasanın eşeysiz (kolonal) yetiştirilmesi güçlü sonuçlar vermektedir. Ancak hedeflenen, pırasa bitkisinin sahip olduğu yüksek heterozigot genetiğin neden olduğu olumsuzluğun giderilmesidir.

Bununla beraber iki yıllık türlerde büyük oranda dışardan tozlaşma gerçekleşir (Berninger ve Buret 1967). Bunlarda tek tipleştirme çalışmaları olumlu sonuçlar vermemiştir. Kendileşme gücü gösteren ve daha çok açık tozlaşan pırasalarda bu durum homozigot ebeveyn hattını elde etmede sorun olmaktadır. (Smith ve Crowther 1995).

*Allium ampeloprasum*, kendileşme yerine dışardan tozlaşma eğilimine sahip bir bitkidir. Bununla beraber genetik olarak hibrit allel varlığının yüksek olması, ıslah çalışmalarını yavaşlatma ve zorlaştırmaktadır. Pırasa bitkisini genotip olarak saflaştırmak için seleksiyon ıslahı yerine biyoteknolojik çalışmaları kullanmak gerekmektedir. Doğal yetiştirme şekline alternatif olabilecek biyoteknolojik çalışmalar 1970'li yıllarda denenmiştir. Doku kültüründe rejenerasyon olması ile pırasaların *in vitro* koşullarda üretilebileceği anlaşılmış oldu (Kaska ve diğ. 2014). Sonraki yıllarda ise haploidizasyon metodu denenmiş, homozigot genlere sahip bireylerin ortaya çıkması için uygulanmıştır. Özellikle kendileme depresyonu gösteren pırasa gibi bitkilerde ploidi seviyesi yarıya düşürülerek haploidleştirme uygulanmıştır. Bu yöntem sonucu somatik hücreler de gamet hücrelere eş değer bir kromozom sayısına sahip olur. Haploidizasyondan biri olan androgenesiz pırasada amacına ulaşamamıştır. *Allium ampeloprasum* anterlerindeki olgun olmayan polenler *in vitro* koşullarda denenmiş, başarı gözlenmemiştir (Keller ve Korzun 1996a). Dişi gametten haploid uyarımı yani ginogenesis uygulaması yapılmış, pırasadaki ovum, ovaryum kültürüne alınıp döllenmemiş yumurta hücrelerinden embriyo ve bitkicik üretilebildiği gözlenmiştir (Alan ve diğ. 2016 a, b). Ginogenesis uyarımına cevap veren pırasalarda tetraploit ebeveynler, diploid bireylere dönüşür. Bunun için açmamış çiçek yapısını uyarıcı medya içine ekmek gereklidir (Chen ve diğ. 2011, Keller ve Korzun 1996b). Ginogenesis yöntemi daha önce soğanlarda (*Allium cepa*) denenmiş ve saf soğan hatları üretiminde başarılı olunmuştur (Alan ve diğ. 2004). Hatta ginogenesis ile saf hat üretiminin klasik ıslaha kıyasla 8 yıl erken sonuç alınabileceği rapor edilmiştir (Hyde ve diğ. 2012). Islahta ginogenik bitki uygulaması ekonomik avantaj sağlayabileceği gibi bilimsel açıdan önemli kaynak oluşturmaktadır.

Pırasa, tetraploittir ( $2n=4x=32$ ), ginogenik olanlar ise diploiddir ( $1n=2x=16$ ). Kromozom seviyesi elimine edilmiştir (Alan ve diğ. 2016b). Ginogenik pırasaların, yeni pırasa üretiminde kullanılmayacağı bazı araştırmacılar tarafından rapor

edilmiştir (Voorrips 1991, Schum ve diğ. 1993). Ginogenik pırasa hatlarının tarıma entegre olabilmesi için kromozom katlaması uygulamaları ile ploidi seviyesinin tekrar iki katına çıkarılması gerekmektedir. Böylece saf pırasa hatların üretiminde ginogenik olanlar ara basamak olacaktır. Kromozom katlaması yapılan ginogenik hatların karakterizasyonunun yapılması başka herhangi bir çalışmada yer almamıştır. Pırasada ploidi değişiminin, bitki gelişimi ve tohum verimliliği üzerindeki etkisi bu çalışma ile gözlenmiştir.

## 1.2. Ginogenesis

Bir bitki türünün eşey hücrelerindeki kadar kromozomu somatik hücrelerinde taşıyorsa, bu bitkiler haploiddir. Haploid miktardaki kromozomu üreme hücreleri taşımaktadır (sperm ve yumurta). Ancak vejetatif kısımlardaki hücrelerin de gametlerdeki kadar kromozom taşıması, o bitkinin haploid olduğunu ifade eder (Murovec ve Bohanec 2012). Haploid bitkiler lokuslarında sadece bir alel taşır. Saf hat bir bitki elde etmek için ilk kullanılacak haploid başlangıç metaryali, dişi ya da erkek üreme hücreleridir. *In vitro* bir ortamda haploid bitkilerin üretilmesi için gametler (erkek ya da dişi) kullanılır. Erkek üreme hücresinden haploid bitkilerin elde edilmesine androgenesis denir. Androgenesiste henüz tam olgunlaşmamış genç anterler, buldukları çiçek tomurcuklarından alınarak besi ortamına ekilir. Androgenesis, döllenmede uyumsuzluk yaşayan türlerde homozigot hattın kısa sürede elde edilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. Haploid bitki dişi gametinden üretiliyorsa, buna ginogenesis denir. Ovaryum kültürü ile ginogenesis sağlanmakta ve burada döllenmemiş ovaryum, dişi gametofitlerin veya ovülün uygun kültürlere alınarak yapılan bir işlemdir (Babaoğlu ve diğ. 2002) ve 2 yöntem ile gerçekleştirilebilmektedir. Birinci yöntem henüz olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarının iki haftaya yakın bir süre kültürde tutulması ve sonrasında ovaryumu çıkararak mitotoik olarak yenilenmesi esasına dayanır, rejenere olması beklenir (Jakse ve diğ.1996). İkinci yöntem ise yine henüz olgunluğa erişmemiş çiçek tomurcuklarından ovaryum yapısı çıkarılır ve kültürde denir (Muren 1989). Genetik olarak incelenecek bitkinin saf hat homozigot hatlarının elde edilmesinde ilk basamak haploidizasyondur. Hem erkek hem dişi cinsiyeti birlikte gösterip erkek kısırılığı olan ve androgenesise olumlu yanıt oluşturmayan bitki türlerinin haploidizasyonu için avantaj sağlamaktadır (Thomas 2000, Bhat ve Murthy 2007). Ginogenesis uyartım başarısı pek çok etmenden etkilenmektedir: Donör bitkinin



büyüme ve gelişme koşulları, günlük mağruz kaldığı ışık yoğunluğu ve şiddeti, gelişim dönemlerindeki sıcaklık değerleri, genotipi, besiyer özellikleri, inkubasyon koşulları gibi (Babaoğlu ve diğ. 2002).

Haploid bitki genomlarında her kromozomdan tek set bulunması sebebiyle resesif gen mutasyonları ortaya çıkarılabilir. Saf hat olan homozigot genotipli ebeveynler kullanılarak verimli yeni melezler elde edilebilir (Shalaby 2007).

Bunun yanında haploidizasyon çalışmaları somatik melezleme çalışmalarının daha iyi sonuçlar almasını sağlayabilir. Protoplast kültürü ile iki monoploid protoplastın füzyonu sağlanarak "diploid" elde edilir. Bu yöntemle Somatik melezleme çalışmalarında engel teşkil eden etmenlerin çoğu ortadan kalkabilir.

### 1.3. Poliploidi

Ploidi, canlı genomundaki kromozom setlerinin miktarında, sayısında oluşan değişmelere denir. Eğer somatik yapıların hücrelerindeki kromozom sayısı 2 takımdan fazla ise buna, poliploidi denir. Haploid kromozom sayısını "n" kabul edersek, bunun 2 katına sahip bitkilere diploid, deriz ve 3 veya daha fazla katına sahip bitkilere poliploid bireyler denir. Poliploidi canlı hücrelerinin sahip olduğu genomda, tüm kromozomların aynı oranda artmasıdır. İki tip olur: allopoliploidi ve otopoliploidi. Bir tür içerisinde genom sayısının katlanarak artmasına yani otopoliploidi ve farklı genomlar taşıyan iki türün melezlenmesi ile kromozom sayısı iki katına çıkarak allopoliploidi oluşur.

Poliploidi doğada özellikle bitkilerde kendiliğinden oluşabildiği gibi *in vitro* koşullarda yapay olarak da sağlanabilir. Pırasaların biyoteknolojik çalışmalarında somatik yani mitotik kromozom katlama yöntemleri ile poliploidi denenmiştir. *In vitro* koşullarda çift olan ve hücre bölünmesinde yan yana duran homolog kromozomların birbiri ile eşlenmesi engellenir. Sonuçta zigotta katlanmış kromozom ile sayısı artar. Pırasalarda haplit olan ginogenik diploid bitkicikler, mitoz engelleyen kimyasal bir ajana maruz bırakılır. Hücre bölünmesinin interfaz evresinde normal şekilde eşlenen DNA'dan sonra anafaz evresinde iğ ipliklerinin tutunması ile kromozomlar, zıt kutuplara çekilir ve ayrılır. Ancak antimitotik bir ajan varlığında iğ ipliklerinin dimeleri engellenerek kromozomların çekilerek ayrılması gerçekleşmez. Böylece hücre bölünmesi normal şekilde tamamlanmaz.

Otoploid bitkiler haploid benzerlerine göre daha iri vejetatif yapılara sahiptirler ve daha kalın olurlar. Daha iri ve koyu renkli yapraklara sahiptirler. Tohumları, kökleri, çiçekler daha büyüktür. Daha düşük döllenme şansına sahiptirler. Anormal kromozomal halleri nedeniyle polenler steril olur.

Doğal Allopoloidler, doğada, doğal yollarla melezlenmiş, oluşan hibrit bitkilerin kromozom sayıları, kendiliğinden katlanmıştır. Buğday, yulaf, pamuk, tütün, şekerpancarı doğal allopoloidlere sahiptirler. Doğada bulunan allopoloid türler; daha fazla fertiliteye sahiptirler, diploid ebeveynlerden daha kuvvetlidir. Farklı koşullara uyum sağlayan diploid ebeveynlerden oluşan allopoloidlerin ise uyum yeteneği daha gelişmiş ve tolerans aralığı geniştir. Allopoloid bitki hücreleri diploidlere göre daha büyüktür. Yüksek seviyede bir poliploid bitkide, ebeveynlerden gelen karakteri bozan, zararlı resesif mutasyonlar, dominant alleller tarafından örtülebilir. Böylece bitkilerin alışılmış fenotipik görünüşleri ortaya çıkmayabilir.

Stack ve Roelofs (1996) tarafından yapılan çalışmalarda *Allium ampeloprasum*'un otoploid olduğu düşüncesini ortaya koymuşlardır. Daha önce yapılan araştırmalar da bu görüşü destekler niteliktedir. Ancak Koul ve Gohil (1970), Khazanehdari ve diğ. (1995) *Allium ampeloprasum*'un farklı yabani akrabalarından dolayı genomların karıştığı düşüncesi ile allopoloid olduğunu savunmuşlardır.

Bitki türlerinin kromozom yapıları çeşit geliştirmede kullanılacak ıslah uygulamalarını da etkiler. Kromozom sayısındaki artış doğal (kendiliğinden) olabileceği gibi yapay olarak doku kültürü ortamında da yapılabilir. Daha çok ıslah çalışmaları dahilinde olur. 2002'de yapılan Babaoğlu ve diğ. çalışmalarına göre kromozom arttıkça, bitkisel yapılar ve organlarda irilik meydana gelmektedir. Mesela haploidizasyon ile oluşturulan yeni bitkicikler normal diploid muadillerine oranla daha küçük ve ufak organ ve yapı formlarına sahiptirler. Bazı poliploidlerde ise bunun tersi özellikler gösterebilmektedir. Daralma, küçülme veya cılızlaşma gib. Poliploid bitkilerde dokulardaki su oranı diploidlerdekine oranla daha fazladır. Bu suyun fazlalığından dolayı irileşmenin olduğu öne sürülmektedir. Dokulardaki su artışı soğuklara karşı hassasiyeti de arttırmaktadır. Diploid bitkilerin soğuklara karşı daha dayanıklı olması sonucu çıkmaktadır.

#### 1.4. Kromozom Katlama Çalışmaları

Poliploidi, seksüel ya da somatik olabilir. İlk denenen seksüel poliploididir. Kolşisinin keşfinden önce ıslah için uygulanan eşey poliploidi, patatest, yoncada, yer elmasında ve gül gibi ticari öneme sahip türlerde denenmiştir (Ramanna ve Jacobsen 2003). Eşey poliploidi; indirgenmiş-indirgenmemiş gametlerin birleşmesi ya da her ikisi de indirgenmemiş gamet birleşmesi temeline dayanır. Eşey poliploidi, somatik olandan daha fazla genetik etkiye sahiptir. Bu sadece kromozom seviyesinin yükselmesi değil, gen ifadesinin artması ve genetik rekombinasyonun mayotik etkiden bağımsız çoğalması demektir (Ramsey ve Schemske 1998). Ramanna ve Jacobsen (2003) triploid muz elde etmek için aynı yöntemi kullanmışlardır.

Somatik (mitotik) poliploidi ise, somatik dokularda kromozom katlama uyarımının gerçekleşmesidir. İlk uygulamalar embriyoyu, gelişimi sırasında yüksek sıcaklığa maruz bırakmak şeklindeydi. Randolph (1932), tetraploid mısırı, yüksek ya da düşük sıcaklığa tuttuğu embriyo ile elde etmiştir. Sonra aynı metot, çavdar ve buğdayda kullanmış ve kromozom sayısını arttırmıştır.

Poliploidi, ayrıca ıslaha engel olan bitki kısırlığını ortadan kaldırmak için tercih edilir. Haploidi ile kromozom sayısı indirgenmiş ve dolayısıyla saflaştırılmış bitki ebeveynlerin ıslah uygulamalarının devamında kullanılabilmesi için tohum üretebilir hale gelmesi (verimli) şarttır. Ginogenesis yoluyla somatik hücrelerdeki ploidi seviyesi yarılanmış %100 saf bir bitkinin ıslah materyali olarak kendindeki homozigot genotipi nesillere aktarması hedeflenmektedir. Bunun için kromozom katlama çalışmaları yapılmakta ve bitki hattı baştaki kromozom seviyesine kavuşmaktadır, eski dublike haline dönmektedir (Ellialtıoğlu ve diğ. 2001).

Kromozom katlama çalışmaları kolşisinin keşfi ile hız kazanmıştır (Blakeslee ve diğ. 1922). Çayırda safranı (*Colchicum autumnale*) ekstratından elde edilen alkaloid, antimitotik şekilde davranır. Kolşisin, mitoz esnasında iğ iplikleri yapısındaki  $\alpha$ -tubulin ve  $\beta$ -tubulin dimerlerine bağlanarak, mikrotübül polimerizasyonunu inhibe eder. İnterfazda eşlenen kromozom kromatitleri, anafazda ayrılmaz ve kromozom takımında artma gerçekleşir. Sahip olduğu bu mekanizmayla kolşisin kromozom katlama indüklenmesinde kullanılır. Dhooghe ve diğ. (2011)'e göre bitki tubulinine bağlanma afinitesi az olan kolşisinin ancak milimolar düzeyde

kullanılırsa etkili olabileceğinden bahsetmiştir. 1966'da Murashige ve Nakano, *in vitro* prosedürlerle tütün kalluslarına kromozom katlama çalışmaları yapmışlar ve spontan poliploidi sonucu almışlardır. Levan (1938), kolşisinin bitkilerde kromozom setlerinin katlanarak double haploid yapılması için sıklıkla kullanılan bir bileşik olduğunu ifade etmiştir. Hansen and Anderson, 1998'de yapılan çalışmalar, katlanma frekansının düşük olduğu yeşil bitkilerde kolşisin uygulaması yapılarak haploid bitkilerin elde edilebileceğini göstermiştir (Shahinul Islam 2010). Redha ve diğ. (2000)'in yaptığı çalışmada kolşisin olmadan kromozomdaki katlanma %26,67 oranını bulurken yapılan kolşisin muamelesi sonrası katlanma %62,04 oranına kadar çıktığı gözlenmiştir.

Kromozom katlamada ayrıca amiprofos-methyl (APM), kafein, orizalin, kloral hidrat, asenaften, azot protoksit, 2-hydroxynicotinic asit, sulfinilamid, fenridazonpottasium, trifluralin, etil merkuriklorid, pronamid, heksaklorosikloheksan gibi mitozu engelleyici kimyasal maddelerle de çalışılmıştır. Bouvier ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmalara göre bu uyarıcıların zehir etkisine sahip olup, bitkisel dokulara toksiktir. 1998'de Hansen ve Andersen'in yaptığı benzer çalışmalarda da aynı sonuçlar alınmıştır. Orizalin ve APM'nin karşılaştırıldığı denemeler de bulunmaktadır (Bohanec ve Jackse 2001). Bu araştırmada ise ginogenik olan embriyolar orizalin yahut APM ile işlem görmüş, APM'nin poliploidide daha avantaj sağladığı ifade edilmiştir. APM (amiprofos-methyl) ile haploid embriyolarda %35 değerinde başarının yükseldiği Jackse ve diğ. (2003)'e göre de ifade edilmiştir. Kromozom katlamasının APM ve kolşisin yapılarak bitki metaryalinde kayıp oranının düştüğü, bu uygulamadan sonra bitkilerin büyüebildiği ve verimli hale gelebildiği kanıtlanmıştır. (Alan ve diğ. 2007). Tosca 1995'te orizalin ve kolşisini poliploidi için kullanıp, ikisini de karşılaştırmıştır. Orizalinin bitkisel metaryallere kolşisinden daha az zarar verdiğini belirtmiştir. Buna rağmen kolşisinin kromozom katlamadaki etkisi daha fazlaydı. Başka bir çalışmada orizalin ve kolşisin farklı değerlerde kullanılarak kromozom katlamadaki başarıları değerlendirilmiştir (Geoffriau ve diğ. 1997). Bu çalışmada *Allium cepa*'dan (soğan) elde edilen ginogenik eksplantlarda kolşisin 0,62 mM ve 12,5 mM oranlarında kullanılırken, orizalin ise 10 µM ve 200 µM değişen oranlarda denenmiştir. Sonuçta en iyi yüzdelik oranı (%67) kolşisinle yapılan metaryal vermiştir. Orizalinin ise sonraki gözlemde bitki büyümesinde olumsuz etkilerinin daha az olduğu ifade edilmiştir. Bazı

araştırma sonuçlarına göre iğ ipliklerini inhibe eden bu ajanlar haploidleştirilmiş bitki metaryalinin rejenere olmasını engellemiştir (Jakse ve diğ. 2003; Grzebelus ve Adamus 2004). Yapılan çalışmalarda %40 oranına varan dihaploid metaryal elde edilmiştir, ancak bitkilerde az da olsa kendiliğinden katlama meydana gelebildiği için çıkan sonuç kesinlik içermemektedir. 2012'de Murovec ve Bohanec; APM, orizalin, triflurolin ve pronamidin kromozom katlama için, iğ ipliklerini depolimerize etmede kolçisinden daha iyi sonuçlar verdiğini söylemişlerdir. Eğer *in vitro* koşullarda bitki parçasının işlem gördüğü kolçisin miktarı büyükse başarılı neticeler elde edilir, fakat bitkiye zararı da olur. Kromozom katlamada mitozu engelleyen kimyasalların konsantrasyonu ve muamele süresi mısırdaki da incelenmiştir (Wan ve diğ. 1989; Wan ve diğ. 1995). Anterden çoğalttığı mısır kalluslarını 5, 10, 20 µM orizalin veya 625 ve 1250 µM kolşisin ile 1, 2, 3 gün boyunca işleme tabi tutmuştur. Antimitotik içeren likit medyaya inkubasyona yatıran araştırmacı, sonuç olarak yüksek oranda homozigot double haploid mısır bitkicikleri elde etmiştir.

Soğan ve sarımsağın içinde bulunduğu familyaya ait pek çok türde kromozom katlama yöntemi doku kültürü şartlarında uygulanmıştır. Mitozda replike olmuş kromatitlerin hücre kutuplarına çekilmesi kimyasal ajanlarla engellenerek, kromozomların duplike şekilde kalabileceği ifade edilmiştir (Stödt 1994, Alan ve diğ. 2007). Ginogenik soğanlarda (*Allium cepa*) denenen kromozom katlama sonrası bitkilerin büyüüp tohum üretebildiği belirtilmiştir. Yapraklardan alınan örneklerle oluşturulan sıvı ortama amiprofos-metil ve kolşisin eklenerek istenilen sonuçlar alınmıştır (Maryakhina ve diğ. 1981; Stödt 1994). Yine APM ve kolşisin uygulamasının *Allium* cinsi türlerinde bitki kaybını azalttığı ve büyüeyebilen bitkisel metaryellerin de tohum oluşturabildiği sonuçlarına ulaşılmıştır (Alan ve diğ. 2007).

Dihaploidizasyon denilen bu yöntem, haploid bitkinin antimitotik kimyasallar ile muamelesinden sonra kromozom sayısının normal hale tekrardan gelmesidir (Sangwan ve Sangwan–Norrel 1990; Emiroğlu ve Gürel 1993; Sarı 1994). Dihaploidizasyon, daha önceki yıllarda da sarımsağa (*A. sativum*) doku kültürü şartlarında (*in vitro*) sıvı ortama farklı türden mitozu engelleyen uyarıcılar ilave edilerek denenmiştir (Maryakhina ve diğ. 1981; Novak 1983).

Kromozomların kendiliğinden katlandığı da gözlenmiştir. Tesadüfi ve oldukça az gerçekleşen bu durum daha avantajlı sayılır. Çünkü toksik etkiye sahip

kimyasalların yaratacağı olumsuz etkiye sahip değildir (Murovec ve Bohanec 2012). Haploid olan kalluslar indüklenir ve endomitoz sırasında kromozom seviyesi iki katına çıkmaktadır (endopoliploidi sırasında olan). Hatipoğlu (1999)'nun araştırmasına göre çiçeğin yapısındaki haploid mikrosporların mitoz ile oluşturduğu çekirdekler bazen birleşebilir. Polen içerisinde bekleyen generatif çekirdek ve vejetatif çekirdeklerin füzyonu ile yeni diploid yetişen bitkicikler oluşabilir. Alpsoy (1999) ve Alan ve diğ. (2007)'e göre polen içindeki çekirdeklerin birleşmesi ile oluşan diploid hücreler kültüre alınır, diploid yeni bitkicikler yetiştirilebilir.

*Allium ampeloprasum* (pırasa) ile yapılan kromozom katlama çalışmalarında Stödt, (1994) değişik mitoz engelleyici kimyasal kullanıp denemeler yapmıştır. Kolçisinin %0,15 kullanıldığı poliploidi çalışmasında başarı %15-35 şeklindedir. *Allium ampeloprasum* ebeveyn hatları tetraploiddir. Ginogenik yöntem ile haploidizasyon yapılan bitkicikler diploid olurlar. Ginogenik pırasa eksplantlarına uygulanan kromozom katlama çalışması bitkideki kromozom seviyesinin tekrar tetraploide çıkarılmasıdır. Bunun için ayrıntılı sonuç veren çeşitli çalışmalar henüz yoktur.

*In vitro* koşullarda kromozom katlama başarısı, uygulanan bitki türüne ve doku kültüründe rejenerasyona, eksplant türüne, antimitotik maddenin oranına ve süresine, solüsyonuna, bitkileri dışarı alıştırma zamanına ve uygulanan poliploidi protokollerine bağlıdır. *In vitro* poliploidide iyi standart yakalamak ve sürecin kontrolünü daha iyi sağlamak için etkili prosedürlerin geliştirilmesi ihtiyacı doğmaktadır.

#### **1.4.1. Poliploidinin Avantajları**

Poliploidi çalışmaları uzun vadede evrimsel esneklik sağladığı gibi bitki genetiğine önemli gelişmeler sunmuştur. Yeni türlerin oluşmasında da rolü büyüktür (Comai 2005; Jiao ve diğ. 2011). Hücre başına ikiden daha fazla kromozom setine sahip olmak, bitkilerde türleşme ve çeşitlenme oranını arttırdığı tahmin edilmektedir (Soltis ve diğ. 2009). Genlerin kopyalarını arttırdığı için poliploidi, hücre büyüklüğünü artırır. Sonuçta kromozom seviyesi artmış bireyler, diploid olan atalarına kıyasla daha büyük organ ve kökler, daha geniş yapraklar, meyve, çiçek yapıları ve hatta daha büyük tohum ve tüberler taşımaktadır (Stebbins 1950). Bunlarla beraber fenotipik çeşitlilik, mutasyonel sağlamlık, heterosis ve üremedeki

değişim ıslah metotlarında yapay olarak yapılan kromozom katlama çalışmalarını arttırmıştır. Islahtaki otopoliploidi uyartımı, canlı tohum oranının düşük oranda olması sebebiyle bitkinin vejetatif çoğalmasını sınırlandırmaktadır. Crow (1994)'a göre istisna olarak tohumuz meyve üretimi gibi istenilen karakterler de ortaya çıkarılabilir. Örneğin triploid çekirdeksiz karpuzdaki cazip özellik gibi. Otopoliploidi, bazı stres durumlarına (kuraklık, su azlığı, sıcaklık, patojenlerin varlığı ya da besin eksikliği gibi) toleransı arttırabilir.

Genomu çok fazla heterozigotluk içeren bitki türlerinde, zararlı allellerin varlığı olabilir. Türün duplike edilmiş genleri ile tek lokusta bulunan zararlı mutasyonlar maskelenebilir. Bu anlamda genlerin ekstra kopyaları, koruyucu işlevindedir (Comai 2005).

Hibrit türler, melezleşme ile oluşur ve bu esnada homolog kromozom çiftlerinin doğru eşlenememesi nedeniyle bu bireyler sterildir. Genomu indirgenmiş bu hibritlere uygulanan duplikasyon, kromozom çiftlerinin eşlenmesini sağlayarak, bitkinin steril durumunu ortadan kaldırır. Böylece poliploidi, steril hibritlerde fertilitiyi sağlayarak, iki tür arasında genetik transferine kapı aralar (Dewey 1980). Olsen ve diğ. (2006) de intergenerik bir steril hibrit olan *Chitalpa tashkentensis* ile olan çalışmada anti-tübülün olan orizalinle kromozom katlaması yapmıştır. Sonuçta verimliliğini koruyabilen yeni *C. tashkentensis*'ler elde etmiştir. Bu hibritlerden elde ettiği allotetraploid bireyler ıslahta kullanılabilir hale gelmiştir. O halde poliploidi, allopoliploid türlere katkı sağlamaktadır.

Günümüze kadar denenmiş kromozom katlama çalışmaları sadece gözlenebilen özelliklerin iyileştirilmesi için değil, daha fazla ürün alma, kötü mutasyonel genlerin etkisini azaltma, melezleme gücünü arttırma, kısırılığı ortadan kaldırma ve ekonomik öneme sahip özellikleri taşıyan birey elde etmede sağladığı yararlar için kullanılmaktadır.

#### **1.4.2. Ploidinin Belirlenmesi**

Kromozom katlama uyartımı sonrası çabaların sonuç verip vermediğini bilmek önemlidir. Kromozomu katlanan bitki tiplerinin tespiti için, morfolojik özelliklerin gözlemi ve doğrudan genomölçülmesi gereklidir. Fenotipik karakterlerin gözlemi ve normal orjinal bireylerle kıyas yapmak, kolay ve hızlı

olmakla beraber tek başına karar vermede yeterli değildir. Örneğin poliploid bitkide stoma büyüklüğü ve kloroplast yoğunluğuna bakılarak tespit etmeyi; Silva ve diğ. (2000) orkidelerde, Kadota ve Niimi (2002) armutta, sonraki çalışmalarda üzümde kullanmıştır. Keller ve Korzun (1996a, b)'a göre, kromozom katlanması arttıkça bitki yapraklarında stoma uzunluğu ve plastit sayısı artmaktadır. Buna benzer bir ilişkiyi Tatum ve Rayburn (2006) yapraklardaki epidermal yapıları izlemişler ve kilit hücre stoma büyüklüğü ile DNA içeriği arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir.

Fenotipik gözlemlerin doğrudan kromozom içeriğini sayabilecek ölçümlerle desteklenmesi gerekmektedir. Kromozom içeriğinin direk tespiti ile kesin sonuçlanabilir, bununla beraber sitogenetik tekniklerin yorucu ve türe spesifik protokollerin uygulanması çok emek gerektiren bir iştir (Dolezel ve diğ. 2007). Flow sitometri, kısa zamanda kromozom analizi yapabileceği için hızlı ve güvenilirdir. Flow sitometri analizinde DNA miktarı bilinen örnek baz alınarak, DNA miktarı bilinmeyen numunenin ploidi seviyesi mutlak ya da yaklaşık olarak belirlenebilir. Flow sitometri cihazında, bitkisel hücre partiküllerini içeren süspansiyon bir kanaldan geçerken lazer ışığı ile aydınlatılır. Hücrelerin lazer ışığına verdiği sinyaller toplanır ve analiz edilir. Flow sitometride araştırılacak bitkisel materyal, bitkinin mitotik yeteneğe sahip kök ve sürgün apikal kısımlarından hazırlanan preparattır. Champion ve diğ. (1995b), sürgünün meristematik uçlarından elde edilen preparat ile kromozom seviyesini tespit etmiştir. Champion ve Allan (1990) ise kök apikal kısımlarını kullanmışlardır. Doğrudan ölçüm olan flow sitometrinin daha hızlı ve güvenilir ploidi seviyesi belirlediği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Bohanec 2003; Alan ve diğ. 2003b, 2004, 2007).



## 2. YÖNTEM

### 2.1. Bitki Materyali

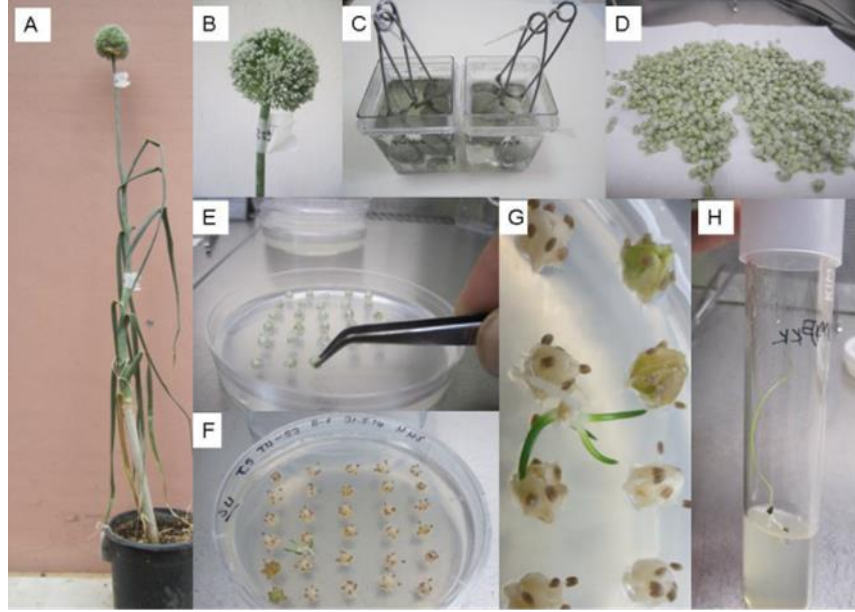
Bu çalışmada kullanılan bitkisel materyal, Pamukkale Üniversitesi BİYOM'dan (Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) tedarik edilmiştir. Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerine uyum sağlamış dört farklı OP (open pollination) pırasa hattından üretilen ginogenik, direk tohumdan bitkiler kullanılmıştır. Dört hattan gelen *A. ampeloprasum* progeni: İnegöl, Tarsus Kısa, Tarsus Uzun ve Kartal Kalemdir. Dört farklı pırasa donöründen yaklaşık olarak açmamış 20 bin çiçek tomurcuğu öncelikle haploidizasyon için kültüre alınmıştır. (Şekil 2.1). Pırasa bitkilerinin haploidizasyonu için ginogenesis yöntemi uygulanmıştır. Bunun için BDS, MS ve B5 temelli yedi farklı ortam hazırlanmıştır. Tablo 2.1' de ginogenesis için hazırlanan ortamlar verilmiştir.

**Tablo 2.1:** Deney'de kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri.

Uyartım ortamı	Oksin		Sitokinin		Karbon	Katılaştırıcı
	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	2İP (mg/l)	Sukroz (g/l)	Agar (g/l)
<sup>a</sup> BDS temelli						
A	2	-	2	-	100	7
A4	-	-	-	-	100	7
<sup>b</sup> MS temelli						
B	2	-	2	-	100	8
B1	-	-	-	-	100	8
B2	-	1	-	8	100	8
<sup>c</sup> B5 temelli						
D1	2	-	2	-	100	7
D2	-	-	-	-	100	7

a- Bohanec ve Jakse (1999). b- Murashige ve Skoog (1962). c- Gamborg ve diğ. (1968).

Buradan elde edilen bitkiler 17°C sıcaklığa ayarlı ve nemi kontrol altında olan, 16 saat kadar aydınlık ve karanlığı 8 saat olan büyütme kabineye aktarılmıştır. Ginogenik ve diploid olduğu tespit edilen 114 adet pırasa eksplantı kromozom katlama işlemine tabi tutulmuştur. Kromozom katlamaya tabi tutulan 53 eksplant Tarsus Uzun, 19 eksplant Tarsus Kısa, 33 eksplant Kartal Kalem ve 9 eksplant ise İnegöle aittir.



**Şekil 2.1:** A. Pırasanın çiçeklenmeye başladığı evre. B. Açmayan tomurcuk kullanılır (çiçek umbeli) C. Çiçek tomurcukları sterilize edilir. D. Sterilizasyon sonrası tomurcuklar kurulum kâğıdı üzerine bırakılır. E. Tomurcuklar ginogenesis kültürüne yerleştirilir. F. Uyarım için kültüre alınır ve izlenir. G. Ginogenik hale gelmiş bitki H. Uzama ve büyüme için tüpe ekilen ginogenik bitki.

## 2.2. Bitkisel Materyallerde Çekirdek DNA Miktarı Analizi ve Ploidi Tespiti

Ginogenesis uyarım kültürlerinden elde edilmiş olan ve belirli bir büyüklüğe gelen (üç-dört yaprak) her ginogenik ve somatik pırasa bitkileri ploidi analizi için hazırlanmıştır. Steril olan kabindeki tüplerde büyüyen bitkilerin yapraklarından parçalar kesilmiştir. Kesilen bitkisel doku parçaları hemen buza konulmuştur. Ploidi seviyesi ölçülecek bitkisel materyalden 50 mg kadar alınmıştır. Kontrol bitkisi olarak arpa kullanılmıştır (*Hordeum vulgare*). Arpadan da 10 mg kadar kesilmiştir. Her iki bitki parçalarının üstüne NIB çözeltisi (çekirdek izolasyon çözeltisi) eklenmiştir (Alan ve diğ. 2016a). Tablo 2.2’de NIB buffer içeriği verilmiştir.

**Tablo 2.2:** NIB\* (Nuclei isolation buffer) içeriği.

Kimyasal	Kimyasal Miktarı	Final	Konsantrasyon Miktarı
HEPES	360 mg		15 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	37,22 mg		1 mM
KCl	597 mg		80 mM
NaCl	116,9 mg		20 mM
Triton X-100	200µl		%0,2 (v/v)
Sükroz	10,3 g		300 Mm
Spermin	17,4mg		0,5 Mm
PVP-40	1 g		%1

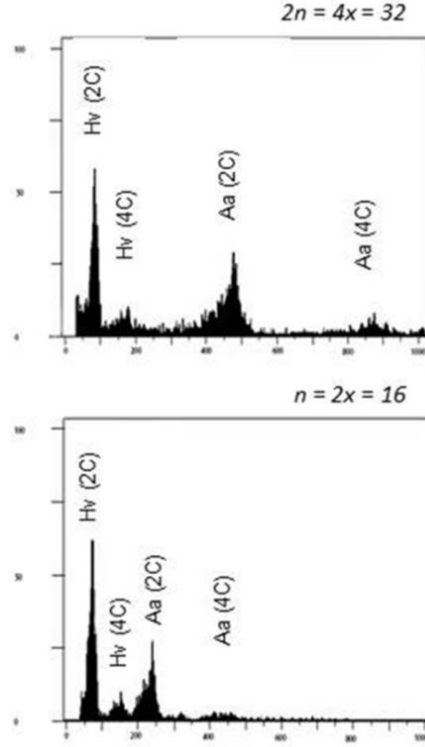
\* NIB solüsyonu hazırlandıktan sonra pH değeri 7,5 olarak ayarlanır ve kullanım zamanına kadar -20°C’de saklanabilir.

Jilet ile hazırlanan yaprak kısımları ezmeden kesilmiştir ve oluşturulan küçük parçalarda hücre çekirdeklerinin açığa çıkması amaçlanmıştır. Bunun üzerine NIB solüsyonundan 0,5 ml kadar konulmuştur. Filtre kullanılarak tüplere süzülerek girmesi sağlanmış ve buz içinde bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler Propidyum iyodür denilen boya eklenir ve vortekslenmiştir. Bu işlemden hemen sonra flow sitometri ile teker teker ölçülerek örneklerin DNA miktarları ve kromozom seviyeleri tespit edilmiştir. Pırasa ve arpa örneklerini analiz ettiğimiz FCM analiz sonuçları Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Farklı ebeveyn pırasa hatlarından gelen ginogenik pırasaların ploidi ölçüm sonuçları (yüzdeler olarak) Tablo 2.3'de verilmiştir.

**Tablo 2.3:** Elde edilen ginogenik bitkilerin farklı *A. ampelopresum* genotiplerine göre ploidi seviyeleri.

Genotip	Test edilen bitki sayısı	2N (%)	2N+4N (%)	4N (%)	4N+8N	8N
TU	82	57 (69,51)	1 (1,22)	22 (26,83)	1 (1,22)	1 (1,22)
TK	38	21 (55,26)	1 (2,63)	16 (42,11)	-	-
KK	70	44 (62,86)	-	24 (34,29)	1 (1,43)	1 (1,43)
İNG	21	14 (66,67)	-	6 (28,57)	-	1 (4,76)
<b>Toplam</b>	<b>211</b>	<b>136 (64,46)</b>	<b>2 (0,95)</b>	<b>68 (32,23)</b>	<b>2 (0,95)</b>	<b>3 (1,42)</b>

Analizlerde tetraploit olarak tespit edilen bitkiler aklimize edilerek seraya aktarılmıştır. Diploid olduğu tespit edilen ginogenik bitkilerin ise kromozom katlaması uygulamalarına tabi tutulmuşlardır.



**Şekil 2.2:** 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).

Dört farklı genotipteki pırasa tipinde uygulanan gengenesis ile ginogenik bitkiye dönüşüm oranları Tablo 2.4'de verilmiştir.

### 2.3. Kromozom Katlama Uygulaması

Kromozom katlama çalışması için kullanılacak bitkisel materyal 4 farklı pırasa ebeveynlerinden elde edilen ve FCM analizi ile diploid ( $2n=2x=16$ ) olduğu tespit edilen ginogenik bitkilerdir. Ön hazırlık olarak Murashige ve Skoog (1962)'a uygun protokollerde MS medyaları hazırlanmıştır. Kontrol amaçlı 6 adet bitki seçilmiştir. Her bitkiye bir kod ve numara verilmiştir. Bu kodlarda hangi pırasa hattına ait olduğu ve hangi gengenesis uyarımı ile oluştuğu bilgisi bulunmaktadır. Kabinde beklediği kültürlerden alınan 6 farklı kontrol bitkisinin köklerinden yarım cm kesilerek örnekler hazırlanmıştır. Küçük ekstratlar MS medyaları içine yatırılmıştır. Kontrol bitkileri herhangi bir kimyasal ile temas etmemesine rağmen 48 saat bekletildikten sonra 10 dakika ara ile 3 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Numaralarının yazılı olduğu uzama medyası içinde cam kavanozlara yerleştirilmiştir.

**Tablo 2.4:** Deneide kullanılan ginogenesis uyartım ortamları ve içerikleri.

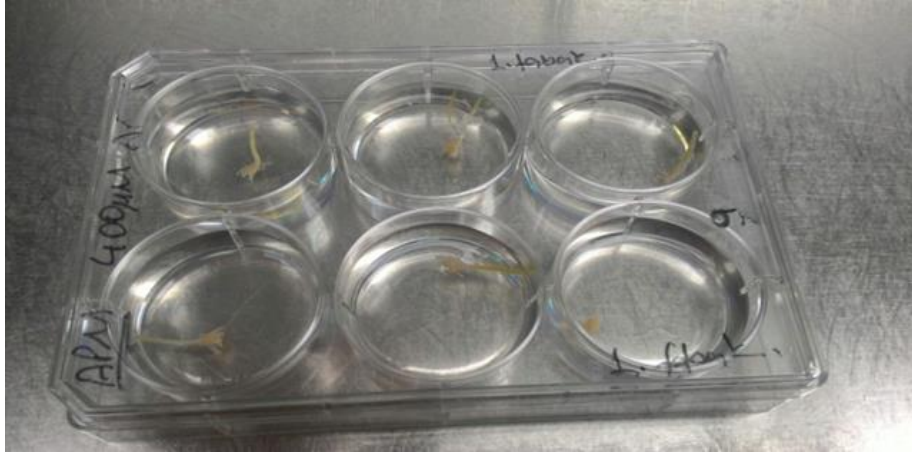
Pırasa genotipi	Ginogenesis uyartım ortamı	Ekilen tomurcuk sayısı	Ginogenik bitkicik no. (%) <sup>b</sup>	Ginogenik bitki no. (%) <sup>b</sup>	Ginogenik bitkiye dönüşüm (%)
<b>İnegöl</b>					
	A	600	8 (1,33)A	2 (0,33)A	25
	A4	750	3 (0,40)A	2 (0,27)A	66,67
	B	801	9 (1,12)A	3 (0,38)A	33,33
	B1	750	5 (0,66)A	4 (0,53)A	80
	B2	750	5 (0,66)A	1 (0,13)A	20
	D1	720	4 (0,55)A	1 (0,14)A	25
	D2	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>
<b>Tarsus</b>					
	A	690	31 (4,49)A	20 (2,90)A	64,52
	A4	720	5 (0,70)A	1 (0,14)A	20
	B	600	22 (3,67)A	17 (2,83)A	77,27
	B1	690	3 (0,44)A	0A	0
	B2	630	2 (0,32)A	0A	0
	D1	570	1 (0,18)A	1 (0,18)A	100
	D2	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>
<b>TK</b>					
	A	600	9 (1,50)A	6 (1,00)A	66,67
	A4	780	0A	0A	0
	B	630	5 (0,79)A	3 (0,48)A	60
	B1	690	4 (0,58)A	3 (0,44)A	75
	B2	690	2 (0,29)A	0A	0
	D1	750	12 (1,6)A	10 (1,33)A	83,33
	D2	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>
<b>KK</b>					
	A	750	0	0	0
	A4	750	5 (0,66)A	3 (0,40)A	60
	B	810	8 (0,99)A	5 (0,62)A	62,5
	B1	750	11 (1,47)A	6 (0,80)A	54,5
	B2	690	5 (0,73)A	2 (0,29)A	40
	D1	720	0A	0A	0
	D2	750	4 (0,53)A	1 (0,13)A	25
<b>ΣKK</b>		<b>5220</b>	<b>38 (0,73)</b>	<b>17 (0,33)</b>	<b>44,73</b>
<b>Toplam</b>		<b>19851</b>	<b>195 (0,98)</b>	<b>102 (0,51)</b>	<b>52,31</b>

Kromozom katlama çalışması için iki farklı antimitotik kimyasal hazırlanmıştır (Kolşisin ve Amiprofos-metil (APM): Kolşisin, 250 ve 500 mg/L ve APM ise 200 ve 400 mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonları denenmiştir).

Tablo 2.5'te kromozom katlaması uygulanan bitki toplam sayısı verilmiştir. Kromozom katlama çalışması yapılan bitkiler; numaraları, seçildikleri ebeveyn hattı ve tabi tutuldukları kimyasal Tablo 2.6'da verilmiştir.

Kolşisin için öncelikle 500 mg/Litre ve 250 mg/Litre konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kolşisin karışımının çözülmesine ve çökmemesine dikkat edilerek üzeri distile su ile tamamlanmıştır. Sıvı MS medyası içine hazırlanan konsantrasyonda kolşisin karışımı eklenmiştir. 6 yuvalı platelerin her bir yuvasına, MS ve kolşisin karışımı olan solüsyondan pipet yardımı ile 8 ml kadar eklenmiştir. Kromozom katlaması için kullanılacak bitkiden, steril ve ıslak bir kâğıt üzerinde kökleri kesilerek ve gövdeden yarım cm kesilerek bir örnek hazırlanmıştır. Bitki örnekleri, plattelerdeki kuyucuklara MS ve kolşisin içeren solüsyona yatırılmıştır.

APM 'nin 200 ve 400 mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. APM 'nin üzeri distile su ile tamamlandıktan sonra MS medyası içine aktarılır. Kullanılacak bitkiler agardan temizlendikten sonra ıslak ve steril bir kağıt üzerinde meristematik dokulara zarar gelmeyecek şekilde yarım cm kesilerek kök ve gövde küçültülmüştür. 6 yuvalı platlere önce 8' er defa pipet ile MS ve APM 'nin birlikte olduğu karışım eklenmiş, ardından hazırlanan bitki örnekleri yuvalara konulmuştur. Bu işlem Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Uygulamalardan sonra plattelerin örtülen kapaklarının etrafına parafilm yapılmıştır. Plattelerin üzerine uygulanan kimyasal ve uygulandığı konsantrasyon yazılmıştır. Alimünyum folyo ile platteler kapatılarak, steril olan kabine alınmış ve burada bekleme süreleri 48 saat kadardır.



**Şekil 2.3:** Altılı platenin her bir yuvasına antimetotik ajan olan APM, MS medyasına eklenerek yuvalara doldurulur ve ardından bitki eksplantları yerleştirilir. Platteye uygulanan kimyasal ve konsantrasyonu yazılır.

48 saat sonrasında yıkama işlemi yapılmıştır. Plattedeki her bir kuyucukta bulunan solüsyon (uygulanan kolşisin + MS veya APM + MS) bir pipet yardımı ile boşaltılmıştır. Ardından her kuyucuğa 8ml distile su eklendi ve 10 dakika distile su

içinde bekletilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Şekil 2.4'te gösterildiği üzere yıkanan eksplantlar, kurumaları ve sularından kurtulması için steril olan bir kağıt üzerine bırakılmıştır. Yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra Şekil 2.5'te görüldüğü gibi yine MS katı besiyeri (hormon içermeyen) ile dolu magentalara aktarımı yapılmıştır. Aktarıldıkları kavanozlara bitki kodu ve transfer tarihi yazılarak, izlenmiştir. Uzama medyasına numaralandırılarak aktarılan eksplantlardan kardeşlenenler ayrılarak, farklı kavanozlara aktarılmışlardır.



**Şekil 2.4:** Yıkama işleminden sonra bitki parçaları steril bir kağıt üzerinde kurumaları için yatırılır. Böylece fazla sularından kurtulmuş olur.



**Şekil 2.5:** Bitki eksplantlarının hormon içermeyen MS besiyeri içeren megenta kutularına, bebek şişesi ya da tüplere ekimi yapılır. Yıkanan ve kurulan bitki parçaları uzama medyasına ekilmektedir. Üzerine uygulaması ve tarihi yazılmaktadır.

**Tablo 2.5:** Toplam kromozom katlaması uygulamasına maruz kalmış bitki sayısı.

UYGULAMA	TOPLAM SAYI
250mg/L Kolşisin	28
500mg/L Kolşisin	29
200mM APM	22
400mM APM	29
KONTROL	6
TOPLAM	114

Toplamda 114 bitki kromozom katlama çalışması için kullanılmıştır. 6 tanesi kontrol ve 108 tanesi ise antimitotik bir ajana maruz bırakılmıştır.

**Tablo 2.6:** Farklı kimyasal ve konsantrasyona tabi tutularak kromozom katlama çalışmasında kullanılan bitki numaraları (Kullanılan bitkilerin numaraları ve ait oldukları ebeveyn hattı ile birlikte maruz oldukları kimyasal ajan birlikte verilmiştir. Tüm ginogenik pırasalar 4 farklı pırasa ebeveyn hattından ileri gelmiştir: Tarsus Uzun, Tarsus Kısa, İnegöl ve Kartal Kalem. 1, 2, 3, 4, 5, 6 numaralı bitkiler kontrol bitkileri olup antimitotik bir kimyasal ile işlem görmemiştir).

PIRASA DONÖR HATTI	KOLŞİSİN UYGULANAN BİTKİ NUMARALARI		APM UYGULANAN BİTKİ NUMARALARI		KONTROL OLARAK KULLANILAN BİTKİ NUMARALARI
	250 mg/L	500 mg/L	200 mM	400 mM	
TARSUS KISA (TK)		13, 14, 15, 16	26, 27, 29, 41, 53, 54, 55	28, 38, 39, 40, 98, 99	3, 4
KARTAL KALEM (KK)	82, 83, 89, 95, 102, 103, 104, 106	17,20, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 105, 112	34, 35, 51, 58, 52, 59	49, 50, 70, 71, 72, 73, 74, 75	5
İNEGÖL (İNG)	107	18,19	36, 37	56, 57, 100,	6
TARSUS UZUN (TU)	14-1, 14-2, 14-3, 14-4, 14-5, 9, 12, 22, 23, 24, 25, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94	7, 8, 10, 11, 66, 67, 68, 69, 84, 85, 108, 110, 111,	30, 31, 32, 46, 33, 47, 48	42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 97, 101	1, 2

Uzama medyasına numaralandırılarak aktarılan eksplantlar, kompas yardımıyla agar üzerindeki kısımları ölçülerek haftalık uzama oranları takip edilmiştir. Bitki parçalarının uzama durumları izlenmiştir. Uzama medyası içinde istenmeyen durumlar gerçekleşmiş ve bitkinin sonraki aşamaya geçişini



engellemiştir. Magenta kutularında bakteri enfeksiyonu görülmüş ve timentin antibiyotiği kullanılmıştır (300 mg/L). Tablo 2.7'de verildiği üzere uzama medyasında kardeşlenen bitkiler ayrılarak farklı kavanozlara alınmışlardır. Uzama medyasındaki bitki eksplantları sayı olarak artmıştır. Bununla beraber bitki örneklerinde camsılaşma, beyazlaşma ve zayıflama da görülmüştür. Bu durumda olanların çoğu bir sonraki aşamaya geçememiştir.

**Tablo 2.7:** Uzama medyasına aktarılan bitki sayısı.

UYGULAMA	TOPLAM SAYI
250mg/L Kolşisin	33
500mg/L Kolşisin	41
200mM APM	22
400mM APM	36
KONTROL	6
TOPLAM	138

#### 2.4. Kontaminasyonda Timentin İşlemi

Büyüme medyası içerisinde uzaması beklenen bitkiciklerin pek çoğu bakteriyal enfeksiyonu görülmüştür. Kontamine olan bitkiler tespit edilmiş ve antibiyotik uygulaması yapılmıştır. 300 mg/Litre timentin (antibiyotik) içeren su hazırlandı ve timentinli suda 15 dakika süreyle bitkiler yıkanmıştır. Yıkanan bitkiler yine timentin (300 mg/Litre) içeren uzama medyasına aktarılmıştır. Uygulama yapılan ekstratların %39'u antibiyotikle işlem görmüştür. Tablo 2.8'de timentin antibiyotiği uygulaması yapılan bitki sayıları verilmiştir.

**Tablo 2.8:** Timentin işlemi gören bitki sayısı.

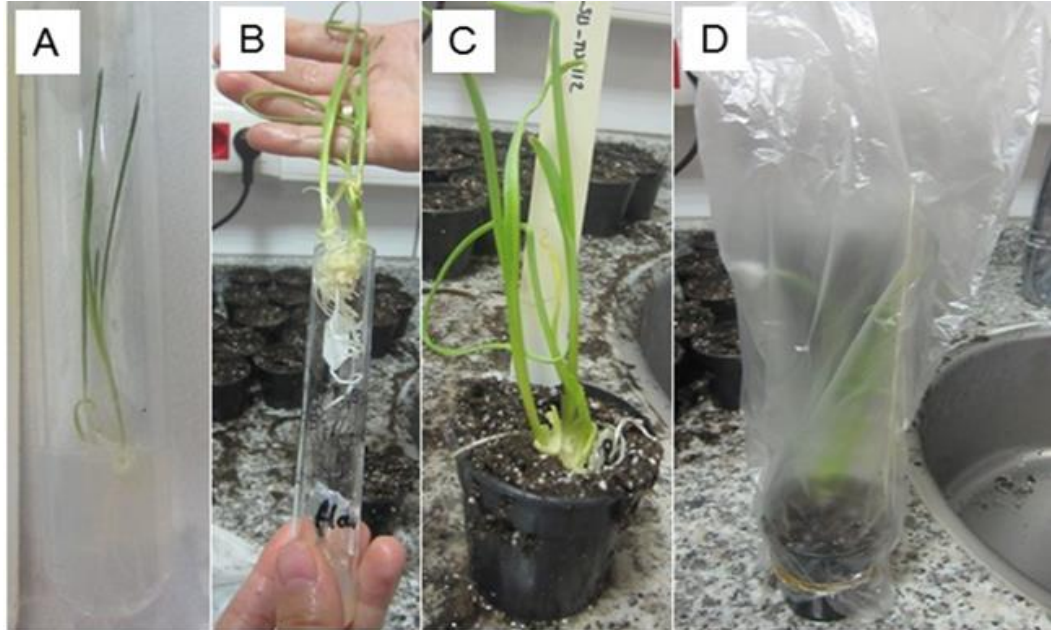
UYGULAMA	TOPLAM SAYI	TİMENTİNLİ SAYISI
250mg/L Kolşisin	33	3
500mg/L Kolşisin	41	13
200mM APM	22	13
400mM APM	36	25
KONTROL	6	1
TOPLAM	138	45

138 bitkinin 55 tanesi timentin antibiyotiği ile yıkanarak bakteriyal kontaminasyona engel olunmaya çalışıldı.

## 2.5. Bitkilerin Dış Koşullara Aktarılması

### 2.5.1. Viollere Transfer Etme

Kromozom katlaması işleminden sonra normal gelişim gösteren ve yeterince köklenen bitkicikler, aklimize olabilmeleri için hazırlanır. Aklimize için 6 hafta kadar beklenmiştir. Önceden otoklavlanmış toprak viollere doldurulur ve distile su ile yeterince ıslatılır. *In vitro* koşullarda yeterince köklenen bitkiler seçilip, çeşme suyu altında köklerdeki medyalar yıkanır ve viollere yerleştirilir. Bitkinin numarasını taşıyan etiketler yeniden yazılarak viollere konuldu. Violler polietilen poşetlerle örtüldükten sonra 17°C olan ve ışığı 18 saat alan bir büyütme kabine aktarıldılar. Tablo 2.9'da verildiği gibi uzama medyasındaki 138 bitkinin, 57'si viollere aktarılmıştır. Şekil 2.6'da bitkilerin viollere aktarımı gösterilmiştir.



**Şekil 2.6:** Pırasa bitkilerinin dış ortama aklimize edilmeleri (A. Tüpte büyümesi beklenen ginogenik pırasa bitkisi. B. Tüpten bitki dikaktlice çıkarılır. C. agardan temizlenen bitki küçük saksılardaki toprağa ekilir. D. Saksıya poşet geçirilerek korunur).

**Tablo 2.9:** Viollere aktarılan bitki sayıları ve tarihleri.

<b>TARİH</b>	<b>VIOLLERE AKTARILAN BİTKİ SAYISI</b>
6 Ocak 2016	7 tane pırasa
12 Ocak 2016	5 tane pırasa
20 Ocak 2016	4 tane pırasa
1 Şubat 2016	4 tane pırasa
10 Şubat 2016	8 tane pırasa
17 Şubat 2016	8 tane pırasa
11 Mart 2016	10 tane pırasa
28 Mart 2016	7 tane pırasa
20 Mayıs 2016	4 tane pırasa
<b>TOPLAM:</b>	<b>57 bitki viole aktarıldı.</b>

Pırasa bitkilerinin viollerde durumu izlendi. Viollerde gelişip büyüyen bitkilerin Tablo 2.10'da verildiği gibi viollerden alınıp seradaki büyütme kabinine aktarımı sağlanmıştır. 50 adet pırasa bitkisi büyütme kabinine geçirilebilmiştir. 7 adet bitki violde ölmüştür.

**Tablo 2.10:** Seradaki büyütme kabinine alınan bitki sayıları ve tarihleri.

<b>TARİH</b>	<b>Seraya geçen bitki sayıları</b>
2 Şubat 2016	12 tane pırasa
15 Şubat 2016	4 tane pırasa
3 Mart 2016	3 tane pırasa
11 Mart 2016	13 tane pırasa
28 Mart 2016	7 tane pırasa
13 Nisan 2016	1 tane pırasa
4 Mayıs 2016	7 tane pırasa
30 Haziran 2016	3 tane pırasa
<b>TOPLAM:</b>	<b>50 bitki seradaki büyütme kabinine geçebilmiştir.</b>

## 2.5.2. Serada 7 litrelik Saksılara Alınması ve İzlenmesi

Seradaki büyütme kabininde büyümesini devam ettirebilen pırasa bitkilerinin yine seradaki (ısıtmasız) 7 L torf ve perlit içeren (3:1) saksılara transferi yapılmıştır. Seradaki büyütme abininde ürün kaybı yaşandı 31 adet pırasa bir sonraki aşama olan 7 litrelik büyük saksılara geçebilmiştir. Tablo 2.11'de kromozom katlama uygulaması yaptığımız ginogenik pırasaların bir sonraki aşamaya geçişini göstermektedir.

**Tablo 2.11:** Kromozom Katlaması Yapılan Ginogenik Diploid Bitkilerin Sırasıyla Dış Koşullara Aktarımı (Uzama medyasında bazı bitkiler kardeşlenip ayrılınca bitki sayısı 138'e çıkmıştır. %42'si küçük viollere aktarılabilmıştır. Viollerdeki bitkilerin ise % 53'ü 7 litrelik büyük saksılara aktarılarak bir sonraki büyüme aşamasına geçebilmişlerdir).

KULLANILAN PIRASA EBEVYN TİPLERİ	UYGULANAN KİMYASAL VE KONSANTRASYONU	Kromozom katlaması yapılan bitki sayısı	Uzama medyasına geçen bitki sayısı	Viola aktarılan bitki sayısı	7L Saksı ile seraya aktarılan bitki sayısı
TARSUS UZUN	Kolşisin: 250 mg/L	19	24	5	3
	Kolşisin: 500 mg/L	13	17	5	2
	APM: 200 mM	7	7	2	1
	APM: 400 mM	12	15	11	3
	KONTROL	2	2	2	2
TARSUS KISA	Kolşisin: 250 mg/L	0	0	0	0
	Kolşisin: 500 mg/L	4	4	2	1
	APM: 200 mM	7	7	2	1
	APM: 400 mM	6	6	1	1
	KONTROL	2	2	1	1
KARTAL KALEM	Kolşisin: 250 mg/L	8	8	8	4
	Kolşisin: 500 mg/L	10	17	8	5
	APM: 200 mM	6	6	2	2
	APM: 400 mM	8	10	3	1
	KONTROL	1	1	0	0
İNEGÖL	Kolşisin: 250 mg/L	1	1	1	1
	Kolşisin: 500 mg/L	2	3	0	0
	APM: 200 mM	2	2	1	1
	APM: 400 mM	3	5	3	1
	KONTROL	1	1	1	1
TOPLAM		114	138	58	31

7 litrelik saksılarda ve ısıtmasız bir serada dış koşullara alışması beklenen pırasa bitkilerinin durumu bu aşamada da izlenmiştir (Şekil 2.7). Seraya geçtikten hemen sonra 13 bitki büyüyememiş, zayıflamış ve ölmüştür. Kalan 18 bitkiden 2 yılın sonunda çiçeklenmesi beklenirken, hayatta kalan 5 pırasa bitkisi olduğu gözlenmiştir. Yaşayan 5 pırasadan yalnızca 2 tanesi çiçek boğumu oluşturmuştur.

Sonunda ise 1 adet pırasa bitkisi çiçeklenebilmiştir. Tablo 2.12'de gösterildiği gibi hayatta kalan 5 pırasa bitkisinin numarası, geldiği ebeveyn pırasa hattı ve uygulama yapılan kimyasal türü verilmiştir.

**Tablo 2.12:** Seradaki 7 litrelik saksılarda gelişen ve büyüyen pırasa bitkileri.

Serada kalan 5 bitkinin numarası:	Ait olduğu pırasa hattı:	KROMOZOM KATLAMA UYGULAMA TÜRÜ:
<i>15 nolu bitki</i>	Tarsus kısa	500 kolşisin uygulanmıştır
<i>60 nolu bitki</i>	Tarsus uzun	400 APM uygulanmıştır
<i>43 nolu bitki</i>	Tarsus uzun	400 APM uygulanmıştır
<i>79-2-1 nolu bitki</i>	Kartal Kalem	500 kolşisin
<i>79-2-2 nolu bitki</i>	Kartal Kalem	500 kolşisin



**Şekil 2.7:** Pırasa bitkilerinin 7 litrelik saksılara alınması. Büyütme kabinden ısıtsız seraya alınarak dış koşullara alışmaları sağlanmıştır.

### 2.5.3. Kromozom Katlaması Yapılan Ginogenik Pırasalarda Polen Canlılığının Belirlenmesi

Polen verimliliği testi, kromozom katlaması uygulanmış bir pırasa bitkisine uygulandı. Çiçeği, tam açmamış halde olanlar toplanarak tüp içine konuldu. Çiçek anterindeki tekalar cımbızla koparılarak lam üzerine konuldu. Üzerine %2'lik asetokarmin boyası eklenerek, polenlerin boya içinde ezilmesi yapıldı. Lamel ile sıkıştırılan ezilmiş preparat mikroskop altında incelendi. Fertil olan polenlerin içine boyanın girdiği ve infertil olanların boyanmadığı mantığından hareketle, polenlerin boyayı içine alması beklendi. Fertil ve infertil polenler ayrı ayrı sayıldı ve verimli olanların oranı çıkarıldı.

#### **2.5.4. Seradaki Pırasaların Durumlarının Gözlenmesi**

Seraya alınan 5 pırasa bitkisinden, 500 kolşisin uygulaması ile kromozom katladığımız ve Kartal Kalem türü pırasa olan **79-2** nolu bitkilerin 1. klonu saksıda ölmüştür. **79-2** nolu bitkinin 2. klonu ise hayatta kalmış ancak ince bir formda seyretmiştir. Uzama, büyüme ya da kalınlaşma gözlenmemiştir.

**43** nolu pırasa bitkisi; (Tarsus Uzun pırasa türüne sahip olup ve kromozom katlaması için 400 APM uyguladığımız), yenilebilir kısmı oldukça uzun ve kalın gövdeye sahip olmuştur. Oldukça iyi büyüdüğü ve geliştiği gözlenmiştir. Seraya ilk geçtiğinde çiçek boğumu oluşturmuş ancak çiçek açmadan boğum kurumuştur. Bitki gelişimi iyi olsa da çiçek açmamıştır.

Tarsus uzun pırasa türü olan ve kromozom katlamasında 400 APM uygulaması yaptığımız **60 nolu** bitki ise, 7 litrelik saksıda ve serada ilk başta uzamıştır. İçinden sürgün vermesine rağmen çiçek boğumu oluşturmamış ve sonrasında zayıflayarak kurumuştur.

**15 nolu** bitki Tarsus Kısa pırasa türüne sahiptir. Kromozom katlaması sırasında 500 kolşisin uygulanmıştır. Bu bitki serada uzamış ve büyüme göstermiştir. Ancak yenilebilir kısmı kısadır. Çiçek boğumu oluşturabilmiş ve çiçeklenmiştir.

#### **2.6. Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi**

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi için Minitab istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Çalışmada medya tipleri (kolşisin 250-500) ve (APM 200-400 mM) arasında fark olup olmadığını anlamak için Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplardan hangisinin diğerlerinden farklı olduğunu anlamak için ise TUKEY yöntemi kullanılmıştır. Ancak örnek sayısının az olması ( $n < 30$ ) durumunda ise non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis Testi kullanılmış ve bunlara ait sonuçlar verilmiştir.

### 3. BULGULAR

I- BİYOM'dan temin edilen 4 farklı pırasa hattı kromozom katlama çalışması için kullanılmıştır: Tarsus Uzun, Tarsus Kısa, İnegöl ve Kartal Kalem. Bu bitkilerden bazıları içinde medya bulunan tüplerde kardeşlenmiştir. Kökteş olan bu bitkiler farklı sürgünler çıkardıkları için, ayrılarak farklı tüplere ekilmiştir. Bu yüzden Tarsus Uzun hattında 57 adet bitkicik, Kartal Kalem hattında 38 bitkicik, Tarsus Kısa hattından 19 bitkicik ve İnegölden ise 9 bitkicik uygulamaya tabi tutulmuştur. Bunların dışında hiçbir antimitotik ajanla muamele edilemeyen 6 adet kontrol bitkisi bulunmaktadır. Tarsus Kısa olan hattan kardeşlenen hiç olmamıştır. En çok kardeşlenen bitkicikler: 250 Kolşisin uygulanan Tarsus Uzun ve 500 Kolşisin uygulanan Kartal Kalemdir.

II- İçi medya olan tüpe batırılmış bitkilerden 40 tanesi büyümediği izlenmiş ve tespit edilmiştir. 16 tanesi beyaz şeffaf camsı bir yapı halini alarak sürgün ve kökte büyüme ve gelişme yapamamıştır. Diğerleri ise zayıflayarak ve büyüme yapmadığı için atılmıştır. 250 Kolşisin uygulaması yapılan bitkilerden 12 tanesinde zayıf ve camsılaşma tespiti edilmiştir. 500 Kolşisin uygulaması yapılanlarda ise 11 bitkicik zayıflama ve camsılaşma nedeniyle ayıklanmıştır. APM uygulaması yapılan bitkicikler içinde 8 tanesi 200 APM yapılan ve 9 tanesi de 400 APM yapılan bitkilerin zayıflayarak ve beyazlaşarak büyüme yapamadığı tespit edilmiştir.

III- Uzama medyasında 250 ve 500 kolşisin uygulaması ile kromozom katlaması yapılan pırasa bitkiciklerinin daha iyi varlık gösterdikleri tespit edilmiştir.

IV- Normal gelişim gösteren bitkiler aklimize olabilmeleri için saksılanıp, polietilen poşetlerle örtüldükten sonra 18 saat ışık ve sürekli 17 °C ye ayarlanmış bir büyüme kabine aktarıldılar. Yaklaşık altı hafta sonra aklimize olmuş olan bitkilerin 7 L torf ve perlit (3:1) içeren saksılara transfer edilerek ısıtmasız bir serada büyümeleri sağlanmaya devam edilmiştir. Ploidi analizi yapılan bitkilerin 82 tanesi dış ortama adaptasyon için saksılara transfer edilmiştir.

V- Viole alınan bitkicikler arasındaki gözlem şu şekildedir: 14 tane bitki 250 kolşisin uygulaması yapılan pırasa bitkicikleridir. 16 tane de ise 500 kolşisin uygulamasına tabi olan pırasa bitkiciklerinin viollere geçebildiğidir. 200 APM uygulananlardan sadece 7 tanesi viollere aktarılabilmiştir. 400 APM uygulaması yapılan 17 bitki ise viollere geçebilmiştir. 4 adet Kontrol bitkisi de viole aktarılabilmiştir. Tarsus Uzun

pırasa hattı uzama medyasında daha fazla kardeşlenerek, büyüeyebilen ve bir sonraki aşama olan viole aktarımda daha fazla bitkiye sahiptir. 400 APM uygulaması yapılan 4 farklı pırasa hattının hepsinde büyüyen ve viole aktarılan olmuştur.

VI- Violde 7 Litrelik saksılara aktarılmak üzere dış koşullara ve iklime alıştıırılan bitkiler arasından 9 tanesi 250 Kolşisin uygulananlardır. 8 tanesi ise 500 Kolşisin uygulananlardır. Tarsus Kısa pırasa hattından 250 kolşisin uygulananların hiçbirisi 7 litrelik saksılara geçememiştir. Hatta çalışmanın erken safhasında uzama medyasında büyüyemediği tespit edilmiştir. İnegöl pırasa hattından olup 500 kolşisin uygulanan hiçbir bitki 7 litrelik saksılara geçememiştir. 200 APM ise 4 farklı pırasa hattında cevap oluşturabilmiş ve büyüyerek dış koşullara alıştıırma safhasına geçebilmiştir. 200APM uygulanan 5 bitki saksılar aktarılmıştır. 400 APM uygulaması yapılan 7 bitki de yedi litrelik saksılara aktarılmıştır. 4 kontrol bitkisi de dış koşullara aktarımı yapılmıştır.

VII- 7 litrelik saksıda hayatta kalan ve büyüeyebilen 5 pırasa bitkisinden sadece 2 tanesi çiçek boğumu oluşturabilmiştir.400 APM uygulanan Tarsus Uzun pırasa türü ve 500 kolşisin uygulanan Tarsus Kısa pırasa türü. Tarsus Kısa olan ve 500 kolşisine maruz bırakılan bitki ayrıca çiçeklenebilmiştir.

Kolşisin-250 uygulaması yapılan ginogenik pırasalardan %42'si viole, Violden 7 litrelik saksılara %57'si geçebilmiştir.

Kolşisin-500 uygulaması yaptığımız ginogenik pırasalardan ise %36'sı uzama medyasından viole ve %53'ü ise violeden 7 litrelik saksılara geçebilmiştir.

APM-200 uygulamasına tabi olan ginogenik pırasalardan %31'i uzama medyasından viole aktarılabilmıştır. Violede 7 litrelik saksılara geçebilen ise %71'dir.

APM-400 uygulaması ile kromozom katlaması yapılan ginogenik pırasalardan uzama medyasından viole geçiş oranı; %50'dir. Violde olup, 7 litrelik saksılara aktarılan %33,33'tür.

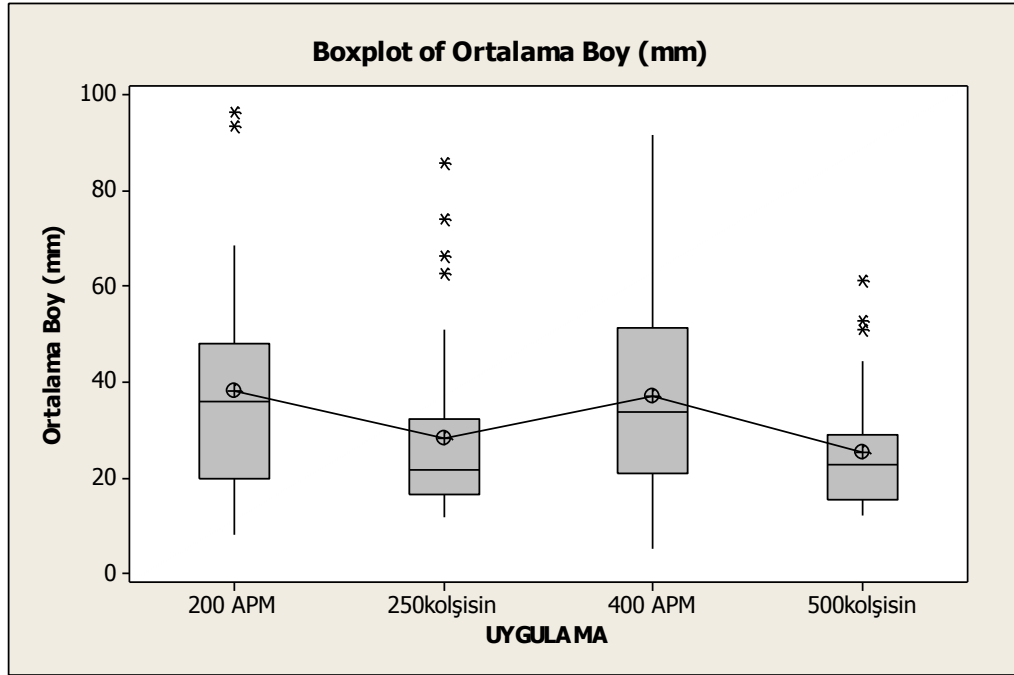
VIII- Hayatta kalan ve sonrasında dışarıya (seraya) geçebilen pırasa bitkilerinin ortalama boy uzunluğu (cm) ve ortalama yalancı gövde uzunluğu (cm) ve bitki gövdesi çap ortalaması (mm) aşağıda Tablo 3.1'de verilmiştir.



**Tablo 3.1:** Farklı pırasa genotipinden gelen pırasa bitkilerinin kromozom katlamasından sonra aktarıldıkları serada yapılan ölçüm ortalamaları (Kontrol olarak tutulan bitkilerin yanı sıra TU: tarsus uzun, TK: tarsus kısa, KK: kartalkalem ve İNG: inegöl pırasa hatlarından gelen ve dış koşullara alıştırmaları için seraya aktarılan pırasaların çap, boy ve yalancı gövde uzunluk ortalamalarıdır).

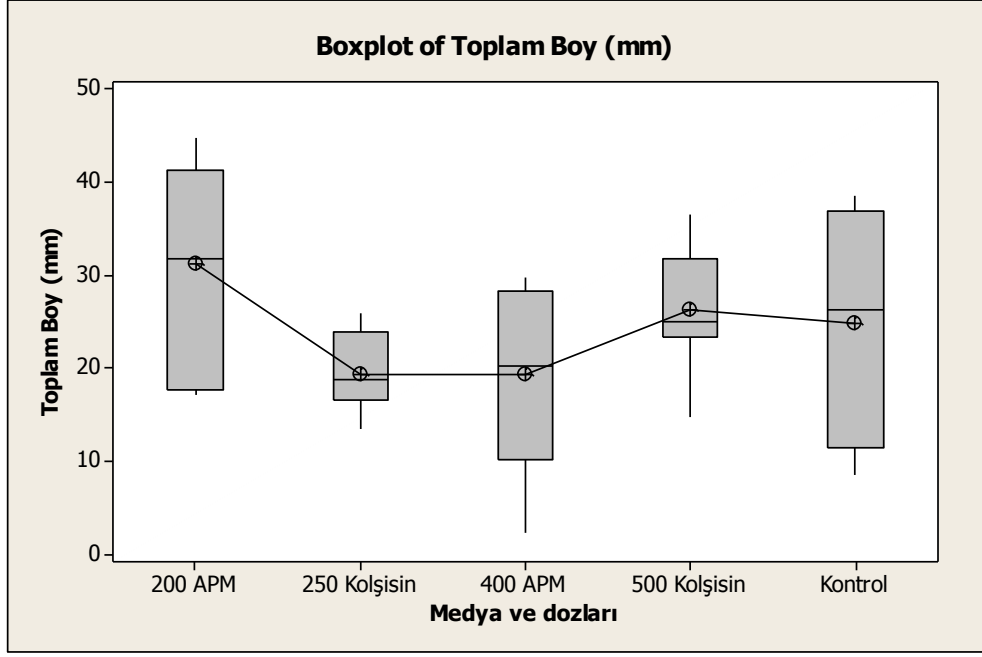
Genotip	Yalancı gövde (cm)	Tam Boy ortalaması (cm)	Yalancı Gövde Çapları Ortalaması (mm)
<b>Kontrol</b>	9,6	48	8.60
<b>TU</b>	5,83	26,17	4,09
<b>TK</b>	4,44	33,4	4,02
<b>KK</b>	10,68	49,73	7,09
<b>İNG</b>	4,89	26,73	3,14

Bitkilerin boyları, yalancı gövde uzunlukları ve çapları ölçülmüştür. Mart-Nisan 2016 döneminde yapılan ölçümlerden elde edilen veriler aşağıdaki şekillerde boxplot grafiği olarak verilmiştir. Bu grafiklerde medyan, birinci ve üçüncü çeyrek yanında ortalamadan sapmaların hangi yönde ve boyutta olduğu ve dağılım dışı veriler de yıldız ile gösterilmiştir.



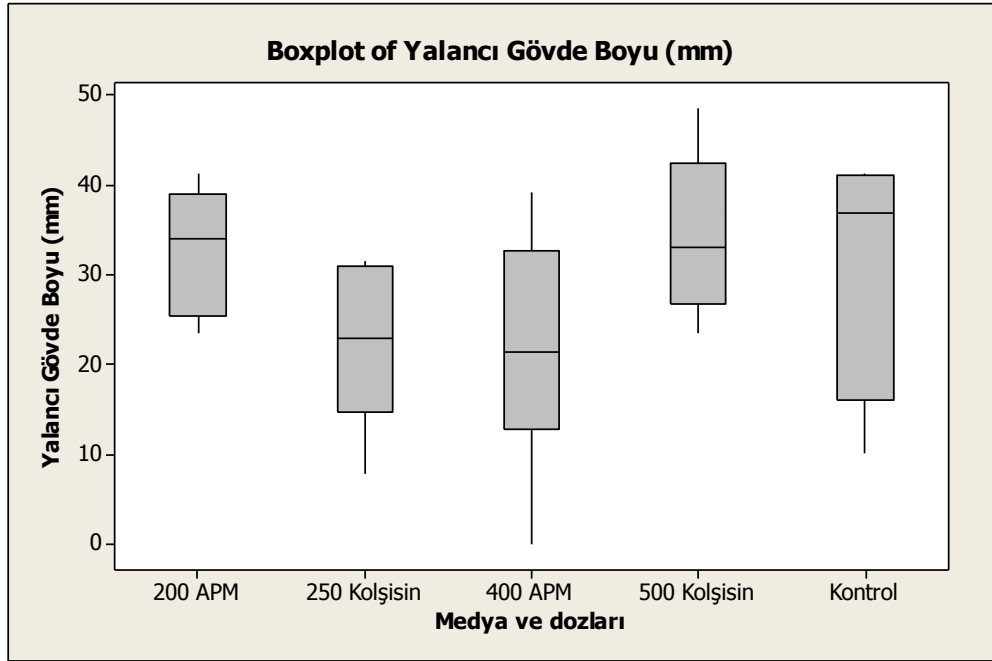
**Şekil 3.1:** Nisan 2016 itibarıyla elde edilen boy ölçümlerinin ortalama verilerin farklı medya ortamlarında karşılaştırılmalı olarak boxplot grafikleri.

Bitkilerin kazanmış olduğu boyların ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ( $F_{3,156}=4,42$   $P<0,005$ ). APM ile gelişme en yüksek seviyedeysen kolşisinin 500 dozluğu diğerlerine göre daha az gelişmeye neden olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Bu fark örnek sayısının azlığı nedeniyle Kruskal Wallis testi ile de doğrulandı (H= 12,40 SD=3  $P<0,006$ ), (Şekil 3.1).



Şekil 3.2: Nisan 2016 itibarıyla elde edilen toplam boy ölçümlerinin karşılaştırılmalı grafikleri.

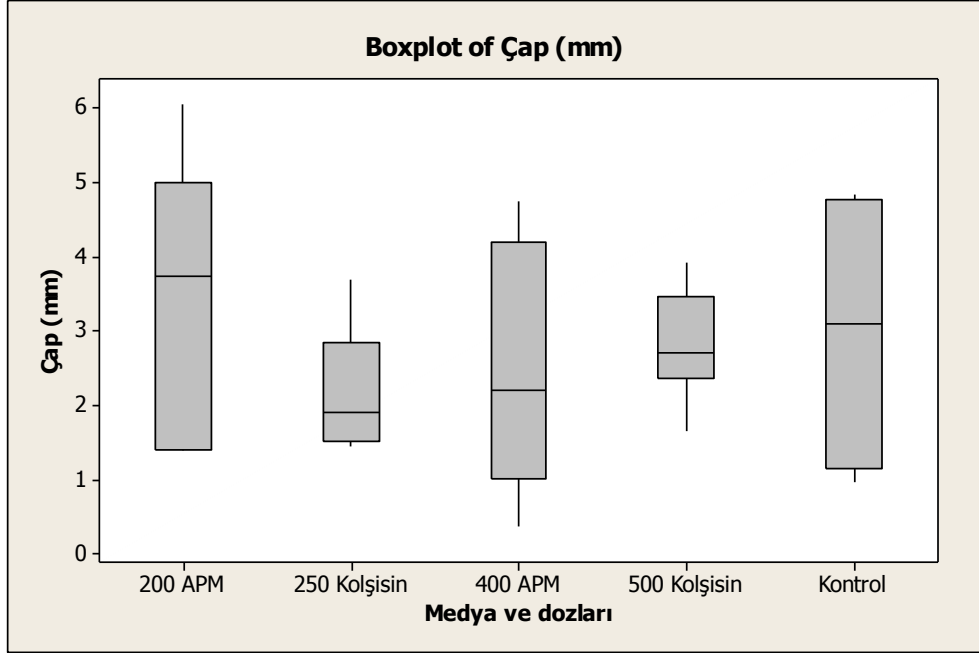
Bitkilerin kazanmış olduğu toplam boylar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ( $F_{4,36}=2,85$   $P<0,03$ ). APM ile gelişmenin 400 ve 200 olan dozları diğerlerinden farklı olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ), (Şekil 3.2).



Şekil 3.3: Nisan 2016 itibarıyla elde edilen yalancı gövde boy ölçümlerinin karşılaştırılmalı grafikleri.

Yalancı gövde boyları farklı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur. ( $F_{4,36}=3,30$   $P<0,02$ ). APM ile gelişme en yüksek seviyedeyken kolşisinin 500 dozlu olan ile APM-400 diğerlerinden farklı

bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Bu fark örnek sayısının azlığı nedeniyle Kruskal Wallis testi ile de doğrulanmıştır ( $H = 9,76$   $SD = 4$   $P < 0,04$ ), (Şekil 3.3).



Şekil 3.4: Nisan 2016 itibarıyla elde edilen bitki gövde çaplarının karşılaştırmalı grafikleri.

Farklı ortamlarda geliştirilen bitkilerin gövde çapları arasında önemli bir farklılık bulunamasa da, kolşisin ortamında geliştirilen bitkilerin diğer ortam ve kontrol grubuna göre daha küçük çapa sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak, farklı ortamlarda geliştirilen bu bitkilerin çapları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ), (Şekil 3.4).

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 4.1. *A. ampeloprasum* genotiplerinde ginogenesis uyartımı

Ginogenesis uygulamasında olumlu sonuçlar alınan Türk pırasa (*A. ampeloprasum*) genotiplerinin, ginogenik olan yeni bitkicikler üretme potansiyellerinde farklılıklar da ortaya çıkmıştır. (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2014). Bu çalışma ile daha önce yapılan bu çalışmalara destekleyen ilave gözlemler elde edilmiştir. Bu türün ginogenesis uyartımı için yapılan denemelerde farklı besi ortamları kullanılarak çalışmalar yapılmıştır.

Yurt dışında yapılan *A. ampeloprasum* ginogenesisinden sonra (Smith ve diğ. 1991; Schum ve diğ. 1993, Juokevieiene ve diğ. 2005) ülkemizde benzer çalışmalar hız kazanmıştır (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Keller (1990), *A. ampeloprasum*'da benzer denemeler yapmış ve ginogenesis denemiştir ancak ginogenik yeni bitki olmamıştır. Schum ve diğ. (1993) daha sonra benzer çalışmalar yapmıştır. Ticari değeri olan yenilen *A. ampeloprasum* bitkileri tetraploiddir. (Van der Meer ve Hanelt 1990). Donör pırasa hatlarından somatik uyartımı ile elde edilen yeni sürgünlerin neredeyse tamamı tetraploiddir.

*Allium* türlerine uygulanan ginogenesis uyartımında kullanılan BDS temelli ve MS temelli medyaların bitki gelişiminde ve rejenerasyonunda benzer sonuçlar vermiştir. (Bohanec 2002). Schum ve diğ. (1993) çalışmasına göre *A. ampeloprasum* ile ilgili yapılan uygulamalarda MS besiyerinin 1mg/l NAA, sokroz (100 g/l) ve 8 mg/l 2IP içermesi ginogenesisi daha etkili yapmakta ve ginogenik bitki gelişimini daha çok desteklemektedir (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Bu çalışmada da benzer medyaların ginogenesis üretiminde etkili oldukları tespit edilmiştir.

Ginogenik bitkiciklerin büyüme medyasında (büyüme hormonu olmayan) gelişimlerini sürdürmeleri sağlanmalıdır. Ginogenik bitkilerin flow sitometri cihazı ile çekirdek genom ve ploidi düzeyleri ölçülmelidir (Bohanec ve Jakse 1999, Jakse ve diğ. 2003). Alan ve diğ. (2003b; 2004; 2007) yaptıkları çalışmalarda olduğu gibi ginogenesis ve sonrasında yapılan uygulamalar için bitki ploidi analizi gereklidir. Bitkiden alınan yaklaşık 50 mg yaprak dokularından elde edilen çekirdeğe ait DNA'lar FSM ölçümü ile belirlenmelidir. Bu çalışma ile ginogenik duruma getirilmiş

pirasalardan elde edilen tetraploid formları tohum verecek hale gelmiştir. Hatta bu tetraploid bitkiler, ait oldukları donörlerin kendi genetiğinden gelen somatik pirasaların kendileşerek oluşturduğu fidelerle kıyaslanmalıdır. Bu tip çalışmaların geliştirilerek devamı ve çalışmalara etki eden genetik özelliklerin tespiti ileriye dönük çalışmalarda avantaj sağlayacaktır.

#### **4.2. A. *ampeloprasum*'da Somatik Sürgün Uyarımı ve Genetik Araştırmalar**

Çalışmalardaki sonuçlara göre genotip, bitkinin somatik sürgün geliştirebilme potansiyelini etkileyen bir faktördür. Bununla beraber çalışmalarda kullanılan besiyeri ve içerikleri bitki somatik dokuların gelişmesi için oldukça kritiktir. Ginogenesis için en uygun genotiplerin belirlenmesi ve bu genotiplerin en iyi cevap vereceği medyaların geliştirilmesi (genotip-medya ilişkisi) bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktördür. (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Medya içerikleri değiştirilerek ginogenesis bitki çoğaltımı üzerine çalışmalar devam ettirilmeli ve bu bitkilerin genetik olarak incelenip biyoinformatik analizleri yapılmalıdır.

Bu çalışmada tetraploid hale getirilen ginogenik *A. ampeloprasum* bitkilerinin, *in vitro* koşullarda tetraploid donörlerden elde edilen somatik veya tohumdan gelişen bitkilere fenotipik açıdan benzer oldukları görülmüştür. Bunun nedenlerinden biri; artan genetik saflık ile birlikte ginogenik hale gelmiş bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyen genlerin de saflaşmasıdır. Bu durumun genetik olarak araştırılması büyük önem arz etmektedir. Bununla birlikte sonradan tetraploid hale getirilen ginogenik bitkilerin, indirgenmemiş ovaryum hücresinden veya tohum taslağındaki somatik bir hücreden meydana gelme olasılığı da ayrıntılı biçimde çalışılmalıdır. Ginogenik bitki tohumlardan rejenere olan fideler ile normal donörlerden yetiştirilen fidelerle arasındaki benzerlik ve farklılıklar belirlenmeli ve veriler biyoinformatik açıdan da değerlendirilmelidir.

#### **4.3. A. *ampeloprasum*'da Genetik ve Biyoinformatik Çalışmaların Islah Açısından Önemi ve Öneriler**

*Allium ampeloprasum*'un yaşam döngüsü 2 yıl olup, fazlaca heterozigot bir genetiğe sahiptir. Kendileşmeden daha çok yabancı tozlaşma yapması ve poliploidi gibi özellikleri, ıslahın daha uzun sürmesine neden olmaktadır (Schweisguth 1970). Bununla birlikte *A. ampeloprasum* türlerinde daha kısa sürede gerçekleştirilen ıslah

çalışmaları da mevcuttur (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Ginogenik cevabı düşük olan bitki türlerinde çiçek tomurcuklarının daha fazla kullanıldığı çalışmalar yapılması durumunda, bu zor genotipe sahip bitkilerin ginogenik formlarını üretme şansı artacaktır.

Diploid haldeki *A. ampeloprasum*'lar kendi aralarında hibritlenip tozlaştırılırsa ve devamında verimli olursa, ıslahları da bu kromozom seviyesinde mümkün olabilir (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Bu ve benzeri çalışmalar diğer bitki türlerinde de uygulanmaktadır. Ginogenesis yoluyla haploidizasyonu daha güç olan *A. ampeloprasum*'da ginogenesis uygulama başarısını arttırabilecek yöntemler daha önce denenmiştir. Örneğin besiyerlerine ilave edilecek kimyasalların kompozisyonu ve kültür koşullarının iyileştirilmesi ile ginogenesisin etkisi arttırılmaya çalışılmıştır (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Benzer çalışmaların devamlı olması önemlidir.

Ginogenesis yöntemi hibrid çeşitlerinin geliştirilmesinde avantaj sağlayabilir. Bu nedenle erkek kısır donör bitkilerin üretimi çalışmalarına da ayrıca önem verilmelidir (Rauber 1988). Erkek kısırlığı olan bitkilerin benzer metotla üretilerek *in vitro* koşullarda çoğaltılması seçeneği de değerlendirilmelidir.

Ginogenesis yöntemiyle bitkilerin kromozom dublikasyonları önlenabilir veya haploid yöntemle geliştirilebilir. Bu bitkilerin biyoinformatik açıdan incelenmesi de ayrıca önem arz etmektedir. Diploid bitki türlerinin ginogenik formları genellikle kromozom sayısı olarak orijinal bitki genomunun yarısını içerir yani haploide düşer (Kaska 2014, Kaska ve diğ. 2013). Bu türe ait çiçek tomurcuklarından ginogenesis uyartımı ile genetik olarak tamamen saf ginogenik hatlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmalar artırılarak türün ticari potansiyeli desteklenebilir ve geliştirilebilir. Bununla birlikte, elde edilen bireylerin genetik özelliklerinin araştırılması ve biyoinformatik açısından da incelenmesi büyük önem arz etmektedir.

*Allium ampeloprasum* genomu, üçüncü kuşak sekans analizi ile çıkartılarak GenBank'a yüklenmiş olan tüm genom referans dizisi ile karşılaştırılmalı ve biyoinformatik bir bakış açısıyla yeniden değerlendirilmelidir. Ginogenik ve yabanıl bireylerin genomlarının biyoinformatik yaklaşımlarla karşılaştırılması, ginogenesis

sürecinde yer alan önemli gen bölgelerinin belirlenmesine ışık tutacaktır. Bu sayede, klasik ıslah yöntemleri kullanılarak elde edilmesi mümkün olmayan ancak zirai ve ticari açıdan değerli özelliklere sahip bireylerin üretimi mümkün olacaktır.

Bu bağlamda; biyoinformatik yaklaşımların kapsamı; ginogenik ve yabancı bitkilerin doku bazlı transkriptom analizlerini, ginogenesis sürecinde hangi genlerin aktive edildiği ve hangi genlerin baskılandığının belirlenmesini, DNA metilasyonu seviyelerinin belirlenmesini, histon modifikasyonlarını, genetik çeşitliliğin belirlenerek filogenetik ilişkilerin analizini, yaygın gen bölgeleri üzerinden filogenetik ağaç oluşturulmasını, ChIP-seq analizlerini, moleküler filogenetik analizler ile türler arasındaki evrimsel bağların tanımlanmasını, ginogenesis sürecinde rol alan proteinlerin belirlenmesi amacıyla diferansiyel gen ekspresyon analizlerinde öne çıkan proteinler için fonksiyonel analizleri, GO (Gene Ontology) ve KEGG analizlerini, ginogenesis sürecinde rol alan proteinlerin belirlenmesini, diferansiyel gen ekspresyon analizlerini, öne çıkan proteinlerin fonksiyonel analizlerini, ginogenesis sürecinde kritik rol oynayan proteinlerin üç boyutlu yapılarının belirlenerek fonksiyonel analizlerinin yapılmasını, protein-protein etkileşim ağı (PPI) analizi ile ginogenesis sürecinde etkileşimde bulunan proteinlerin biyolojik ağlarının incelenmesini ve hücresel işlevlerini, metabolomik ve biyokimyasal analizler kapsamında, ginogenik ve yabancı bitkilerdeki metabolit profillerinin karşılaştırılarak, biyolojik süreçler üzerindeki etkilerinin araştırılmasını, ginogenesis sürecini düzenleyen fitohormonların genetik seviyede nasıl regüle edildiğinin anlaşılmasını, bu hormonların sinyal yolları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini, ginogenik pırsaların tarımsal performansının takibini, dijital fenotipleme teknikleri kullanılarak ginogenik pırsaların büyüme ve gelişim süreçlerinin görüntü işleme algoritmalarını, biyoinformatik ve bilgisayarlı görü araçlarından yararlanılarak fenotipik özelliklerin değerlendirmesini ihtiva etmektedir.

Bu çalışmaların yapılması doğrultusunda biyoinformatik yaklaşımlar için NGS (Illumina, PacBio, Oxford Nanopore), SPAdes, Canu, QUASt biyoinformatik softwareleri kullanılabilir.

Ginogenik ve normal bitkilerin doku bazlı transkriptom analizleri yapılarak ginogenesis sürecinde hangi genlerin aktive edildiği ve hangi genlerin baskılandığı

belirlenebilir. Bu çalışmanın yapılması kapsamında; STAR, HISAT2, DESeq2, EdgeR, Ballgown biyoinformatik softwareleri kullanılabilir.

Ginogenesis sürecinde DNA metilasyonu seviyelerinin belirlenmesi için bisülfid sekanslama (BS-seq) yapılabilir. Histon modifikasyonlarını belirlemek için ChIP-seq analizleri gerçekleştirilmesinde ve bu çalışmanın yapılmasında kullanılacak alternatif biyoinformatik softwareler; Bismark, MethPipe, MACS2, ChIPpeakAnno'dır.

Genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve filogenetik ilişkilerin analiz edilmesi amacıyla ginogenik bireylerde SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve SSR (Mikrosatellit) belirleme çalışmaları gerçekleştirilerek, genetik varyasyonlar değerlendirilmelidir. Bu süreçte; GATK, TASSEL, PLINK, STRUCTURE ve ADMIXTURE gibi biyoinformatik softwareler kullanılarak veriler analiz edilebilir. Türk pırasasının filogenetik düzeyde, farklı *Allium* türleri ile evrimsel ilişkisini belirlemek için ITS, matK ve rbcL gibi yaygın gen bölgeleri üzerinden filogenetik ağaçlar oluşturulabilir. Bu bağlamda; MEGA, BEAST, RAxML ve PhyML gibi yazılımlar kullanılarak moleküler filogenetik analizler gerçekleştirilebilir ve türler arasındaki evrimsel bağlar aydınlatılabilir.

Protein biyoinformatiği ve fonksiyonel analizler kapsamında, ginogenesis sürecinde rol alan proteinlerin belirlenmesi amacıyla diferansiyel gen ekspresyon analizlerinde öne çıkan proteinler için fonksiyonel analizler gerçekleştirilebilir. Bu doğrultuda; GO (Gene Ontology) ve KEGG analizleri kullanılarak ilgili proteinlerin biyolojik süreçlerdeki rolleri detaylı bir şekilde incelenebilir. Analizlerin yürütülmesinde ise DAVID, PANTHER, STRING ve KEGG Mapper gibi biyoinformatik softwarelerden yararlanılabilir.

Protein yapı modellemesi ve simülasyonları kapsamında, ginogenesis sürecinde kritik rol oynayan proteinlerin üç boyutlu yapıları belirlenerek fonksiyonel analizleri gerçekleştirilebilir. Bu süreçte; AlphaFold, I-TASSER, Rosetta ve PyMOL gibi biyoinformatik softwareler kullanılarak protein yapı tahmini ve görselleştirme işlemleri yapılabilir.

Protein-protein etkileşim ağı (PPI) analizi kapsamında ise, ginogenesis sürecinde etkileşimde bulunan proteinlerin biyolojik ağları incelenerek hücresel



işlevleri daha iyi anlaşılabilir. Bu analizlerde STRING, Cytoscape ve BioGRID gibi yazılımlar kullanılarak proteinler arasındaki ilişkiler detaylı bir şekilde değerlendirilebilir.

Metabolomik ve biyokimyasal analizler kapsamında, ginogenik ve normal bitkilerdeki metabolit profilleri karşılaştırılarak biyolojik süreçler üzerindeki etkileri araştırılmalıdır. Bu analizler, MetaboAnalyst, XCMS ve KEGG Pathway gibi biyoinformatik softwareler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Ayrıca, ginogenesis sürecini düzenleyen fitohormonların, özellikle oksin, sitokin ve gibberellin genetik seviyede nasıl regüle edildiği incelenerek, bu hormonların sinyal yolları üzerindeki etkileri değerlendirilmelidir. Bu bağlamda; PlantRegMap, GeneMANIA ve Cytoscape gibi softwareler kullanılarak hormon sinyal yollarının ve ilişkili gen ağlarının detaylı analizi yapılmalıdır.

Tarımsal uygulamalar için biyoinformatik çalışmalar kapsamında, ginogenik pırasaların tarımsal performansının takibi amacıyla IoT (Nesnelerin İnterneti) sensörleri kullanılarak çevresel faktörlerin ginogenesis üzerindeki etkileri analiz edilmelidir. Bu süreçte; RShiny, MATLAB ve Python Dash gibi yazılımlar kullanılarak veri görselleştirme ve analiz çalışmaları gerçekleştirilebilir. Genetik ıslah süreçlerinde ise, dijital fenotipleme teknikleri kullanılarak ginogenik pırasaların büyüme ve gelişim süreçleri görüntü işleme algoritmaları ile takip edilmelidir. Bu analizler için OpenCV, ImageJ ve DeepLabCut gibi biyoinformatik ve bilgisayarlı görü araçlarından yararlanılarak bitkilerin fenotipik özellikleri detaylı şekilde değerlendirilebilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Alan, A. R. Lim, W. Mutschler, M. A., Earle, E. D., “Complementary strategies for ploid manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.)”, *Plant Sci.*, 173: 25–31 (2007).
- Alan, A. R., Brants, A., Cobb, E., Goldschmied, P. A., Mutschler, M. A., Earle, E. D., “Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials”, *Plant Sci.*, 167: 1055–1066, (2004).
- Alan, A. R., Çelebi-Toprak, F., “Ploidy manipulation strategies for economically important *Allium* crops”, *European Biotechnology Conference*, Riga, Latvia. *Journal of Biotechnology*, 231: S31, (2016b).
- Alan, A. R., Mutschler, M. A., Brants, A., Cobb, E., Earle, E. D., “Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn”, *Plant Sci.*, 165: 1201-1211, (2003b).
- Alan, A. R., Toprak, F. Ç., Kaska, A., “Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants”, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 125: 249-259, (2016a).
- Alpsoy, H. C., “Bazı Patlıcan Genotiplerinde in vitro Androgenesis ve Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar”, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), Bursa, 78 Sayfa, (1999).
- Arumuganathan, K. and Earle, E. D., “Nuclear DNA content of some important plant species”, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9, 208-218, (1991).
- Babaoğlu, M. Gürel, E. Özcan, S. (eds.), *Bitki Biyoteknolojisi*, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, (2002).
- Berninger, E. and Buret, P. “Study of chlorophyll deficiencies in two cultivated species of the genus *Allium*: onion *A. cepa* and leek *A. porrum* L.”, *Annales d’Amelioration des Plantes*, 17: 175-194, (1967).
- Bhat, J. G., Murthy, H. N., “Factors affecting in vitro gynogenic haploid production in Niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.)”, *Plant Growth Regul.*, 52: 241–248, (2007).
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., Bergner, A. D., “A haploid mutant in the Jimson weed, “*Datura stramonium*””, *Science*, 55: 646-647, (1922).
- Bohanec, B. and Jakse, M., “Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions”, *Plant Cell Reports*, 18: 737-742, (1999).
- Bohanec, B., “Doubled-haploid onions”, p. 145-157, In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds). *Allium Crop Science: Recent advances*. CABI. Wallingford. UK, (2002).

- Bohanec, B., Ploidy determination using flow cytometry. In: Doubled haploid production in crop plants: A manual, Maluszynski, M. Kasha, K. J. Forster, B. P. and Szarejko, I., pp. 397-403, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (2003).
- Bouvier, L. Fillon, F.R. and Lespinasse, Y. 1994, "Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots in vitro", *Plant Breed.*, 113: 343-346.
- Campion, B. and Alloni C., "Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules", *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 20: 1-6, (1990).
- Campion, B. Perri, E. Azzimonti, M. T., Vicini, E., Schiavi, M., "Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.)", *Plant Breed.*, 114: 243-246, (1995b).
- Chen, J. F., Cui, L., Malik, A. A. and Mbira, K. G., "In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture", *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 104: 311-319, (2011).
- Comai, L., The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6: 836-846, (2005).
- Crow, J. F., "Advantages of sexual reproduction", *Developmental genetics*, 15(3): 205-213, (1994).
- De Clercq, H. and Bockstaele, E. V., Leek: Advances in Agronomy and Breeding. In *Allium Crop Science: Recent Advances*, ed. HD Rabinowitch and L Currah, 431-458. Wallingford, UK: CABI, (2002).
- Dewey, D. R., Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding, In: *Polyploidy*, Eds: Springer, p. 445-470, (1980).
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck J., "Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro", *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 104 (3): 359-373, (2011).
- Doležal, P., et al. "A simple method for the detection of imaginal diapause in beetles", *J. of App. Entomol.*, (2007).
- Ellialtıoğlu, Ő., Sarı, N., Abak, K., Haploid bitki üretimi, Selçuk Üniversitesi Basımevi, (2001).
- Emiroğlu, Ü. and Gürel, A., Modern Biotechnology in Plant Breeding, The Biotechnology Revolution. Short Course, Organised By Ege Univ. Biotechnology Centre and Faculty of Agriculture, Department of Crop Science, February 8-12, Bornova-İzmir, (1993).
- Gamborg, O. L., Miller R. A., Rancillac M., "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells", *Experimental Cell Research*, 50: 151-158, (1968).

- Geoffriau, E., Kahane, R., Rancillac, M. "Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.)", *Euphytica*, 94: 37-44, (1997).
- Grzebelus, E. and Adamus, A. "Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos", *Plant Sci.*, 167: 569-574, (2004).
- Hansen, A. L., Gertz, A., Joersbo, M., Andersen, S. B., "Antimicrotubule herbicides for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture", *Euphytica*, 101: 231-237, (1998).
- Hatipoğlu, R., Bitki Biyoteknolojisi, Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana, 178 sayfa, (1999).
- Hong, W and Deberg, P., "Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek", *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 43: 21-28, (1995).
- Hyde, P. T., Earle, E. D. and Mutschler, M. A., "Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance", *Hortscience*, 47(12): 1690-1695, (2012).
- Jakse, M. and Bohanec, B., Studies of alternative approaches for genome doubling in onion. In: Bohanec, B. (ed) COST Action 825,-Biotechnological Approach for utilization of Gametic Cells-Final Meeting. 1-5 July 2000, Bled Slovenia. Luxembourg. pp. 101-104, (2001).
- Jakse, M., Bohanec, B., Ihan, A., "Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants", *Plant Cell Rep.*, 15: 934-938, (1996).
- Jakse, M., Havey, M. J. and Bohanec, B., "Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos". *Plant Cell Rep.*, 21: 905-910, (2003).
- Jiao, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A. S., Landherr, L., Ralph, P. E., et al. "Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms", *Nature*, 473: 97-100, (2011).
- Juokevieiene, D., Stanys, V., Bobinas, E., "Gynogenesis peculiarities of *Allium* L. vegetables grown in Lithuania", *Biologija.*, 3: 6-9, (2005).
- Kadota, M., Niimi, Y., "In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. *hosui*)", *Plant Cell Rep.*, 21(3): 282-286, (2002).
- Kaska, A., Bazı yenilebilir allium türlerinde ginogenesis uyartımı ve klonal çoğaltma olanaklarının araştırılması, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (2013).

- Kaska, A., Toprak, F. C. and Alan, A. R., "Effect of media on gynogenesis induction in leek (*Allium ampeloprasum* L.) breeding materials", *Int. J. Sec. Met.*, 1(1): 79, (2014).
- Keller J. Korzun L., Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species, In: Jain MS, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants, vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 51–75, (1996b).
- Keller, J. Korzun, L., Ovary and ovule culture for haploid production. *in vitro* Haploid Production in Higher Plants, (eds: Jain, S.M, Sopory, S.K. Veilleux, R.E.). Vol. 1: 217–235, (1996a).
- Keller, J., "Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.)", *Euphytica*, 47: 241–247, (1990).
- Khazanehdari, K. A., Jones, G. H. and Ford-Lloyd, B. V., "Meiosis in *Allium porrum* L. (the leek) revisited. I. Prophase I pairing", *Chromosome Research.*, 3: 433-439, (1995).
- Koul, A. K. and Gohil, R. N., "Cytology of the tetraploid *Allium ampeloprasum* with chiasma localisation", *Chromosoma.*, 29: 12, (1970).
- LabaniI, R. M. and Elkington, T. T., "Nuclear DNA variation in ther genus *Allium* L. (Liliaceae)", *Heretity*, 59: 119-128, (1987).
- Levan, A., "The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*", *Hereditas*, 24: 471-486, (1938).
- Murashige, T., Nakano, R., "Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants", *J. Heredity*, 57: 115–118, (1966).
- Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cell culture", *Plant Physiology*, 15: 473-497, (1962).
- Muren, P., "Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion", *Hortscience*, 24: 833-834, (1989).
- Murovec, J. and Bohanec, B., Haploids and Doubled haploids in plant breeding, *Plant Breeding*, Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.), (2012).
- Novak, F. J and Havel L., "Shoot production from *in vitro* cultured flower heads of *Allium porrum* L.", *Biologia Plantarum praha.*, 23(4): 266-269, (1981).
- Novak, F. J., "Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploid in shoot-tip *in vitro* culture", *Z. Pflanzenzüchtg*, 91: 329-333, (1983).
- Novak, F. J., "Tissue cultures- principles and applications in plant breeding", In Czech. - *Biol. Listy (Praha)*, 46: 81–91, (1981).

- Olsen, R. T., Ranney, T. G., Vilorio, Z., "Reproductive behavior of induced allotetraploid  $\times$  Chitalpa and in vitro embryo culture of polyploid progeny", *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 131: 716–724, (2006).
- Ramanna, M. S. and Jacobsen, E., "Relevance of sexual polyploidization for crop improvement –A review", *Euphytica*, 133: 3-8, (2003).
- Ramsey, J., Schemske, D. W., "Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants", *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 467-501, (1998).
- Randolph, L. F., "Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize", *Proc Nat. Acad. Sci.*, 18(3): 222-229, (1932).
- Rauber, M., Grunewaldt, J., "In vitro regeneration in *Allium* species", *Plant Cell Rep.* 7: 426–429, (1988).
- Redha, A. S. M. S., Islam, B., Büter, P., Stamp, P., Schmid, J.E., "The improvement in regenerated doubled haploids from anther culture of wheat by anther transfer", *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 63: 167-172, (2000).
- Sangwan, R. S., Sangwan-Norrel, B. S., Anther and pollen culture, In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, (ed: Bhojwani, S.S.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, Chapter 9: 220-242, (1990).
- Sarı, N. "Karpuzda Işınlanmış Polen Uyartımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerinde Araştırmalar", Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 242 s. (1994).
- Schum, A., Mattiesch, L., Timmann, E. M., Hofmann, K. "Regeneration of dihaploids via gynogenesis in *Allium porrum* L.", *Gartenbauwissenschaft*, 58(5): 227-232, (1993).
- Schweigsuth, B., "Etudes preliminaires a lamelioration du poireau *Allium porrum* L. Proposition d'une methode demaliration", *Annales de l'Amelioration des Plantes*, 20: 215-231, (1970).
- Shahinul, Islam, S. M., "The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat", *Aust. J. Crop Sci.*, 4(8): 660-665, (2010).
- Shalaby, T. A., "Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.)", *Sci. Hortic.*, 115: 1–6, (2007).
- Silva, P. A. K. X. d. M., Callegari-Jacques, S., Bodanese-Zanettini, M. H., "Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by in vitro techniques", *Ciência Rural.*, 30: 105-111, (2000).
- Smith, B. M. and Crowther, T. C., "Inbreeding depression and single cross hybrids in leek (*Allium ampeloprasum* ssp. *porrum*)", *Euphytica*, 86: 87-94, (1995).

- Smith, B., Godwin, R. M., Harvey, E., Werner, C. P., “Gynogenesis from whole flower buds in bulb onion (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.)” *J. Genet. Breed.*, 45: 353-358., (1991).
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., ... & Soltis, P. S., “Polyploidy and angiosperm diversification”, *Am. J. Bot.*, 96: 336–348, (2009).
- Stack, S. M and Roelofs, D., “Localized chiasmata and meiotic nodules in the tetraploid onion *Allium porrum*”, *Genome.*, 39: 770-783, (1996).
- Stebbins, G. L., “Cytogenetics and evolution of the grass family”, *Am. J. Bot.*, 43: 890–905, (1956).
- Stödt, A., Untersuchungen zur in vitro polyploidisierung von *Allium sp.*, M. Sc. Thesis, University of Hamburg. Hamburg, Germany, (1994).
- Tatum, T. C. and Rayburn, A. L., “PRINS-labeled knobs are not associated with increased chromosomal stickiness in the maize st1 mutant”, *J. Hered.*, 97: 417-422, (2006).
- Thomas, W. T. B., Newton, A. C., Wilson, A., Booth, A., Macaulay, M., Keith, R., Development of recombinant chromosome substitution lines: a barley resource, SCRI annual report 1999/2000, pp 99–100, (2000).
- Van der Meer, Q. P. and Hanelt, P., Leek *Allium ampeloprosu* L. Onion and Allied Crops. Eds: Brewster, J. L. Rabinowitch, II. D. Biochemistry, Food Science, and Minor Crops. CRC Pres, Boca Raton, Florida. p:179-196, (1990).
- Voorrips, R. E., “Unpollinated ovule and ovary culture in leek (*Allium porrum* L.)”, *Allium improvement Newsletter*, 1: 75-76, (1991).
- Wan, Y, Widholm J. M., “Effect of chromosome-doubling agents on somaclonal variation in the progeny of doubled- haploids in maize”, *Plant Breed.* 114: 253-255, (1995).
- Wan, Y., Petolino, I. F., Widholm, I. M., “Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus”, *Theor. Appl. Genet.*, 77: 889-892, (1989).