

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

**GİNOGENİK PIRASA (*ALLIUM AMPELOPRASUM* L.)
HATLARININ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VESİLE KOCAKAYA

DENİZLİ, ARALIK - 2019

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



**GİNOGENİK PIRASA (*ALLIUM AMPELOPRASUM* L.)
HATLARININ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VESİLE KOCAKAYA

DENİZLİ, ARALIK - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

VESİLE KOCAKAYA tarafından hazırlanan “**GİNOGENİK PIRASA (ALLIUM AMPELOPRASUM L.) HATLARINI KARAKTERİZASYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19.12.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

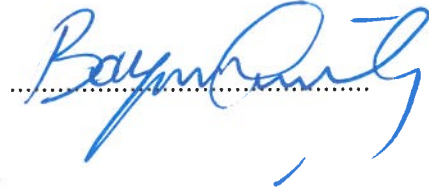
Danışman
Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak
Pamukkale Üniversitesi



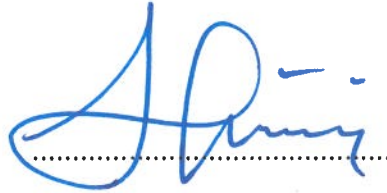
Üye
Prof. Dr. Ali Ramazan Alan
Pamukkale Üniversitesi



Üye
Prof. Dr. Bayram Çevik
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
16/01/2020 tarih ve 03/15 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması 113O232 numaralı TÜBİTAK projesi ve Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından desteklenmiştir.

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

VESİLE KOCAKAYA



ÖZET

**GINOGENİK PIRASA (*ALLIUM AMPELOPRASUM* L.) HATLARININ
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
VESİLE KOCAKAYA
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)

DENİZLİ, ARALIK - 2019

Bu çalışmada, farklı yıllarda ginogenesis yöntemiyle elde edilen *A. ampeloprasum* bitkilerinin morfolojik gözlemleri yapılmıştır. Elde edilen ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen bitkiler karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (PAÜ BİYOM) yürütülmüştür.

Çalışma doku kültüründe elde edilen ginogenik ve somatik bitkilerin toprağa aktarımı ile başlamıştır. Bitkiler önce büyütme kabineye daha sonra seraya adapte edilmiştir. Büyümleri takip edilen *A. ampeloprasum* bitkileri tohum oluşturma dönemine geldiklerinde bitki boyu, çap genişlikleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar ile ginogenik, somatik ve donör bitkiler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Tomurcukları antesis aşamasına gelen bitkilerin de polen canlılıkları test edilerek tohum verimlilikleri değerlendirilmiştir. İki yılda dış ortama uyumu takip edilen pırasa hatlarında en iyi gelişime sahip olan ginogenik bitkilerin İnegöl hattına ait en az gelişim gösteren ginogenik bitkilerin ise Tarsus Ortaya ait olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen ölçümlere bakıldığında ginogenik diploid bitkilerin somatik ve tohumdan elde edilen bitkilere göre genellikle daha küçük boyutlarda oldukları gözlemlenmiştir. Tomurcukları antesis döneminde iken polen canlılıkları test edilen bitkilerin polen canlılık yüzdelerinin 2018'de % 52-86 ve 2019'da ise % 68-92 olarak bulunmuştur. Çiçeklenen bitkilerde tohum veriminin polen canlılığı ile ilişkili olduğu, yüksek tohum veren bitkilerin polen canlılık yüzdelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yetiştirme sezonunda mevsimsel sıcaklığın normalden yüksek (>35° C) olmasının bitki sağlığı ve gelişimini negatif yönde etkilediği, polen canlılığının azalmasına neden olduğu ve tohum verimini olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Uygun sıcaklıklarda (<35° C) yetiştirilen ve olumsuz çevre şartlarından korunan bitkilerin ise daha iyi geliştiği ve sağlıklı bir görünüme sahip olduğu, polen canlılık yüzdelerinin daha yüksek olduğu ve tohum veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile ekonomik önemi yüksek bir türde, *A. ampeloprasum*, ginogenik bitkilerin dış ortamdaki performansları detaylı olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda özellikle tetraploid ginogenik bitkilerin tohumdan yetiştirilen ve somatik kökenli bitkiler kadar sağlıklı büyüdükleri ve tohum ürettikleri gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Ginogenesis, *Allium ampeloprasum*, *In vivo*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF GYNOGENIC LEEK (*ALLIUM AMPELOPRASUM* L.) LINES

MSC THESIS

VESİLE KOCAKAYA

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. FEVZİYE ÇELEBİ TOPRAK)

DENİZLİ, DECEMBER 2019

In this study, morphological characteristics of *A. ampeloprasum* obtained by gynogenesis in different years were evaluated. The gynogenic plants were compared to those obtained from somatic regeneration and seed germination. This study was carried out in Pamukkale University Plant Genetics and Agricultural Biotechnology Application and Research Center (PAU BIYOM).

The study was initiated with the transfer of gynogenic and somatic plants to the soil. These were placed in growth chamber for acclimation process and then transferred into greenhouse for further growth and observations. When they reached the seed formation stage, their heights, and stem diameters were measured and the results of gynogenic, somatic and donor plants were compared to each other. The pollen viability of the plants whose buds reached to the anthesis stage was tested for seed productivity. The adaptation of these leek plants were observed for two years. The most developed plant line was determined as Inegol whereas the least developed one was Tresus Orta in terms of height, diameter and stem width measurement. When all results were considered, diploid gynogenic plants were usually smaller than somatic regenerants and seed germinated plants. The pollen viability of tested plants ranged from 52 to 8 % in 2018 and 68 to 92 % in 2019, respectively. It was found that seed yield of flowering plants was correlated with pollen viability, plants with high pollen viability rates provided high seed yields. It was observed that when seasonal temperature is higher than normal ($>35^{\circ}$ C) the plant health and growth were influenced negatively, caused reduction in pollen viability, and lowered the seed yield. Plants grown under suitable temperatures ($<35^{\circ}$ C) and protected from unfavorable conditions showed better and healthier growth, higher rates of pollen viability and increased seed yield. With this study, performances of gynogenic plants of an economically important species, *A. ampeloprasum*, were evaluated in detail. As a result of this study, it was shown that especially tetraploid gynogenic plants grew healthy and produced seeds as good as plants grown from seeds and those of somatic origin.

KEYWORDS: Gynogenesis, *Allium ampeloprasum*, *In vivo*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Haploidizasyon	2
1.1.1 Androgenesis	3
1.1.2 Ginogenesis.....	3
1.2 <i>Allium</i> ların Genel Özellikleri	5
1.3 <i>Allium ampeloprasum</i> 'un Özellikleri	6
1.4 <i>Allium ampeloprasum</i> 'da Haploid Bitki Üretimi	7
1.5 Ploidi Analizinin Önemi	9
1.6 Polen Canlılığının Önemi.....	9
1.7 Kromozom Katlamasının Önemi	10
2. MATERYAL VE METOD.....	11
2.1 Bitki Materyali	11
2.2 Ginogenik ve Somatik Uyartıma Cevap Veren Bitkilerde Ploidi Analizi	11
2.3 Bitkilerin Toprağa Aktarımı ve <i>In Vivo</i> 'ya Alıştırılması.....	12
2.4 Bitkilerde Gerçekleştirilen Gözlemler	13
2.4.1 Ginogenik, Somatik ve Donör Bitkilerde Morfolojik ve Tohum Verimi Gözlemleri.....	13
2.4.2 Polen Canlılık Testi.....	14
3. BULGULAR.....	16
3.1 Ginogenik <i>A. ampeloprasum</i> bitkilerinin Ploidi Analizleri	16
3.2 Ginogenesis Uyartımına Cevap Veren Bitkilerin Boy, Çap Ölçümleri.....	18
3.3 Ginogenik <i>A. ampeloprasum</i> Materyallerinde Tomurcuk ve Anter Büyüklükleri.....	23
3.4 Uyartılmış ve Spontan Kromozom Katlaması Sonucu Elde Edilen Bitkilerin Morfolojik Gözlemleri	25
3.5 <i>A. ampeloprasum</i> Bitkilerinin 2018 ve 2019 Yıllarındaki Polen Canlılıkları ve Tohum Verimlilikleri	27
4. TARTIŞMA	29
5. KAYNAKLAR	34
6. ÖZGEÇMİŞ.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1: *A. ampeloprasum* bitkilerinin flow sitometri ile ploidi analizi.....12
- Şekil 2: Ginogenik *A. ampeloprasum*'ların toprağa aktarım aşamaları 13
- Şekil 3: *A. ampeloprasum* materyallerinin gövde, boy ve tomurcuk uzunluk, çap ölçümleri ve tohum sayılarının belirlenmesi. 14
- Şekil 4: *A. ampeloprasum* materyallerinde polen canlılık analizi..... 15
- Şekil 5: *A. ampeloprasum* İnegöl genotipine ait ginogenik, somatik ve tohumdan yetiştirilen bitkilerin karşılaştırılması..... 26



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Farklı <i>A. ampeloprasum</i> tomurcuk donörlerinden 2016 ve 2017 yıllarında elde edilen ginogenik bitkilerin ploidi seviyeleri	17
Tablo 2: <i>In vivo</i> ya aktarılmış diploid ginogenik bitkilerde ploidi tespiti.....	17
Tablo 3: 2016 kültürlerinden elde edilen <i>A. ampeloprasum</i> bitkilerinin 2018 yılı ölçümleri.....	20
Tablo 4: 2016 ve 2017 yılı kültürlerinden elde edilen <i>A. ampeloprasum</i> materyallerinde 2019 yılında yapılan morfolojik gözlemler.....	22
Tablo 5: Farklı <i>A. ampeloprasum</i> genotiplerinden elde edilen ginogenik bitkilerinin tomurcuk ve anter büyüklükleri	24
Tablo 6: Uyarım ve kendiliğinden kromozom katlaması sonucu elde edilen bitkilerin boy ve çap ölçümleri.....	26
Tablo 7: Ginogenik <i>A. ampeloprasum</i> bitkilerinin 2018-2019 yıllarında polen canlılık ölçümleri ve tohum verimlilikleri.....	28

SEMBOL LİSTESİ

g/l	:Gram/litre
mg/l	:Miligram/litre
µl	:Mikro litre
°C	:Santigrad derece
PI	:Propodium iodide
m/cm	:Metre/santimetre
Mm	:Milimetre
NIB	:Nuclei isolation buffer



ÖNSÖZ

Ginogenesis yöntemiyle elde edilen *Allium ampeloprasum* bitkilerinin dış ortama uyumunun gözlemlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmayı tez konusu olarak öneren danışman hocam Prof. Dr. Fevziye Çelebi Toprak'a çalışmam boyunca gösterdiği sabır ve her aşamasında yaptığı yardımlarından dolayı teşekkür ediyorum, saygı ve sevgimi yürekten sunuyorum.

Tezimin jürü üyesi olan Prof. Dr. Ali Ramazan Alan'a da yaptığı yardımlarından dolayı teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca yaptıkları yardımlarından ve desteklerinden dolayı başta arkadaşım Fatma Düzgün olmak üzere tüm PAÜ BİYOM ekibine teşekkür ediyorum.

Okula başladığım günden beri maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman arkamda olduğunu hissettiren abim Ali Kocakaya'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca bu süreçte yanımda olduklarını hissettiren manevi desteğini esirgemeyen annem Gülperi Kocakaya'ya ve diğer tüm aile bireylerime de sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum...

Ve babam Dursun Kocakaya anısına...

1. GİRİŞ

Günümüzde her geçen gün artan nüfus ve azalan tarım alanları temel ihtiyaçlarımızdan olan besinlerin önemini daha da artırmaktadır. Dünyamızda karaların sadece % 10'u tarıma elverişlidir. Bu elverişli bölgelerin bir kısmı da erozyon, tuzluluk gibi sorunlarla karşı karşıyadır (Onay ve diğ. 2012). Bu durumda elde edilen besin miktarı nüfus artışına paralel olarak artmamaktadır. Nüfus artışına bağlı olarak insanların ihtiyacı olan gıda ürünlerinin verim ve kalitelerinin artırılması zorunlu hale gelmiştir. Birçok tarımsal bitki türünde artan talebin karşılanmasında yüksek verimli, yüksek adaptasyon kabiliyeti olan, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için bitki ıslahı son derece önemlidir.

Bitki ıslahı, bitkilerin genetik ve sitogenetik özelliklerinden faydalanılarak; görünümü güzel, tatlı, yüksek verim elde edilen, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesidir. Bitki ıslahı, binlerce yıl önce insanların kendileri için besin olabilecek bitkileri seçmesi ile kendiliğinden başlamıştır. Böylece daha verimli ürünler veren bitkilerin tarımı başlamıştır. Bitki ıslahının temelini oluşturan bu yöntem seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. Bitki ıslahının bilimsel anlamda temelleri Gregor Mendel tarafından atılmıştır. Türler içerisinde ya da türler arasında gerçekleştirilen melezlemeler sonucu elde edilen yeni bireyler daha yüksek verim ve kaliteye sahip olabilmektedir. Melezleme ıslahının temeli ise Gregor Mendel'e dayanmaktadır. Gregor Mendel bezelyeleri incelerken sistematik bir şekilde melezlemeler yaparak bazı özelliklerin kalıtım mekanizmasını keşfetmiştir. Bitkilerde fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olan faktörlerin kalıtsal olduğunun anlaşılmasından sonra bitki ıslahı çalışmaları başlamıştır. Önceleri melezlemeler ve kendilemeler sonrası seleksiyon çalışmaları ile başlayan ıslah çalışmaları 1970'li yıllarda haploidizasyon metodlarının geliştirilmeye başlamasıyla yeni bir ivme kazanmıştır. Günümüzde ıslah sürecini kısaltmak, üretimi iyileştirmek ve tarım üzerinde çevrenin etkisini azaltmak için biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır (Keller ve Kik 2018).

Allium türlerinin klasik yetiştirme koşullarında geliştirilmesi; bitkinin uzun yaşam döngüsü, heterozigot olması, kendileme depresyonu, ploidi seviyesinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı uzun ve zaman almaktadır. *Allium* türlerinde homozigot hatların üretimi ve çeşit geliştirme sürecini hızlandırmak için double-haploid (DH) teknolojisinden faydalanılabilir. *Allium*larda DH bitki üretimi için en uygun yöntemin ginogenesis olduğu tespit edilmiştir (Alan ve diğ. 2016). Modern ıslah yöntemlerinin kullanılabilmesi ıslahı zor olan bitkiler için büyük avantajdır.

1.1 Haploidizasyon

Diploid; hücre başına iki kromozom setine sahip hücre ya da organizmaya karşılık gelirken, haploid; hücre başına tek bir kromozom setine sahip hücre ya da organizmaya karşılık gelmektedir (Watts ve diğ. 2018). Bir türün normal kromozom sayısının yarısına sahip olan eşey hücrelerinden yararlanılarak, o türün gametik kromozom sayısını taşıyan bitkilerin elde edilmesine haploidizasyon denir.

Haploid bitkiler; *in vitro* ve *in vivo* uyartım ile elde edilebilirken nadiren de olsada doğada kendiliğinden ortaya çıkabilmektedir. Fakat ortaya çıkma oranı farklı genotiplere göre değişkenlik göstermekte ve genellikle düşük seviyelerde kalmaktadır (Dunwel 2010). Doğal haploidlerin kaynağı genellikle bir tohumun birden fazla embriyoya sahip olması durumudur. Birçok bitki türünde ikiz embriyolardan farklı ploidi seviyelerine sahip bitkiler üretilebileceği tespit edilmiştir (Zenkteler ve diğ. 2012). Bu bitkilerde haploidler ikizlerin birinde görünür ve yumurta hücresi dışında döllenmemiş bir hücreden üretilir. Kendiliğinden gelişen haploidlerin varlığı ilk olarak *Datura stramonium* bitkisinde 1921 yılında Dorothy Bergner tarafından tespit edilmiştir (Blakeslee ve diğ. 1922). Zhang ve diğ. (1989) tarafından yapılan çalışmada meyve ağaçlarından elma ve şeftalide ilk kendiliğinden haploid bitkiler elde edilmiştir. Ayrıca kuşkonmaz çeşitleri üzerinde yapılan çalışmada ikiz embriyolar bulunmuş ve elde edilen haploid bitkilerin kromozomları iki katına çıkacak kadar bitkisel canlılığa sahip oldukları gözlemlenmiştir (Zenkteler ve diğ. 2012). Doğada kendiliğinden elde edilen haploid bitkiye oldukça az rastlanmaktadır. Bu sebeple kısa sürede çok sayıda ve sağlıklı bitki elde edebilmek için *in vitro* yöntemlere başvurulmuştur. Bu yöntemlerden bazıları androgenesis ve ginogenesis olarak bilinmektedir.

1.1.1 Androgenesis

Androgenesis, anter veya mikrospor kültürleri yapılarak, olgunlaşmamış polen tanelerinden kallus ve embriyoların elde edilmesi yöntemidir. Bu uygulama ile elde edilen bitkilerin hücrelerinde haploid sayıda kromozom bulunması nedeniyle steril kalmalarının önüne geçilmesi için kromozom katlaması ile bitkilerin katlanmış haploid (DH) hale getirilmesi gerekir (Dwivedi ve diğ. 2015). İlk başarılı androgenesis uygulaması *Datura stramonium* da gerçekleştirilmiştir (Blakeslee ve diğ. 1922). Sonrasında pirinç, buğday, mısır, arpa, ekonomik açıdan önemli ağaçlar, meyve bitkileri ve şifalı bitkiler gibi birçok bitki anter kültürü ile üretilmiştir (Mishra ve Rao 2016). Anter kültüründe başarılı sonuçların yanı sıra başarısız sonuçlar da elde edilmiştir. Keller ve Korzun'un (1996) soğanda haploid üretmek için yaptıkları anter kültür deneyleri başarısızla sonuçlanmıştır. Androgenesis; üreme döngüsünü kısaltma, homozigot durumdaki özellikleri sabitleme ve yararlı resesif özelliklerin seçim etkinliğini artırma avantajlarından dolayı bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir (Mishra ve Rao 2016). Bu tekniğin dezavantajları olarak ta yoğun emek, zaman alıcı, düşük embriyogenesis ve yüksek albinizm sıklığı sayılabilmektedir (Dwivedi ve diğ. 2015).

1.1.2 Ginogenesis

Diploid bir bitkinin döllenmemiş yumurta hücresinden haploid bitki elde etme sürecidir. Ginogenesis yöntemi androgenesise oranla daha yüksek genetik stabilite ve düşük albino etkisi gösterebilir androgenesis uygulamasının başarısız olduğu bitkilerde alternatif bir yöntem olarak uygulanmaktadır (Murovec ve Bohanec 2012, Chen ve diğ. 2011). Ginogenesis uygulamasında androgenesis uygulamasının aksine daha az verim elde edilmesi ve yoğun emek gerektirmesi ginogenesisin dezavantajlardandır (Pazuki ve diğ. 2018).

Haploidi durumu ginogenesis ile elde edilen soğan bitkilerde oldukça stabildir (Alan ve diğ. 2007). Bu yöntemle elde edilen haploid bitkilerde kromozom katlaması uygulamaları yolu ile elde edilen diploid (DH) bitkilerden bir jenerasyonda yüzde yüz homozigot (saf) hatlar elde edilebilir. Tetraploid bitkilerin tomurcukları kullanılarak ginogenesis ile diploid bitkiler elde edilebilmektedir (Alan ve diğ. 2016). Elde edilen

diploid bitkiler çiçeklenme dönemine geldiğinde tomurcuklar tekrar ginogenesis uyartım medyasına konularak haploid bitkiler elde edilebilmesi mümkün olabilir. Kromozom katlaması tekniği ile önce diploid daha sonra tetraploid saf hatlar elde edilebilmektedir.

Ginogenesis yöntemi ile haploid bitkilerin üretimi ilk kez arpada yumurtalık eksplantlarının kültüre alınması elde edilmiştir (San Noeum 1976, Chen ve diğ. 2011). Bunu takiben soğan, patates, mısır, lale, şeker pancarı, buğday gibi birçok bitki türünde döllenenmemiş ovül kültüründen haploid bitkiler elde edilmiştir (Chen ve diğ. 2011). Ginogenesis çalışmalarında ovul, ovarı ve tüm tomurcuk eksplantlarının farklı uyartım ortamlarındaki performansları araştırılmıştır. Ginogenik bitki eldesi ovul ve ovarı kültüründe zor ve zaman alıcı olduğu için tüm çiçek tomurcuklarının kültüre alınması daha çok tercih edilmiştir (Alan ve diğ. 2004). Soğanlarda açmamış çiçek tomurcuklarının kültüre alınması sonucu ginogenik bitki elde edilmesi başarılı olmuştur (Bohanec ve Jakse 1999, Alan ve diğ. 2003). Tüm tomurcuk kültürü yöntemi ile başarı elde edilen diğer bir bitki olan pırasada da ginogenesisinde başarı elde edilmiştir (Alan ve diğ. 2016).

Ginogenesis yönteminin başarısını birçok biyotik ve abiyotik faktörler (donör bitkinin genotipi, büyüme koşulları, ovullerin gelişim aşaması, besiyeri içeriği) etkilemektedir (Murovec ve Bohanec 2012). Örneğin Alan ve diğ. (2007) ginogenesis ile DH soğan üretim başarısının önündeki engellerin; donör bitkinin ginogenesisine verdiği yanıtın düşük olması, başarılı kromozom ikiye katlama prosedürlerinin olmaması ve düşük spontan diploid rejenerasyonu olarak tespit etmişlerdir. Alan ve diğ. (2016) tarafından pırasada yapılan çalışmada 12 farklı besi ortamında kültüre alınan tüm tomurcukların biri dışında tüm besi yerlerinde cevap verdiği görülmüştür. En yüksek ginogenesis cevabı oarnı 2 mg/l diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 2 mg/ l 6-benzyaminopurine ve 75 g/l şeker içeren B5 besi ortamında gözlemlenmiştir. Golabadi ve diğ. (2017) nin yaptığı çalışmada ise döllenenmemiş salatalık ovaryumlarının kullanıldığı deneylerde termal şok ön işlemi, gümüş nitrat, genotip ve hormonal faktörlerin bağımsız ya da aynı anda embriyo ve kallus elde edilmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bazı türlerde ginogenesis ile kısa sürede sağlıklı ve fazla sayıda bitki elde edilebildiği için ginogenik bitkiler önemli ıslah materyalleri olarak kullanılabilir.

1.2 *Allium*ların Genel Özellikleri

*Allium*lar içerisinde 800 den fazla tür bulunduran (Veiskarami ve diğ. 2019) en büyük monokotil cinstir (Stearn 1992). *Allium*lar *Amaryllidacea* 'ya yakın bir familya olan *Alliaceae* familyasında yer almaktadır (Fritsch ve Friesen 2002). Kuzey yarım kürenin ılıman, sıcak ve kuzey bölgeleri boyunca geniş bir dağılıma sahiptir (Brewster 1994). Yüksek tür çeşitliliğine sahip cinsin yayılım alanları Akdeniz havzasından, Orta Asya ve Pakistan'a uzanmaktadır (Fritsch ve Friesen 2002). Bu alanda yer alan Türkiye'deki *Allium* cinsinin yoğun olduğu bölge ise Akdeniz'dir.

Türlerin çoğunluğu kurak, ılımlı ve güneşli yerlerde yetişmektedir. Yazın kuruyan bölgelerin türleri olduğu gibi kışın uyuyan soğuğa adapte olmuş türleri de vardır (Brewster 2008). *Allium* türleri birçok ekolojik nişe (Himalaya ve Orta Asya dağları, Avrupa deniz kıyıları ve nehir kıyılarında çakıllı yerler gibi) uyum sağlamıştır ve bu sebeple büyüme aşamalarında da farklılık göstermektedirler (Fritsch ve Friesen 2002).

En az 20 *Allium* türü (*A. cepa* L. (soğan), *A. sativum* L. (sarımsak), *A. fistulosum* L. (soğan), *A. ampeloprasum* L. (pırasa), *A. schoenoprasum* L. (soğan) gibi) ekonomik açıdan önemli bir yere sahiptir (Wheeler ve diğ. 2013). Yenilebilir *Allium* türlerinde en eski ekili mahsulleri içerenler; soğan, sarımsak, pırasa ve japon soğanıdır (Brewster 2008). Kültür formlarının en önemlileri Orta Asyanın dağlık bölgelerinde yetişen yabancı akrabalarından evrilmişlerdir (Brewster 2008). *Allium*ların yabani türlerinin birçoğunda hastalıklara karşı dirençlik, koku, tat, renk, şekil gibi genlerin bulunması ıslahta da tercih edilir hale getirmiştir.

Allium türleri genellikle çok yıllık ve yumru gövdeli olup tipik soğan ya da sarımsak tadı veren kimyasallar üretirler. Lezzetleri ve aromaları nedeniyle de yiyeceklerde baharat olarak kullanılırlar. Ayrıca pırasa içerdiği kalsiyum, demir, iyot, mineraller ve A, E, K, C vitaminleri bakımından besin değeri yüksek bir bitkidir. *Allium*lar gıda olarak kullanılmasının yanı sıra tıbbi değerleri de tanımlanmış önemli bitki türleridir (Kik 2002). Sarımsak, kardiyovasküler hastalığın önlenmesi ve özel kanser türleri tedavisinde kullanılan önemli bir türdür (Koch ve Lawson 1996). Sarımsak ile ilgili bilimsel araştırmalar 1858 yılında Pasteur'un sarımsak ekstratlarının antibakteriyel özelliklerine dikkat çekmesinden itibaren antibiyotiklerin

keşfedilmesine kadar sarımsak; tifüs, kolera, tüberküloz gibi salgın hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Lanzotti ve diğ. 2013). Farklı pırasa türleri ile yapılan çalışmada ise yeşil yapraklarının beyaz kısmına oranla daha güçlü antioksidan özelliği olduğu tespit edilmiştir (Bernaert ve diğ. 2012). Ayrıca *Alliumlar* Türkiye’de genellikle gıda amaçlı kullanılsalarda dünyada süs bitkisi olarak önemli bir yere sahiptirler.

1.3 *Allium ampeloprasum*’un Özellikleri

A. ampeloprasum *Alliaceae* familyasına ait, ekonomik olarak önemli türlerden biridir (Alan ve diğ. 2016). Türkiye’nin de içinde yer aldığı Akdeniz havzası, Akdeniz adaları, Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya’dan Güney İngiltere’ye uzanan ülkelere yayılış göstermektedir (Guenauoui ve diğ. 2013). Türkiye’de ise Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır. *A.ampeloprasum* ülkemizde sıklıkla tüketilen bir kış sebzesidir. Gıda, baharat ve ilaç olarak önemli bir yere sahiptir. *A. ampeloprasum* dünyanın birçok yerinde yetiştirilip tüketilen bir bitkidir ve zaman içerisinde yeni çeşit ve özellikleri kazandırılmıştır. Dünyada yetiştiriciliği yapılan çeşitlerin çoğunluğu açık tozlanan standart hatlardır. Gelişmiş ülkelerde yüksek verim ve homojen bitkiler elde etmek amacıyla F1 hibrit çeşitleri kullanılmaktadır (Bernaert ve diğ. 2012).

A. ampeloprasum ülkemizde her bölgede yetişse de serin iklimden hoşlanan bir bitkidir. Fakat vegetatif büyüme için uygun sıcaklık yaklaşık 20 °C dir (Bernaert ve diğ. 2012). Bitkiler 2-3 °C de gelişmeye devam etsede 0 °C de gelişim durmaktadır. Her toprakta yetişmekte fakat humusun artması kaliteyi arttırmaktadır. Toprağın pH’ı 6-6.5 olması verimi arttıran diğer özelliklerden biridir. Pırasa ekimi genellikle Mart-Mayıs aylarında yapılmaktadır. Tohumların çimlenmesi ise 10-35 °C’de, ekiminden 10-12 gün sonra gerçekleşmektedir. Yetiştiricilikte birkaç aylık fideler araziye dikilir. Yaz ortasından itibaren hasat edilebilirler. Ülkemizin Akdeniz bölgesinde bitkiler kış boyunca hasat edilebilirler. Çiçeklenme iki yılda gerçekleşir. Çiçek açma dönemleri genellikle Haziran, Temmuz, Ağustos aylarıdır. Tohumlar Eylül ve Ekim aylarında da toplanırlar.

A. ampeloprasum yoğun bir kök yapısına sahiptir. Kökleri sulamaya bağlı olarak 50-60 cm derinliğe inebilmektedir. Yoğun kök yapısının toprağa fazla

tutunması sebebiyle hasat edilirken toprakta kök saçakları kalabilmektedir. Kalan kök kalıntıları toprakta çürüyerek toprağın iyileşmesinde rol oynamaktadır. Gövde, kökler ile aks arasında yer almaktadır ve yapraklar onun üzerinde dizilmişlerdir. Yaprakların çıkış noktaları hep birbirinin içinden olmaktadır (van-der Meer ve Hanelt 1990). En yaşlı yapraklar dış kısımda genç yapraklar ise iç kısımda yer alırlar ve yapraklar boyuna şerit şeklinde olup simetrik gelişim göstermektedirler (Akgün 2018). İki yıllık bir bitkidir. Birinci yılda vejetatif olarak kalmakta ikinci yılda çiçek ve tohum oluşturmaktadır. Çiçekler, aksın orta kısmından ikinci yılın ilkbaharında meydana gelen, iki metre boy alabilen çiçek sapının uç kısmında yer almaktadır. Çiçekler başlangıçta açmamış halde bir zarın içinde bulunmaktadırlar. Çiçek sapının uzamasıyla patlayan zardan çıkan çiçekler beyaz, pembe ve mor renkler arasında değişiklik göstermektedirler. Çiçekleri erselik ve genellikle altılı yapraklardan oluşan tomurcuklarında her karpelde iki tohum taslağı bulunan üç bölme yer almaktadır. Her bir tomurcuktan yaklaşık 1-6 civarı tohum elde edilebilmektedir. Pırasalar, soğan ve sarımsaktan farklı olarak baş üretmezler ve tohumlar alındıktan sonra bitkiler yok olmaktadır (Kaska ve diğ. 2013). Sonbahar döneminde hasat edilip çıkarılan tohumlar siyah, parlak renkli olup soğan tohumlarıyla fazla benzerlik göstermektedirler. Tohumlar çimlenme gücünü 2-3 yıl muhafaza edebilmektedirler.

1.4 *Allium ampeloprasum*'da Haploid Bitki Üretimi

A. ampeloprasum, antik çağda dağılım alanının tetraploid populasyonları sebze ve baharat bitkileri olarak evcilleştirilmiştir (Fritsch ve Friesen 2002). İlerleyen zamanlarda da birçok iklim tipinde ve dünyanın birçok yerinde yetiştirilmek için geliştirilmiştir (Bernaert ve diğ. 2012). Geleneksel açık tozlanan standart çeşitler dünyanın birçok pırasa üretim bölgesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Alan ve diğ. 2016). Bu türde 20. yy'ın ikinci yarısından itibaren yeni çeşitler geliştirilmiş ve tercih edilen özellikler (kısa dayanıklılık, yaprakların dikliği, koyu yaprak rengi gibi) bitkiye kazandırılmıştır (Bernaert ve diğ. 2012).

Günümüzde de tercih edilen bir sebze olduğu için sağlıklı, görünümü güzel ve kısa sürede yetiştirilen bitkileri elde etmek artık gerekli hale gelmiştir. *Allium* türlerinde gerçekleştirilen ginogenesis uygulaması ile ilk haploid bitkilerin üretimi

soğanda gerçekleştirilmiştir (Muren 1989, Campion ve Alloni 1990). Daha sonra ginogenesis uygulaması ile tetraploid *Allium* türleri olan *A. tuberosum* ve *A. ampeloprasum*dan ginogenik bitkiler elde edilmiştir (Keller ve Korzun 1996, Schum ve diğ. 1993).

A. ampeloprasum çok büyük bir genoma (~50 pg DNA/çekirdek) sahiptir (Kaska ve diğ. 2013). Bu türde geliştirilmiş olan ticari çeşitler genellikle tetraploittir ($2n=4x=32$) (Alan ve diğ. 2016). Bu türe ait bitkilerin yüksek oranda heterozigot olması, kendileme depresyonu göstermesi, uzun yaşam döngüsü gibi özellikleri ıslah çalışmalarını zorlaştıran sebepler arasında yer almaktadır. Ginogenesis uygulamasının *A. ampeloprasum* türünde ıslah çalışmalarına entegre edilebilmesi için ginogenesis uyarım protokolünün geliştirilmesi ön koşuldur ve bu tekniğin başarılı şekilde uygulanabilmesi bu türde yeni çeşitlerin geliştirilmesini hızlandırabilir (Alan ve Celebi-Toprak 2016). Farklı protokoller denenerek ginogenik bitki eldesi mümkün olmaktadır. Çelebi-Toprak ve Alan (2016) farklı genotiplerden alınan tüm tomurcuklar değişik miktarlarda sükröz içeren ve içermeyen iki BDS temelli besi ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada sükröz miktarının ginogenesis uyarımında önemli bir role sahip olduğu bulunmuştur. Sükröz içermeye ortamlarda ginogenesis cevabı gözlenmezken, 75 g/l ve daha fazla sükröz içeren ortamlarda kültür başlangıcından yaklaşık üç ay sonra ginogenik bitkicikler elde edilmiştir. Kaska ve diğ. (2013) kültüre koydukları 35000 *A. ampeloprasum* çiçek tomurcuğundan 48 ginogenik bitki üretmişlerdir. Elde edilen bitkilerin çoğunlukla diploid ploidi seviyesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Ginogenik bitkilerin tetraploid olduğu görülmüş ve elde edilen tetraploid bitkiler somatik kökenli ve tohumla üretilen bitkiler ile karşılaştırılmıştır. Tetraploid ginogenik bitkilerin indirgenmemiş yumurta hücreleri veya diploid embriyoların spontan olarak tetraploide dönüşmüş oldukları kesinlik kazanmamıştır. Ginogenik bitkilerin normal bitkiler gibi gelişim gösterdikleri görülmüştür. Diploid ginogenik bitkiler genellikle tetraploidlerden daha yavaş gelişerek daha küçük bitkiler oluşturmuşlardır.

1.5 Ploidi Analizinin Önemi

Bitkilerin kromozom sayılarının tespiti için kullanılan yöntemdir. *In vitro* uyartım sonucu elde edilen ginogenik bitkilerin kromozom sayılarının kesin olarak tespit edilmesi için yapılır. Ploidi analizi farklı yöntemler uygulanarak yapılabilmektedir. Bunlardan bazıları bitkinin kök ucu (Campion ve Alloni 1990, Muren 1989) ya da sürgün ucu hücrelerinde (Campion ve diğ. 1995) kromozom sayımları yapılmasıdır. Diğer bir teknikte ise stoma ve koruyucu hücrelerin çekirdek uzunlukları ölçülür (Keller ve Korzun 1996). Yaprak ve diğer organlardan alınan çekirdeklerin flow sitometri ile analiz edilmesi yolu ile de ploidi tespiti yapılır (Bohanec ve diğ. 1995, Jakse ve diğ. 1996). Bu yöntem diğer tekniklere göre daha hızlı, tahribatsız, farklı dokularda uygulanabilme ve canlı dokudaki DNA miktarının tam oranını yansıtmaya gibi avantajlara sahiptir (Bohanec 2002). Bu teknik ile *A. ampeloprasum* örneklerinin analizinde genellikle 50 mg kadar taze yaprak örneği alınarak bir buz üzerine yerleştirilmiş Petri tabağına konur. Aynı tabağa analizde içsel kontrol olarak kullanılan arpa yaprağı eklenir. Yapraklar çekirdek izolasyon çözeltisi içerisinde ince şeritler halinde kıyılır. Örnek naylon fitreden geçirilerek Eppendorf tüpünde toplanır. Çekirdek örneğine floresan bir boya konduktan sonra örnekler bir flow sitometri aletinde analiz edilir (Alan ve diğ. 2016).

1.6 Polen Canlılığının Önemi

Bitkilerin anthesis aşamasındaki tomurcuklarına yapılan polen canlılık testi bitkiden elde edeceğimiz tohum verimine yönelik önceden bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır (Kaska 2013). Döllenmede dişi üreme hücresi olan yumurtanın sağlıklı olması kadar erkek üreme yapısı olan anterlerde bulunan polenlerin sağlıklı bir gen akışı için yeterli canlılığa sahip olması gerekmektedir.

Dünyadaki çiçekli bitkilerin çoğunluğu doğal yollarla (böcek ve rüzgar gibi) gerçekleşen tozlaşma sonucu döllenmektedir. Böcekler ile tozlanan bitkilerde tozlayıcılar, anterlerde bulunan polenleri toplayarak bir çiçekten diğerine taşırlar. Taşınan polen taneciği başka bir yumurtayı dölleyip olgunlaşmış canlı meyve ürettiğinde bir gen akışı gerçekleşmiş olur. Doğal ortamda gerçekleşen bu tozlaşma ile verimli ürünler elde edilebildiği gibi bunun tersi bir durum olarak mahsulün vahşi bir

türe ya da yabancı populasyonlara istenmeyen gen aktarımları da gerçekleşebilmektedir. Gerçekleşen gen aktarımının farklı türlere ya da yakın türün farklı populasyonlarına transferini azaltmak avantaj sağlamaktadır. Ayrıca tozlaşmada aşırı sıcaklık, UV radyasyon, yüksek bağıl nem, kuru hava gibi dış etmenler polen canlılığını olumsuz etkilemektedir (Brunet ve diğ. 2019). Bu sebeple doğal etkilerin olmadığı ortamda bitkilerin kişiler tarafından bir fırça yardımı ile tozlaşmayı gerçekleştirmesi istenilen gen aktarımının gerçekleşmesini sağlamaktadır. Polen canlılığı bitki türleri arasında ve türlerin çeşitleri arasında da değişkenlik göstermektedir (Stone ve diğ. 1995). Dış etmenlerden etkilenen ya da farklı türlere ait bitkilerin polenlerinin canlılıklarını test etmek bize elde edeceğimiz meyvenin ve tohumun verimi hakkında fikir üretmemizi sağlaması açısından önemli bir yere sahiptir.

1.7 Kromozom Katlamasının Önemi

Kromozom sayısı yarıya inmiş ve saf hale gelmiş bitkilerin ıslah çalışmalarının devamında kullanılabilmesi için tohum üretilebilmesi gerekmektedir. Haploid haldeki bitkinin verimli hale gelmesi kromozom katlaması yapılmalıdır (Alan ve diğ. 2007). Haploid bitkilerin somatik hücrelerindeki kromozom sayısının iki katına çıkartılması ile hem diploid hem de homozigot bir hücre elde edilebilmektedir (Hyde ve diğ. 2012).

Kromozom katlama yöntemi pırasasında içinde yer aldığı birçok bitki türünde uygulanmaktadır. Kromozom katlaması uygulamasında hücre bölünmesinin mitoz aşamasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen kimyasallar kullanılır. Mitoz bölünmenin interfaz aşamasında kalıtım materyali olan kromozomlar duplike olur ve sayısı iki katına çıkar. Sayısı iki katına çıkan kromozomlar metafaz aşamasında iken kullanılan kimyasal ile bu aşamada durdurulur ve kromozomlar kutuplara ayrılıp çekilemezler. Böylece kromozom sayısı iki katına çıkmaktadır. Katlanmış haploid tekniğinde antimitotik amiprofos-methyl (APM), orizalin, kafein, kloral hidrat, asenaften, 2-hydroxynicotinic asit, pronamid, kolçisin gibi kimyasallar ile çalışılmıştır (Bouvier ve diğ. 1994). Kolçisin en yaygın olarak kullanılan kromozom katlama ajanıdır (Hansen ve Anderson 1998).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (PAÜ BİYOM) yürütülmüştür. Çalışma, 2016 ve 2017 yıllarında elde edilen *A. ampeloprasum* (Görle-Karacasu, İnegöl, Kartal Kalem, Tarsus Kısa, Tarsus Orta ve Tarsus Uzun) materyalleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller ginogenik, somatik ve tohumdan üretilmiş bitkilerdir. Diploid seviyeden tetraploid seviyeye dönüştürme amacıyla yapılan kolçisin uygulamasından elde edil ve spontan olarak tetraploid seviyeye dönüştürülmüş olan bitkilerde çalışmaya dahil edilmiştir.

2.2 Ginogenik ve Somatik Uyartıma Cevap Veren Bitkilerde Ploidi Analizi

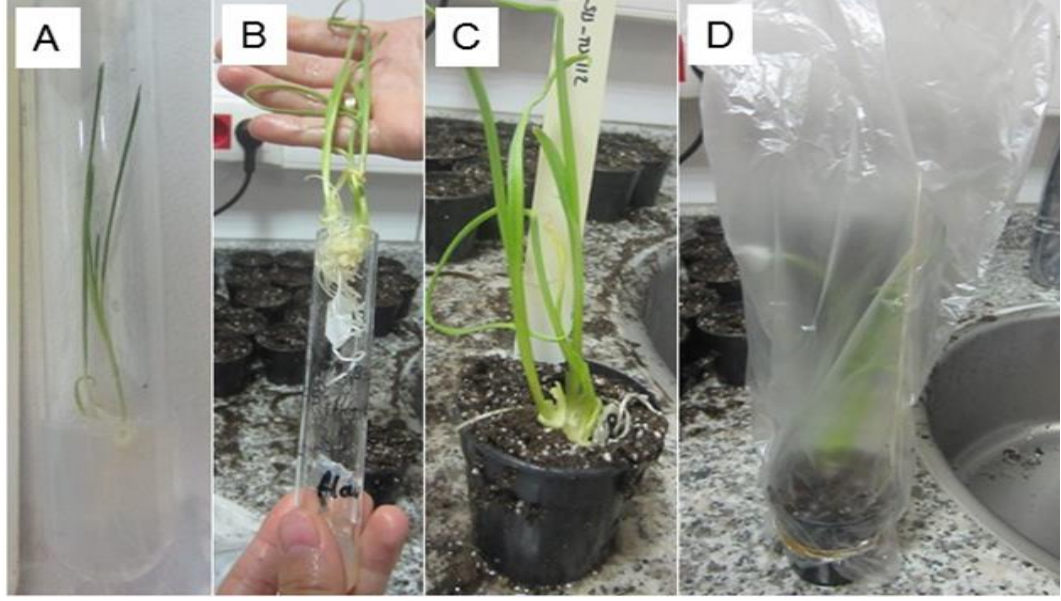
A. ampeloprasum materyallerinde ploidi seviyesi belirleme işlemi Alan ve diğ. (2016) tarafından rapor edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu bitkilerden ~50 mg yaprak örneği alınarak ıslak buz kutusunda bulunan Petri tabaklarına yerleştirilmiştir (Şekil 1 A). Bu örnekler yeni çimlendirilmiş olan arpa (içsel kontrol) fidelerinden alınan ~10 mg yaprak eklenmiştir. Yaprak örneklerinin içinde bulunduğu Petri tabağına 1,5 ml NIB (çekirdek izolasyon tamponu) eklenmiş ve ve yapraklar bir jilet yardımıyla ince şeritler halinde kesilmiştir (Şekil 1 B-C). Örnekler 45 µm açıklığa sahip naylon fitrelerden geçirilerek Eppendorf tüplerinde toplanmışlardır (Şekil 1 D-E). Hazırlanan örnekler DNA ların zarar görmemesi için buzda bekletilmiştir (Şekil 1 F). Örnek tüplerine 1 mg/ml olarak hazırlanmış olan propidium iodide (PI) stok çözeltisinden 10 µl eklenmiş ve vortekslenerek flow sitometri (Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer) ile analiz edilmiştir (Şekil 1 G-H).



Şekil 1: A. *ampeloprasum* bitkilerinin flow sitometri ile ploidi analizi. **A.** Analiz için alınmış A. *ampeloprasum* ve arpa yaprakları. **B.** Eklenen NIB tampon çözeltisi. **C.** Örneğin jilet yardımıyla parçalanması. **D.** Hazırlanan preparatın pipet ile alınması. **E.** Örneğin filtreden süzülmesi. **F.** Örneğin buzda tutulması. **G.** PI ile boyanan örneğin vortekslenmesi. **H.** Örneğin flow sitometri cihazına yerleştirilmesi ve DNA miktarının analizi.

2.3 Bitkilerin Toprağa Aktarımı ve *İn Vivo*'ya Alıştırılması

Ploidi seviyesi tetraploid ginogenik bitkilerin olanların tamamı ve diploid olanların ise bir kısmı aklimize edilerek dış ortamda büyütülmüştür. Ploidi analizi gerçekleştirilen ve doku kültüründe sağlıklı büyüyen bitkiler cam tüplerden dikkatli bir şekilde çıkarılarak köklerindeki medya kalıntıları musluk suyuyla yıkanmıştır (Şekil 2 B). Bitkiler otoklavlanmış ve steril su ile ıslatılmış torf-perlit (2:1) karışımı içeren saksılara (100 ml) dikilmiş ve naylon poşet ile kapatılmıştır (Şekil 2 C-D). Ekimi tamamlanan bitkiler büyütme kabinine (16 saat ışık/ 17 °C) yerleştirilerek gözlemlenmeye devam edilmiştir. Belli aralıklarla otoklavlanmış gübreli su ile sulaması gerçekleştirilen bitkilerin poşetleri yaklaşık 10 gün sonra dışarıya uyumu kolaylaştırmak için jilet ile biraz yırtılmıştır. 15 gün sonra da poşetler tamamen çıkarılmıştır. Yeterli büyüklüğe ulaşan bitkiler daha büyük saksılara aktararak ısıtmasız cam seraya yerleştirilmiştir. Gözlemleri yapılmak üzere *in vivo* da büyümeleri takip edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2: Ginogenik *A. ampeloprasum*'ların toprağa aktarım aşamaları. **A.**Tüp içerisinde belli bir büyüklüğe ulaşmış ginogenik tetraploid bitki. **B.** Tüp içerisinde çıkarılan ginogenik *A. ampeloprasum*. **C.** Toprağa aktarımı gerçekleştirilmiş ginogenik *A. ampeloprasum*. **D.** Toprağa aktarım sonrası dış ortama uyum için poşetle kapatılmış bitki.

2.4 Bitkilerde Gerçekleştirilen Gözlemler

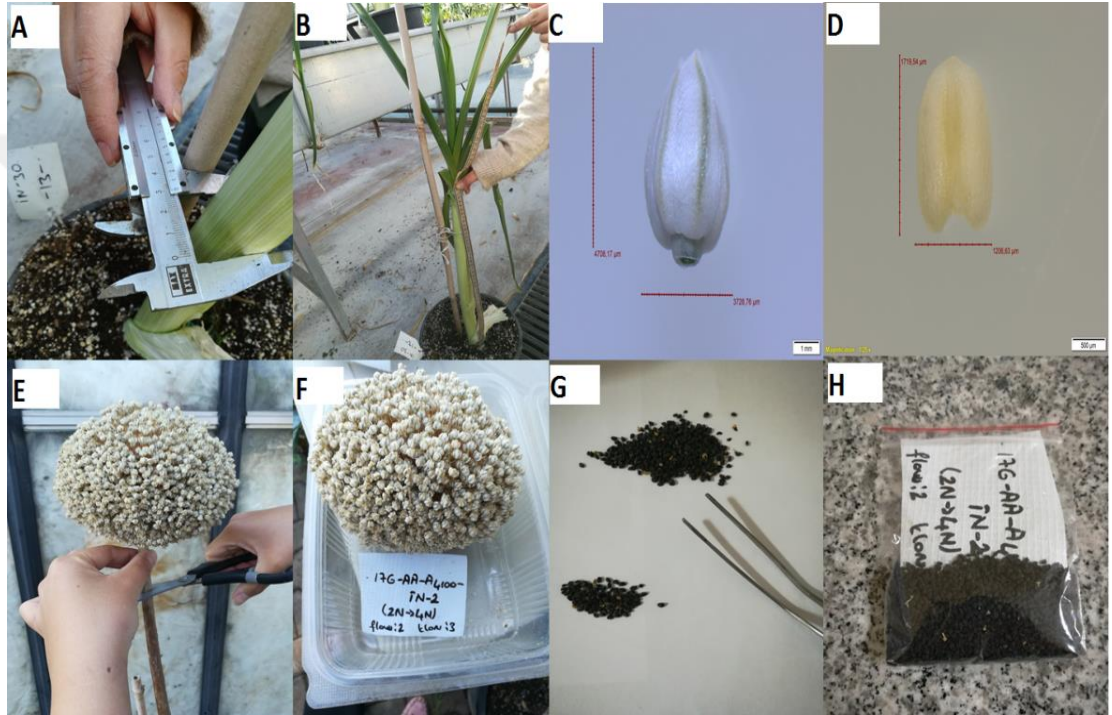
2.4.1 Ginogenik, Somatik ve Donör Bitkilerde Morfolojik ve Tohum Verimi Gözlemleri

Büyüme son aşamaya gelmiş, umbelleri tohum oluşturmaya başlamış olan bitkilerin her birinin gövde boyu, tam bitki boyu ve bitkinin en iyi gelişmiş olan yaprağının boyu ve çapı ölçülmüştür. Çiçek sapı oluşturan bitkilerin de çiçek sapı uzunluğu ve çapı ölçülerek çiçek renkleri gözlemlenmiştir. Bitkinin gövde çapı ve çiçek sap çapı ise kumpas yardımı ile bitkinin boyu da metre yardımı ile ölçülmüş ve kaydedilmiştir (Şekil 3 A-B).

Sağlıklı bir şekilde büyümeye devam eden beş pırasa hattının herbirine ait ginogenik, somatik ve tohumdan olan bitkilerinden çiçek tomurcukları ve çiçeklerindeki anter büyüklükleri mikroskop altında ölçülmüştür. Tomurcuklar kullanmış olduğumuz Cell Sens Entry programında mikro (μm) olarak ölçülmüş ve boy, çap uzunlukları kaydedilmiştir. Daha sonra tomurcuklar mikroskopta pens

yardımla açılarak anterleri dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve anter boy, çap uzunluğu da aynı program yardımıyla ölçülmüş ve kaydedilmiştir (Şekil 3 C-D).

İlerleyen süreçte çiçekleri kuruyan bitkilerin umbelleri kesilerek tamamen kuruyana kadar serada bekletilmiştir. Daha sonra her bir umbelin tohumları dikkatli bir şekilde çıkarılarak sayılmıştır. Her bir bitki için etiketi yazılan tohumlar ayrı ayrı poşetlenmiştir (Şekil 3 E-H).

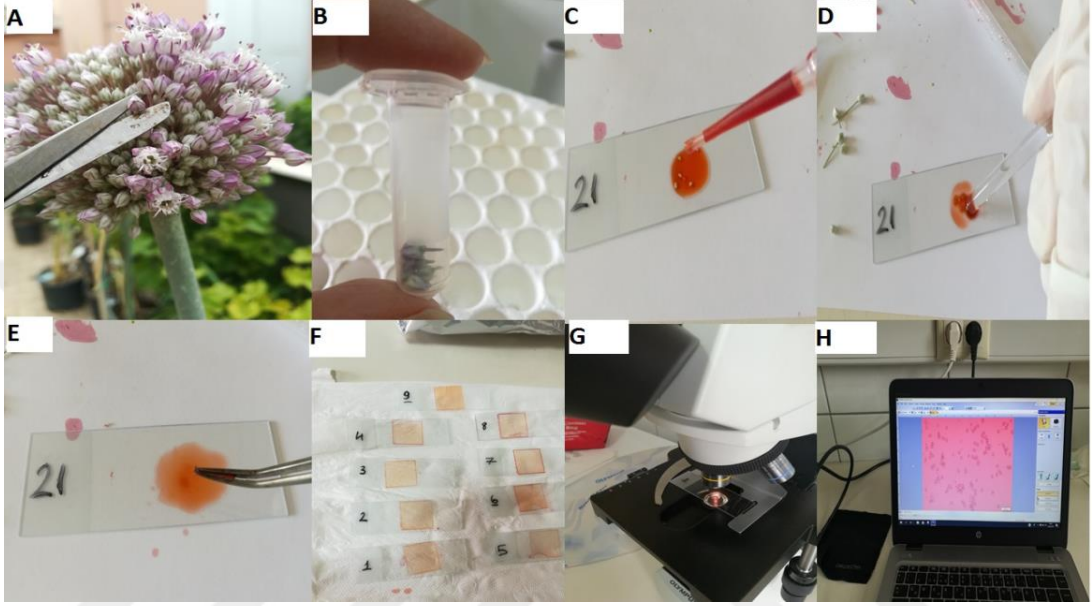


Şekil 3: A. *ampeloprasmus* materyallerinin gövde, boy ve tomurcuk uzunluk, çap ölçümleri ve tohum sayılarının belirlenmesi. A. A. *ampeloprasmusun* gövde çap ölçümü. B. Bitkinin uzunluk ölçümü. C. A. *ampeloprasmus* tomurcuk boy çap ölçümü. D. Anter boy ve çap uzunluk ölçümü. E. Umbellerin kesilmesi. F. Kesilen umbellerin yeterince kuruması için bekletilmesi. G. Umbelden çıkarılan tohumların sayılması. H. Sayılan tohumların poşetlenmesi.

2.4.2 Polen Canlılık Testi

Umbel oluşturan her bir bitkinin antesis aşamasına gelmiş tomurcuklarından üçer tane alınmış ve tomurcuklar açılarak çıkarılan anterler lam üzerine koyulmuştur. Daha sonra anterler üzerine bir iki damla Asetokarmin (mg/ml) damlatılarak cam baget yardımıyla anterler ezilmiştir (Şekil 4 A-D). Asetokarminin polene ulaşip çekirdeğe tutunması için gerçekleştirilen bu işlemde sonra preparatta oluşan kalıntılar daha iyi

görüntü elde edebilmek için pens ile alınmıştır. Daha sonra preparatın üzeri lamel ile kapatılarak ışık mikroskobu altında (40X) polenler sayılmıştır (Şekil 4 G-H). Boyanmış olan polenler canlı boyanmamış olanlar ise ölü kabul edilerek her bir bitkinin polen canlılık yüzdesi hesaplanmıştır.



Şekil 4: *A. ampeloprasum* materyallerinde polen canlılık analizi. **A.** *A. ampeloprasum* da antesis aşamısına gelmiş tomurcukların kesilmesi. **B.** Kesilen tomurcukların karışmaması için tüplere alınması. **C.** Çıkarılan anterlere Asetokarmin damlatılması. **D.** Asetokarmin damlatılan örneğin cam baget yardımıyla parçalanması. **E.** Ezilen preparatta tortuların pens yardımıyla alınması. **F.** Örneğin lamel ile kapatılıp kuruması için bekletilmesi. **G.** Örneğin mikroskoba yerleştirilip incelenmesi. **H.** Elde edilen görüntüde canlı polen sayısının belirlenmesi.

3. BULGULAR

3.1 Ginogenik *A. ampeloprasum* Bitkilerinin Ploidi Analizleri

Bu çalışmaya konu olan materyallerin çoğunluğu beş çiçek donöründen 2016 yılında üretilmiş olan ginogenik bitkilerdir. Bir sonraki yıl sadece İnegöl genotipinden üretilmiş olan bitkiler çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkilerden 793 adeti flow sitometri ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları ginogenik bitkilerin çoğunlukla (% 85) tetraploid (4n) olduğunu göstermiştir. Geriye kalan ginogenik bitkiler arasında % 9,7 diploid (2n), % 1,5 diploid ve tetraploid için miksoploid (2n+4n) ve % 3,8 oktoploid bitkiler tespit edilmiştir (Tablo 1). Tarsus Uzun donöründen elde edilen ginogenik bitkilerin çoğunlukla (% 93,2) tetraploid olduğu görülmüştür. Bu donörden elde edilen bitkilerin % 2,1 diploid, % 0,4 miksoploid ve % 4,2 oktoploid olduğu tespit edilmiştir. Tarsus Kısa genotipinden elde edilen ginogenik bitkilerin çoğunluğu (% 72,5) diploid olduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında % 19,4 tetraploid ve % 8,1 miksoploid bitkilerin olduğu görülmüştür. Analiz sonucuna göre Tarsus Orta donöründen elde edilen ginogenik bitkilerinde çoğunlukla (% 75) diploid bulunmuştur. Diğer bitkilerin % 6,3 tetraploid, % 12,5 miksoploid ve % 6,3 oktoploid olduğu belirlenmiştir. Görle-Karacasu donör materyalinden elde edilen bitkilerin % 80 tetraploid, % 12 diploid, % 8 miksoploid oldukları görülmüştür. İnegöl donöründen elde edilen ginogenik bitkilerin % 70 tetraploid ve % 30 diploid olduğu bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1: Farklı *A. ampeloprasum* tomurcuk donörlerinden 2016 ve 2017 yıllarında elde edilen ginogenik bitkilerin ploidi seviyeleri

Genotip	Test edilen bitki sayısı	Ploidi Düzeyi			
		2n (%)	4n (%)	2n+4n (%)	8n (%)
^a Tarsus Uzun	680	14 (2,1)	634 (93,2)	3 (0,4)	29 (4,2)
^a Tarsus Kısa	62	45 (72,5)	12 (19,4)	5 (8,1)	0 (0)
^a Tarsus Orta	16	12 (75)	1 (6,3)	2 (12,5)	1 (6,3)
^a Görle-Karacasu	25	3 (12)	20 (80)	2 (8)	0
^b İnegöl	10	3 (30)	7 (70)	0	0
Toplam	793	77 (9,7)	674 (85)	2 (1,5)	30 (3,8)

^a2016 kültürlerinden elde edilen ginogenik bitkiler

^b2017 kültürlerinden elde edilen ginogenik bitkiler

Birkaç yapraklı aşamada gerçekleştirilen flow sitometri analizi ile diploid oldukları tespit edilmiş olan bitkilerin bazılarının serada büyütülmeleri sırasında tetraploidler gibi güçlü geliştireklere görülmüştür. Bunun üzerine bu bitkilerin yeniden analiz edilmesine karar verilmiştir. Yapılan analizde bu bitkilerin çoğunlukla (% 71,4) tetraploid seviyesine ulaşmış oldukları görülmüştür. Bu bitkiler arasında % 17,8 miksoploid, % 3,6 diploid, % 3,6 hekzaploid ve % 3,6 oktoploid olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Analiz sonuçları Tarsus Uzun donöründen elde edilmiş olan bir bitki dışında tüm bitkilerin ploidi seviyelerinin değiştiğini göstermiştir (Tablo 2).

Tablo 2: *In vivo* ya aktarılmış diploid ginogenik bitkilerde ploidi tespiti.

Genotip	Ploidi	Test edilen bitki sayısı	Toprağa Aktarım Sonrası Ploidi				
			2n (%)	4n (%)	2n+4n (%)	6n (%)	4n+8n (%)
^a Tarsus Uzun	2n	5	1 (20)	2 (40)	1 (20)	0	1(20)
^a Tarsus Kısa	2n	16	0	14 (87,5)	1 (6,25)	1(6,25)	0
^a Tarsus Orta	2n	2	0	1 (50)	1 (50)	0	0
^a Görle-Karacasu	2n	2	0	0	2 (100)	0	0
^b İnegöl	2n	3	0	3 (100)	0	0	0
Toplam		28	1 (3,6)	20 (71,4)	5 (17,8)	1 (3,6)	1 (3,6)

^a2016 kültürlerinden elde edilen ginogenik bitkiler

^b2017 kültürlerinden elde edilen ginogenik bitkiler

3.2 Ginogenesis Uyartımına Cevap Veren Bitkilerin Boy, Çap Ölçümleri

2018 yılında Tarsus Uzun, Tarsus Kısa, Tarsus Orta, Kartal Kalem, Görle-Karacasu ve İnegöl hatlarının ölçümleri yapılmıştır. Tarsus Uzun hattına ait ginogenik olarak elde edilmiş diploid ve tetraploid hücreler için miksoptoid ($2n+4n$), tetraploid ($4n$) ve oktoploid ($8n$) bitkilerin tam bitki boyu, gövde boyu ve çapı ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda ginogenik miksoptoidi olarak büyütülen bitkinin gövde (32 cm) ve tam bitki boyu (74 cm) ginogenik tetraploid (gövde boy 27,4 cm ve tam boy 64, 4 cm) ve ginogenik oktoploid (gövde boy 27, 25 cm ve tam boy 60 cm) olan bitkilerden daha uzundur. Ginogenik bitkilerin gövde çapı diğer bitkilerden daha küçüktür (Tablo 3). Bu hata ait ginogenik tetraploid bitkiler oktoploid üretilenler ile karşılaştırıldığında boy ve çap büyüklükleri birbirine yakın değerlerdedir. Ginogenik tetraploid olan bitkiler (gövde boy 27,4 cm ve gövde çap 11 mm) somatik (gövde boy 30,7 cm ve gövde çap 17,2 mm) ve tohumdan (gövde boy 38 cm ve gövde çap 17 mm) olan bitkilere göre daha küçük gövde boy ve çapına sahiptirler. Fakat tam boy olarak ginogenik tetraploidler (64,4 cm), somatik (30,7 cm) ve tohumdan (58 cm) üretilenlere göre daha uzunlardır (Tablo 3). Somatik ve tohumdan üretilen bitkiler büyüklük olarak birbirine yakın olsalar da tohumdan üretilenler somatiklere göre daha gelişmişlerdir (Tablo 3).

Ginogenik diploid Tarsus Kısa bitkisinin gövde (19 cm) ve tam boy (63 cm) uzunluğu açısından ginogenik tetraploid (gövde boy 34 cm ve tam boy 67 cm), somatik (gövde boy 30 cm, tam boy 64 cm) ve tohumdan (gövde boy 32 cm ve tam boy 75 cm) üretilen bitkilere göre oldukça küçük olarak geliştiği gösterilmiştir (Tablo 3). Ginogenik tetraploid ve somatik bitkiler gövde ve tam boy ölçümleri karşılaştırıldığında ginogenik tetraploidlerin daha iyi gelişim gösterdikleri görülmüştür (Tablo 3). Tam boy ve gövde çapı (tam boy 75 cm gövde çapı 14 mm) olarak en gelişmiş bitkilerin tohumdan üretilenler olduğu gözlemlenmiştir. Gövde uzunluğu olarak en uzun bitkilerin ise ginogenik tetraploidlerden (34 cm) geldiği gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Tarsus Orta hattına ait somatik olarak üretilen bitkiler yaşamamıştır. Ölçümü gerçekleştirilen ginogenik tetraploid ve tohumdan bitkiler karşılaştırıldığında tüm

ölçümler (gövde boy 20,8 cm, tom boy 64,6 cm ve gövde çap 18,7 mm) bakımından tohumdan üretilen bitkilerin ginogenik tetraploid bitkilerden (gövde boy 11 cm, tam boy 32 cm ve gövde çap 11,2 mm) daha iyi gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Kartal Kalem hattında en büyük gövde çapına (32 mm) sahip bitkiler somatik olanlardır. Tohumdan elde edilen bitkiler de gövde boy ve tam boy (gövde boy 40 cm ve tam boy 108,9 cm) olarak en büyük değerlere sahiptirler (Tablo 3).

Görle Karacasu hattına ait ginogenik miksoploid bitkinin tüm ölçümler (gövde boy 45cm, tam boy 59 cm ve gövde çapı 15,4 mm) bakımından en küçük olduğu gözlemlenmiştir. Tam boy uzunluğu ve çap büyüklüğü bakımından bitkiler karşılaştırıldığında tohumdan (tam boy 130 cm ve gövde çap 28,01 mm) üretilen bitkilerin en iyi performans gösterdiği görülmüştür. Gövde uzunluğu açısından bitkiler karşılaştırıldığında ise en uzun bitkilerin ginogenik tetraploid bitkilerden (51 cm) üretildiği bulunmuştur (Tablo 3).

İnegöl hattında diploid ginogenik, somatik ve tohumdan üretilen bitkilerin ölçümleri yapılmıştır. Diploid bitkinin tüm ölçümler bakımından en küçük olduğu gösterilmiştir (gövde boy 12 cm, tam boy 26 cm ve gövde çap 10,02 mm) (Tablo 3). Somatik bitkilerin gövde uzunluğu (38,5 cm) en büyük olsada tam boy ve gövde çapı (tam boy 95 cm ve gövde çap 16,63 mm) olarak somatik bitkiler, tohumdan (tam boy 111 cm, gövde çap 26 mm) olan bitkilerden daha küçüklerdir (Tablo 3).

Tüm hatların bitki ölçümlerine (gövde uzunluğu, tam boy ve gövde çap) bakıldığından en büyük bitkilerin Görle Karacasu hattına ait olduğu görülmüştür. (Tablo 3). Tetraploid olarak elde edilen ginogenik bitkiler genellikle somatik ve tohumdan olan bitkilere yakın seviyelerde çıksada Tarsus Ortaya ait ginogenik tetraploid bitkiler tüm ölçümler bakımından diğer ginogenik tetraploid ve diploid bitkilerden daha küçük boyutlarda olduğu gösterilmiştir (Tablo 3). Tüm hatlardan elde edilen ginogenik diploid bitkiler karşılaştırıldığında Tarsus Kısa ya ait ginogenik diploid bitkilerin en iyi şekilde gelişim gösterdiği görülmüştür (gövde boy 19 cm, tam boy 63 cm ve gövde çap 12,2 mm) ve bu bitkiler bazı hatlara ait somatik ve tohumdan olan bitkilerden de daha iyi geliştikleri gösterilmiştir (Tablo 3). Somatik bitkilerin tüm ölçümler bakımından en büyük olanı Kartal Kalem hattına aittir (gövde boy 38,7 cm,

tam boy 100 cm ve gövde çap 32 mm). Tohumdan olan bitkilere bakıldığında ise tüm ölçümler (gövde boy 46 cm, tam boy 130 cm ve gövde çap 28,01 mm) bakımından en iyi gelişim gösteren hattın Görle-Karacasu olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: 2016 kültürlerinden elde edilen *A.ampeloprasum* bitkilerinin 2018 yılı ölçümleri

Genotip	Ginogenik /somatik/ tohumdan	Ploidi	Ölçülen bitki sayısı	Yalancı gövde boyu (cm)	Tam bitki boyu (cm)	Yalancı Gövde çapı (mm)
Tarsus Uzun	Ginogenik	2n+4n	1	32	74	6,55
	Ginogenik	4n	283	27,4 (±10,5)	64,4 (±21,8)	11 (±3,3)
	Ginogenik	8n	8	27,25 (±5,8)	60 (±17,6)	10,3 (±2,2)
	Somatik	4n	23	30,7 (±17,9)	30,7 (17,9)	17,2 (±7,1)
	Tohumdan	4n	8	38 (±12,2)	58 (±32,2)	17 (±5,6)
Tarsus Kısa	Ginogenik	2n	13	19 (±3,6)	63 (±17,8)	12,2 (±2,8)
	Ginogenik	4n	6	34 (±7,6)	67 (±10,2)	10,25 (±3,8)
	Somatik	4n	6	30 (±8,4)	64 (±9,2)	10,8 (±2,2)
	Tohumdan	4n	29	32,4 (±15,3)	75 (±20)	14 (±4,1)
Tarsus Orta	Ginogenik	4n	2	11 (±1,4)	32 (±5,7)	11,2 (±2,2)
	Tohumdan	4n	5	20,8 (±4,0)	64,6 (±22,3)	18,7 (±6,0)
Kartal Kalem	Ginogenik	4n	4	32,7 (±6,8)	100,2 (±4,7)	27,3 (±3,0)
	Somatik	4n	3	38,7 (±5,5)	100 (±10,7)	32 (±5,3)
	Tohumdan	4n	9	40 (±6,5)	108,9 (±15,7)	28 (±4,5)
Görle-Karacasu	Ginogenik	2n+4n	1	45	59	15,41
	Ginogenik	4n	3	51 (±10,0)	122 (±13,4)	25,8 (±1,1)
	Tohumdan	4n	7	46 (±8,6)	130 (±18,0)	28,01 (±2,8)
İnegöl	Ginogenik	2n	1	12	26	10,02
	Somatik	4n	4	38,5 (±9,7)	95 (±18,5)	16,63 (±7,7)
	Tohumdan	4n	14	37 (±7,7)	111 (±13,2)	26 (±4,7)

2019 yılına ait ölçümler Tarsus Uzun, Tarsus Kısa ve İnegöl hatlarına ait yaklaşık 56 bitkiyi kapsamaktadır. Tarsus Uzun hattına ait bitkilerin ginogenik tetraploid, somatik ve tohumdan üretilen bitkiler karşılaştırıldığında yaprak boyu hariç tüm ölçümler (gövde boyu 27 cm, tam boy 68 cm, gövde çap 7,3 mm, yaprak çap 1,3 mm, çiçek sap uzunluğu 31 cm, çiçek sap çapı 6,1 mm) bakımından en küçük boyutlara sahip olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4). Yaprak boyu olarak ise tohumdan üretilen bitkiler ile aynı büyüklükte dirler (40 cm) (Tablo 4). Tohumdan bitkiler ve somatik bitkilere bakıldığında tohumdan bitkilerin gövde boyları (65 cm) en uzun olsada, tam boy (107 cm) olarak en uzun bitkilerin somatik bitkilerden geliştiği gözlemlenmiştir.

Yaprakları ve çiçek sapı açısından bitkiler karşılaştırıldığında en iyi gelişimi somatik olanlar göstermiştir (Tablo 4).

Tarsus Kısa hattında ginogenik hekzaploid ve tetraploid, somatik ve tohumdan üretilen bitkiler tüm ölçümler (gövde boy 26 cm, tam boy 47cm, gövde çap 14,09 mm, yaprak çap 2 mm, yaprak boy 33 cm, çiçek sap 52 cm, çiçek sap çap 9,4 mm) bakımından karşılaştırıldığında hekzaploid bitkinin en küçük olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4). Bu hatta ait bitkilerden somatik bitkiler yaprak büyüklüğü ve çiçek sap ve çap büyüklüğü hariç tüm ölçümler (gövde boy 45 cm, tam boy 110 cm, gövde çap 21,5 mm, çiçek sap uzunluğu 85 cm) bakımından en büyük bitki olarak bulunmuştur (Tablo 4). Yaprak büyüklüğü ve çiçek sap ve çapı (yaprak çap 3,1 mm, yaprak boy 58 cm çiçek sap çapı 13,4 mm) bakımından en gelişmiş olanlar ise ginogenik tetraploid bitkilerdir (Tablo 4). Tohumdan olan bitkiler çiçek sap ve çapı hariç tüm ölçümler bakımından somatik ve ginogenik tetraploid bitkilerden daha küçük boyutlara sahip oldukları gösterilmiştir (Tablo 4).

İnegöl hattına ait bitkilerin ölçümlerine (gövde boy, tam boy ve yaprak boy uzunluğu) bakıldığında en büyük olarak gelişen bitkilerin tohumdan (gövde boy 93 cm, tam boy 175 cm, yaprak boy 92 cm) üretilenler olduğu gözlemlenmiştir. (Tablo 4). Gövde çapı en kalın olan ve yaprak çapı en büyük olanlar bitkiler ise ginogenik tetraploidlerden üretilen bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Çiçek sap gelişmişliği olarak en büyük olan bitkiler ise somatikler olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4) (Şekil 5).

Ölçümü gerçekleştirilen hatların tümüne bakıldığında İnegöl hattına ait ginogenik tetraploid bitkiler tüm ölçümler bakımından en büyük bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Bu bitkiler sadece diğer hatların ginogenik tetraploid olanlarından değil Tarsus Uzun ve Tarsus Kısa hatlarına ait olan somatik ve tohumdan bitkilerinde çiçek sap uzunluğu hariç tüm ölçümler bakımından en iyi gelişen bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Çiçek sap uzunluğu en fazla olan bitkiler ise Tarsus Kısa hattına ait somatik bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Bitki gövde ve tam boy uzunluğu olarak en kısa bitki Tarsus Kısa hattına ait ginogenik hekzaploid bitkidir. En uzun bitki ise İnegöl hattına ait tohumdan elde edilen bitkiler olduğu gösterilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: 2016 ve 2017 yılı kültürlerinden elde edilen *A. ampeloprasum* materyallerinde 2019 yılında yapılan morfolojik gözlemler

Genotip	Ginogenik/ Somatik/ Tohumdan	Ploidi	Ölçülen bitki sayısı	Yalancı Gövde boyu (cm)	Tam bitki boyu (cm)	Yalancı gövde çapı (mm)	Yaprak çapı (cm)	Yaprak boyu (cm)	Çiçek sap uzunluğu (cm)	Çiçek sap çapı (mm)
Tarsus Uzun	Ginogenik	4n	38	27 (\pm 13,0)	68 (\pm 21,3)	7,3 (\pm 3,0)	1,3 (\pm 0,5)	40 (\pm 14,2)	31 (\pm 10,3)	6,1 (\pm 1,7)
	Somatik	4n	3	39 (\pm 12,2)	107 (\pm 5,6)	18 (\pm 2,9)	3 (\pm 0,1)	74 (\pm 5,1)	71 (\pm 4,0)	11 (\pm 6,2)
	Tohumdan	4n	2	65 (\pm 23,3)	106 (\pm 22,0)	20 (\pm 6,8)	2,8 (\pm 1,1)	40 (\pm 31,1)	52 (\pm 10,7)	18 (\pm 1,5)
Tarsus Kısa	Ginogenik	4n	3	34,3 (\pm 12,1)	86,3 (\pm 17,0)	17,9 (\pm 2,7)	3,1 (\pm 1,0)	58 (\pm 10,6)	79 (\pm 30,2)	13,4 (\pm 1,4)
	Ginogenik	6n	1	26	47	14,09	2	33	52	9,4
	Somatik	4n	1	45	110	21,5	2,2	50	85	9,68
	Tohumdan	4n	3	32 (\pm 20,3)	72,7 (\pm 35,2)	16,3 (\pm 10,1)	2,3 (\pm 1,2)	44 (\pm 17,1)	66,5 (\pm 2,1)	13,1 (\pm 6,4)
İnegöl	Ginogenik	4n	3	67,3 (\pm 3,1)	147 (\pm 7,6)	36,8 (\pm 0,5)	5 (\pm 0,2)	83,3 (\pm 3,1)	69,3 (\pm 2,6)	17,4 (\pm 0,3)
	Somatik	4n	1	84	150	31,2	4,3	64	80	17,7
	Tohumdan	4n	1	93	175	35,86	4,8	92	48	12,6

3.3 Ginogenik *A. ampeloprasum* Materyallerinde Tomurcuk ve Anter Büyüklükleri

2019 yılında yapılan gözlemlerde bitkilerin tomurcuk ve anter büyüklükleri de karşılaştırılmıştır. Tarsus Uzun hattına ait olan bitkiler karşılaştırıldığında tomurcuk boy ve çapı (tomurcuk boy 4,7 mm, tomurcuk çap 3,7 mm) en büyük olan bitkilerin tohumdan üretilenler olduğu gözlemlenmiştir. Tetraploid ginogenik bitkinin tomurcuk boyu büyüklüğü (4,4 mm) somatik bitkinin tomurcuk boyu (4,4 mm) ile aynı olduğu gözlemlenmiştir. Tomurcuk çapı (3,1 mm) en küçük olan Tarsus Uzun hattının ise somatik bitkisidir (Tablo 5). Bu hata ait bitkilerin anter büyüklüklerine bakıldığında anter boy ve çapı (anter boy 1,2 mm, anter çap 0,8 mm) en küçük olan bitki tetraploid ginogenik olarak gözlemlenmiştir. Somatik ve tohumdan olan bitkilerin anter boy ve çapları eşit büyüklükte (anter boy 1,3 mm, anter çap 0,9 mm) olduğu gösterilmiştir (Tablo 5).

Tarsus Kısa hattına ait bitkilerde tomurcuk boy, çap ve anter boy, çap (tomurcuk boy 4,1 mm, tomurcuk çap 3,3 mm, anter boy 1,3 mm, anter çap 0,8 mm) büyüklükleri bakımından karşılaştırıldığında en küçük bitkilerin tohumdan üretilenler olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 5). Tomurcuk boy ve çapı (tomurcuk boy 5,5 mm, tomurcuk çap 4,2 mm) en büyük olan tetraploid ginogenik bitkiler olduğu gösterilmiştir. Anter boy ve çap (anter boy 1,9 mm, anter çap 1,4 mm) olarak en büyük olan bitkilerin ise hekzaploid ginogenik olanlar olduğu bulunmuştur (Tablo 5). Bu hatta ait somatik bitki ise tomurcuk boy, anter boy ve anter çap olarak ginogenik tetraploid ve hekzaploid bitkilerden daha küçük boyutlarda olduğu gösterilmiştir, tohumdan gelişen bitkiler ile karşılaştırıldığında da tüm ölçümler bakımından daha büyük olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 5).

İnegöl hattına ait bitkiler tomurcuk boy ve çap açısından karşılaştırıldığında en küçük bitkilerin somatik (tomurcuk boy 4,4 mm, tomurcuk çap 3,3 mm) olanlar olduğu bulunmuştur (Tablo 5). Tomurcuk boyu en uzun olan bitkilerin tohumdan (4,6 mm) üretilenler olduğu gözlemlenmiştir. Ginogenik tetraploid ve tohumdan olan bitkilerin tomurcuk çaplarının (3,5 mm) aynı büyüklükte olduğu gözlemlenmiştir. Anter boy ve çap büyüklüklerine bakıldığında en küçük antere sahip bitkilerin tohumdan (anter boy

1,4 mm, anter çap 0,9 mm) çimlendirilenler olduğu gösterilmiştir. Anter boyu en uzun olan bitki somatik (1,7 mm, anter çapı en geniş olan da ginogenik tetraploid (1,8 mm) bitkiler olduğu gösterilmiştir (Tablo 5).

Ölçümü gerçekleştirilen hatların üçüne bakıldığında tomurcuk boyu olarak en büyük bitki Tarsus Kısa'ya (5,5 mm) ait ginogenik tetraploid bitkiler olduğu gösterilmiştir. Tomurcuk boyu en kısa bitki ise Tarsus Kısaya (4,1 mm) ait tohumdan üretilen bitkilerde gözlemlenmiştir. Anter büyüklüğü olarak bakıldığında anter boyu en uzun olan bitki de Tarsus Kısaya ait ginogenik hekzaploid (1,9 mm) bitkilerde gözlemlenmiştir. En kısa anter boyuna sahi bitki de Tarsus Uzuna ait ginogenik tetraploid bitki (1,2 mm)'ler olduğu gösterilmiştir. Anter çapı ve tomurcuk çap değerlerine bakıldığında en geniş çapa sahip tomurcuk Tarsus Kısaya ait ginogenik tetraploid (4,2 mm) bitkidir. En büyük anter çapına sahip bitki ise İnegöl hattına ait ginogenik tetraploid (1,8 mm) bitkiler olduğu gösterilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Farklı *A. ampeloprasum* genotiplerinden elde edilen ginogenik bitkilerinin tomurcuk ve anter büyüklükleri

Genotip	Ginogenik/ somatik/ tohumdan	Ploidi	Tomurcuk boyu (mm)	Tomurcuk çapı (mm)	Anter boyu (mm)	Anter çapı (mm)
Tarsus Uzun	Ginogenik	4n	4,4	3,6	1,2	0,8
	Somatik	4n	4,4	3,1	1,3	0,9
	Tohumdan	4n	4,7	3,7	1,3	0,9
Tarsus Kısa	Ginogenik	4n	5,5	4,2	1,5	1
	Ginogenik	6n	5,1	3,4	1,9	1,4
	Somatik	4n	5	3,7	1,4	0,9
	Tohumdan	4n	4,1	3,3	1,3	0,8
İnegöl	Ginogenik	4n	4,5	3,5	1,5	1,8
	Somatik	4n	4,4	3,3	1,7	1,2
	Tohumdan	4n	4,6	3,5	1,4	0,9

3.4 Uyarılmış ve Spontan Kromozom Katlaması Sonucu Elde Edilen Bitkilerin Morfolojik Gözlemleri

Bir diğerk çalışmada Tarsus Kısa genotipinden elde edilmiş olan diploid ginogenik bitkilerin bazılarına yeniden tetraploid seviyede bitkilere dönüşüm sağlanması için kolçisin uygulaması yapılmış ve bu uygulamadan elde edilen bitkilerden bir tanesinden tohum elde edilmiştir. Bu çalışmada ise elde edilmiş olan tohumların ekilmesi ile elde edilen 13 fide flow sitometri ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda fidelerin bir tanesi hekzaploid diğerklerinin ise tetraploid oldukları tespit edilmiştir. Bu bitkilerin sera ortamında büyümeleri takip edilmiştir. Tohum oluşturma dönemine kadar sağlıklı büyüyen bitkilerin morfolojik gözlemleri yapılmıştır. Ginogenik hekzaploid olarak elde edilen Tarsus Kısa hattına ait olan bitki 2018 ve 2019 yılında ölçümleri yapıldığında boy uzunluğu olarak en küçük boyutlarda olduğu gösterilmiştir (Tablo 6). Tarsus Kısa hattına ait olan ginogenik tetraploid, somatik ve tohumdan bitkilerin büyüklükleri genellikle birbirine yakın seviyelerde olduğu bulunmuştur (Tablo 6). 2018 yılında ölçümleri yapılan tohumdan olan Tarsus kısa bitkileri boy ve çap büyüklüğü olarak diğerk bitkilerden daha büyük boyutlarda olduğu gözlemlenmiştir. 2019 yılının ölçümü yapılan Tarsus kısa bitkilerinden boy ve çap büyüklüğü olarak en büyük boyutlardaki bitkiler ise somatik bitkiler olduğu gösterilmiştir (Tablo 6). Hasat dönemi gelene kadar takip edilen bu bitkilerden tohum oluşturan umbellerinden tohumlar alınmıştır.

İnegöl hattına ait 2017 yılı kültürlerinden elde edilen ginogenik diploid bitkilerin toprağa aktarımı gerçekleştirilmiş ve büyümeleri takip edilmiştir. İlerleyen süreçte bu bitkilerin somatik ve tohumdan üretilmiş olan bitkilere yakın büyüklüklerde olması sonucu bu bitkilere yeniden ploidi analizi yapıldığında bunların tetraploid seviyeye dönüşmüş olduğu tespit edilmiştir. Kendiliğinden tetraploid hale dönüşen bu bitkiler tohum oluşturma dönemine gelene kadar takip edilmiştir ve bitkilerin boy, çap büyüklükleri ölçülmüştür. Yapılan gözlemlerde spontan tetraploid olan bitkilerin somatik ve tohumdan olan bitkilerden biraz daha küçük boyutlarda olduğu görülmüştür (Tablo 6, Şekil 5).

Tablo 6: Uyartım ve kendiliğinden kromozom katlaması sonucu elde edilen bitkilerin boy ve çap ölçümleri

Yıl	Genotip	Ginogenik/ Somatik /Tohumdan	Ploidi	Ölçülen Bitki Sayısı	Yalancı Gövde Boyu (cm)	Tam Bitki Boy (cm)	Gövde Çapı (mm)
Uyartım ile Kromozom Katlaması							
^a 2018	Tarsus Kısa	Ginogenik	6n	1	14	52	11,13
		Ginogenik	4n	12	18,9(±3,4)	64 (±18,3)	12,21 (±3)
		Somatik	4n	6	29,5(±8,4)	64 (±9,2)	10,8 (±2,2)
		Tohumdan	4n	29	32,4(±15,3)	75 (±20,1)	14 (±4,8)
^a 2019	Tarsus Kısa	Ginogenik	6n	1	26	47	14,09
		Ginogenik	4n	3	34,3(±12,1)	86,3 (±15)	17,9 (±2,7)
		Somatik	4n	1	45	110	21,5
		Tohumdan	4n	3	32(±20,3)	72,7 (±35,2)	16,3 (±10,1)
Spontan Olarak Kromozom Katlaması							
^b 2019	İnegöl	Ginogenik	4n	3	67,3(±3,1)	147 (±7,6)	36,8 (±0,5)
		Somatik	4n	1	84	150	31,2
		Tohumdan	4n	1	93	175	35,86

^a2016 ekimlerinden elde edilen bitkiler

^b2017 ekimlerinden elde edilen bitkiler



Şekil 5: *A. ampeloprasum* İnegöl genotipine ait ginogenik, somatik ve tohumdan yetiştirilen bitkilerin karşılaştırılması. **A.** İnegöl hattına ait tohumdan olan bitki. **B.** İnegöl hattına ait somatik bitki. **C, D** ve **E.** İnegöl hattına ait ginogenik bitkiler. **F.** İnegöl hattına ait bitkide topset oluşumu.

3.5 *A.ampeloprasum* Bitkilerinin 2018-2019 Yıllarındaki Polen Canlılıkları ve Tohum Verimlilikleri

2018 ve 2019 yıllarında Tarsus Uzun, Tarsus Kısa ve İnegöl hatlarına ait bitkilerin polen canlılıklarına ve hasat dönemi geldiğinde tohum verimliliklerine bakılmıştır. Hatlar arasında ve yıllar arasında değişen verim gözlemlenmiştir. 2018 yılında yapılan ölçümlere bakıldığında, en düşük polen canlılığı (% 52) ve tohum verimine sahip bitkilerin Tarsus Uzun hattında oktoploid olan bitkilerde olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek polen canlılığına (% 86) ve tohum verimine sahip bitkilerin ise somatik bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Ginogenik olarak elde edilen tetraploid ve oktoploid bitkilerin polen canlılıkları ve tohum verimlilikleri somatik ve tohumdan üretilen bitkilerden daha düşük olduğu gösterilmiştir (Tablo 7). 2019'da bu hata ait bitkilerde en düşük polen canlılığı (% 68) ve en az tohum ginogenik tetraploid bitkilerden elde edilmiştir. En yüksek tohum sayısı ve polen canlılığı da (% 92) somatik bitkilerden elde edilmiştir. 2019 yılında 2018'e göre ginogenik tetraploid bitkiler hariç diğer bitkilerin polen canlılıkları artmıştır. Tohum verimi 2019 yılında daha yüksektir (Tablo 7).

Tarsus Kısa hattına bakıldığında 2018'de ginogenik diploid ve tohumdan üretilen bitkilerin polen canlılıkları ve tohum sayıları birbirine yakın değerlerdedir. Ginogenik bitkilerin tohum verimliliği ve polen canlılıkları tohumdan olanlara göre daha yüksek elde edilmiştir (Tablo 7). 2019 yılında ise en yüksek polen canlılığı (% 89) ve tohum verimi ginogenik tetraploid bitkilere aittir. En düşük polen canlılığı (% 80) ve tohum sayısı ise tohumdan olan bitkilerden elde edilmiştir. 2019 yılında polen canlılık yüzdesi ve tohum sayısı 2018'e göre daha yüksek elde edilmiştir (Tablo 7).

İnegöl hattına ait bitkilerden 2018 yılında tohum elde edilmemiştir. Sadece tohumdan olan bitkilerde çiçek oluşumu gerçekleştiği için bu bitkilerin polen canlılığına bakılmıştır. 2019 yılında ise tetraploid, somatik ve tohumdan olan bitkilerden tohum elde edilmiştir. Bu yılda 2018'e göre polen canlılık yüzdesi artmış ve tohum elde edilmiştir. En yüksek polen canlılık tetraploidginogenik (% 92) bitkilere aittir. Somatik bitkilerin (% 81) polen canlılık yüzdesi tetraploid ginogenik olanlara göre daha düşük olmasına rağmen tohum verimi ginogenik tetraploid olanlara göre

daha fazladır. En düşük polen canlılık yüzdesi (% 76) ve tohum sayısı tohumdan olan bitkilere aittir (Tablo 7).

Üç hattın 2018 ve 2019 yılı polen canlılık ve tohum verimlerine bakıldığında ploidi seviyelerine göre belirli bir oran görülmemektedir. Fakat bütün bitkilerin polen canlılıklarındaki artış tohum sayısını da arttırmıştır. 2018 yılında bitkilerin polen canlılıkları ve tohum sayıları 2019'a göre daha düşük seviyelerde çıkmıştır (Tablo 7)

Tablo 7: Ginogenik *A. ampeloprasum* bitkilerinin 2018-2019 yıllarında polen canlılık ölçümleri ve tohum verimlilikleri

Yıl	Genotip	Ginogenik/somatik/ Tohumdan	Ploidi	Polen canlılığı (%)	Tohum sayısı
2018	Tarsus Uzun	Ginogenik	4n	68	15
	Tarsus Uzun	Ginogenik	8n	52	8
	Tarsus Uzun	Somatik	4n	86	245
	Tarsus Uzun	Tohumdan	4n	80	206
2019	Tarsus Uzun	Ginogenik	4n	68	50
	Tarsus Uzun	Somatik	4n	92	1890
	Tarsus Uzun	Tohumdan	4n	85	985
2018	Tarsus Kısa	Ginogenik	2n	78	81
	Tarsus Kısa	Tohumdan	4n	75	79
2019	Tarsus Kısa	Ginogenik	4n	89	817
	Tarsus Kısa	Ginogenik	6n	82	503
	Tarsus Kısa	Somatik	4n	86	680
	Tarsus Kısa	Tohumdan	4n	80	280
2018	İnegöl	Tohumdan	4n	70	-
2019	İnegöl	Ginogenik	4n	92	7550
	İnegöl	Somatik	4n	81	7907
	İnegöl	Tohumdan	4n	76	724

4. TARTIŞMA

A.ampeloprasum üretimi uzun yıllar öncesine dayanan ve sınıflandırmada büyük genoma sahip türler arasında yer almaktadır (Labani ve diğ. 1987). Bu sebeple geleneksel yöntemlerle ıslahı oldukça zor ve uzundur. Tetraploid olan *A. ampeloprasum*lardan % 100 saf hat elde edebilmek için bitki önce diploid hale getirilmelidir. Daha sonra ikinci bir kromozom indirgemesi uygulaması ile gerçek haploidlerin üretilmesi gerekmektedir. Haploid bitkilerden kromozom katlaması yolu ile yeniden tetraploid bitkilerin üretilmesi ile tamamen homozigot bitkiler elde etmek mümkündür (Alan ve diğ. 2016). Bu zor işlemin yapılabilirliği henüz gösterilememiştir.

*Allium*lar için haploid ve dihaploid bitki üretiminde uygulanan ana teknik ginogenesisidir. *A. ampeloprasum*da uygulanan ginogenesis çalışmaları henüz istenilen seviyede başarıya ulaşmamıştır. Yayınlanmış çalışmalara bakıldığında Smith ve diğ. (1991) bir tane diploid bitki elde etmişlerdir. Schum ve diğ. (1993) yaptığı çalışmada ise sekiz diploid *A. ampeloprasum* bitkiciği elde edilmiştir ve bunların üç tanesinin albino oldukları tespit edilmiştir. Kaska ve diğ. (2013) yaptığı ginogenesis çalışmasında 48 diploid bitki elde edilmiş ve bunların 12 tanesi toprağa aktararak gözlemlenmeye devam edilmiştir. Alan ve diğ. (2016) elde ettikleri 133 ginogenik *A. ampeloprasum* bitkisinin % 62'sinin diploid olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmalara bakıldığında *A. ampeloprasum*larda gerçekleştirilen ginogenesis çalışmalarındaki başarının zamanla arttığı gözlemlenmektedir.

Bu çalışmada 2016-2017 yıllarında doku kültürüne alınan *A. ampeloprasum* tomurcuklarından elde edilen ginogenik bitkilerin toprağa aktarımı gerçekleştirilmiş ve *in vivo* da büyümeleri takip edilmiştir. Ginogenik, somatik ve tohumdan olarak üretilen bitkilerin morfolojik gözlemleri yapılmış birbirleri arasında ve yıllar arasında karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.

2018 yılında yapılan ölçümlerde boy uzunluğu olarak diploid ginogenik bitkiler arasında en kısa bitki Tarsus Kısa hattına aittir (gövde boy 19 cm, tam boy 63 cm). Bu bitki aynı zamanda diğer hatlara ait tüm bitkilerden de kısadır. *A. ampeloprasum*

bitkilerinde yapılan ginogenesis çalışması sonucu elde edilen ginogenik bitkilerin morfolojik gözlemleri yapıldığında diploid bitkilerin diğerlerine göre daha küçük boyutlarda oldukları tespit edilmiştir (Akgün 2018). Gövde çapı en küçük bitki ise miksploid olan Tarsus Uzun dur (6,55 mm). Ginogenik tetraploid bitkiler arasında en uzun bitkiler Görle Karacasu hattına aittir (gövde boy 51 cm, tam boy 122 cm). Aynı zamanda bu bitkiler tüm hatların somatik ve tohumdan bitkilerinden daha uzun gövde boyuna sahiptirler. Ginogenik olarak elde edilen bitkilerden gövde genişliği (27,3 mm) en fazla olan tetraploid bitkiler de Kartal Kalem hattına aittir. Kaska (2013) yaptığı çalışmada da ginogenik, somatik ve tohumdan elde edilen bitkilerin gövde uzunluklarını karşılaştırdığında ginogenik bitkilerin yalancı gövde uzunluklarının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Somatik ve tohumdan üretilen bitkilerin büyüklükleri çoğunlukla birbirine yakındır. Ölçümü alınan tüm bitkilerin en uzun tam boya sahip olanı Görle-Karacasu (130 cm) hattına ait tohumdan bitkilerdir. Gövde kalınlığı en fazla olan bitkiler Kartal Kalem (32 mm) hattına ait somatik bitkilerdir. Tohumdan ve somatik bitkiler diğerlerine göre daha büyük ve gelişmişlerdir. Ginogenik diploid bitkilerin boyları ise tüm bitkilerden daha kısadır.

2019 yılında yapılan ölçümlerde en kısa bitki Tarsus Kısaya ait ginogenik hekzaploid bitkidir (gövde boy 26 cm, tam boy 47 cm). Gövde büyüklüğü olarak en küçük bitki ise Tarsus Uzun hattına ait ginogenik elde edilen tetraploid bitkidir (7,3 mm). Ginogenik tetraploid bitkilerde en uzun gövde boyuna, tam boyuna ve gövde çapına sahip bitki İnegöl hattına aittir (gövde boy 67,3 cm, tam boy 147 cm ve gövde çap 36,8 mm). Ginogenik tetraploid bitkilerin boyları önceki yılda ölçümü alınan tetraploid bitkilerden de uzunlardır. Tüm bitkiler içinde en uzun bitki de İnegöl hattına ait tohumdan bitkidir (gövde boy 93 cm, tam boy 175 cm). Gövde gelişmişliği olarak en büyük bitki İnegöl hattına ait ginogenik tetraploid bitkidir (36,8 mm). Ginogenik tetraploid bitkiler somatik ve tohumdan olanlara göre daha küçük boyutlardadırlar. Somatik ve tohumdan olan bitkiler genellikle birbirine yakın değerlerdedir. İki yılda ölçümü alınan ginogenik bitkilerin İnegöl hatı hariç hepsi 2016 da doku kültürüne alınarak elde edilmişlerdir. İnegöl hattına ait bitkiler 2017 de doku kültürüne alınmış ve diploid olarak toprağa aktarılan bu bitkiler kısa sürede İnegöl hattına ait somatik ve tohumdan olan bitkilerin boyutlarına yakın seviyelere gelmişlerdir. Ginogenik diploid bir bitkinin bu boyutlara ulaşamayacağı düşünülerek tekrar ploidi analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına bakıldığında bitkilerin

ginogenik tetraploid oldukları gözlemlenmiştir. İnegöl donöründen elde edilen diploid bitkilerin spontan olarak kromozomlarını katladıkları tespit edilmiştir. Belli bir büyüklüğe ulaşan İnegöl hattına ait ginogenik tetraploid bitkiler somatik ve tohumdan bitkilere göre bitki boy, çap büyüklükleri, yaprak büyüklükleri ve çiçek sap büyüklükleri bakımından küçük olsalar da diğer hatlara ait ginogenik tetraploid, somatik ve tohumdan olan tüm bitkilerden daha büyük boyutlarda ve sağlıklı oldukları gözlemlenmiştir. Tarsus Uzun ve Görle Karacasu hatlarından elde edilen ginogenik bitkilerden iki tanesinin *in vivo* da ploidi analizine tekrar bakıldığında miksploid ($2n+4n$) oldukları tespit edilmiştir. Bu da diploid bitkilerin kromozom katlaması gerçekleştirebileceğini kanıtlamaktadır. 2019 ölçümlerinde bitkilerin yaprak ve çiçek sap gelişimlerine de bakılmıştır. En büyük yaprak boyutuna sahip bitki İnegöl hattına ait ginogenik tetraploid bitkidir (yaprak çapı 5 cm, yaprak boyu 83,3 cm). Çiçek sap boyutu olarak en büyük bitki de İnegöl hattına ait somatik bitki olmuştur (çiçek sap uzunluğu 80 cm, çiçek sap çapı 17,7 mm). Yaprak büyüklüğü ve çiçek sap gelişmişliği en küçük bitki ise Tarsus Uzuna ait ginogenik tetraploid bitkidir (yaprak çapı 1,3 cm, yaprak boyu 40 cm, çiçek sap uzunluğu 31 cm, çiçek sap çapı 6,1 mm).

Alınan tüm ölçümlere bakıldığında 2018 bitkilerinin 2019'da morfolojik gözlemleri yapılan bitkilere göre daha küçük boyutlarda oldukları tespit edilmiştir. 2018'deki *A. ampeloprasum* bitkileri araziye yapılan tünellerde takip edilirken 2019'da ölçümü alınan bitkiler sera ortamında gözlemlenmiştir. Araziye yapılan tünellerde sıcaklık ortalamasının sabit olmaması ve mevsimsel olarak o yıl sıcaklık değerlerinin normalin daha üstünde olması bitkilerin büyümelerini olumsuz etkilemiştir. 2019'da seraya alınan bitkilerin belli bir sıcaklıkta ve olumsuz hava koşullarından uzak tutulması bitkilerin daha sağlıklı ve geçmiş yıla göre büyük olmalarını sağlamıştır. 2018'de oluşan olumsuzluklar polen canlılığını da etkilediği görülmüştür. Tomurcukları antesis aşamasına gelen bitkilerin polen canlılık yüzdelerine bakılmıştır. Genellikle somatik ve tohumdan olan bitkilerin polen canlılıkları ginogeniklere göre daha fazla çıkmıştır. Ginogenik bitkilerin tohum verimliliği düşük olması polen canlılıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü polen canlılığı daha düşük gözlemlenen bitkilerden daha az tohum elde edilmiştir. 2018'de polen canlılık % (52-86) aralığında ve tohum sayıları 8-245 aralığındadır. 2019'da ise polen canlılık % (68-92) aralığında ve tohum sayıları yaklaşık 50-7907 dir. Elde edilen değerlere bakıldığında 2018 yılındaki polen canlılık ve tohum sayısının daha düşük olduğu

gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin de bitkilerin fazla sıcaklığa ve dış ortamdan uzak kontrol altında tutulmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

2019'da *A. ampeloprasum* bitkilerinin tomurcuk ve anter büyüklüklerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında birbirlerine yakın değerlerin elde edildiği görülmektedir. Tomurcuk boyutu en büyük olan bitkiler Tarsus Kısa hattına aittir. Tohumdan ve somatik bitkiler ginogenik bitkilerden daha sağlıklı görünmelerine rağmen Tarsus Kısa ve İnegöl hatlarına ait bitkilerin tohumdan olanlarına ait tomurcuk ve anter büyüklükleri ginogenik bitkilerin tomurcuk ve anterlerinde daha küçük boyutlara sahiptir. Bu durum tomurcuk ve anter büyüklüğünün polen canlılık ve elde edilen tohum verimiyle bir ilişkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca daha sağlıklı görülen ve büyük boyutlara sahip bitkilerin de daha büyük boyutlara sahip tomurcuk ve antere sahip olmadığı gözlemlenmiştir. Çünkü İnegöl hattına ait bitkilerden daha fazla sayıda tohum elde edilmiştir ve tüm bitkiler arasında en büyük boyutlara sahiplerdir. Fakat Tarsus Kısaya ait bitkilerden daha az tohum elde edilmesine ve bitki boyutları daha küçük olmasına rağmen tomurcuk ve anteri daha büyük bulunmuştur.

A. ampeloprasum da gerçekleştirilen ıslah çalışmaları bitkinin heterozigot olması, kendileme depresyonu, iki yıllık yaşam döngüsü ve bitkinin büyük genoma sahip olması gibi sebeplerden dolayı uzun sürmektedir. Ginogenesis ile gerçekleştirilen çalışmalar bu süreyi kısaltmayı ve verimi arttırmayı hedeflemektedir. Günümüzde modern ıslah çalışmaları geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada tetraploid olan *A. ampeloprasum* bitkilerinden 28 adet diploid bitkinin *in vivo* da yaşaması takip edilmiş ve morfolojik gözlemleri yapılmıştır. Kaska (2013) yaptığı çalışmada 11 tane elde edilen ginogenik *A.ampeloprasumun* toprağa aktarımı gerçekleştirilmiş ve büyümeleri takip edilmiştir. Alan ve diğ. (2016) yapılan çalışmada dört hattan elde edilen 29 adet diploid bitkinin *in vivo* da morfolojik gözlemleri yapılmıştır ve bitkilerin kök uzunlukları karşılaştırılmıştır. Yapılan birçok ginogenesis çalışmasında farklı protokoller denenmiş elde edilen başarı gözlemlenmiştir. Çelebi-Toprak ve diğ. (2017) da yaptığı çalışmada hormon ve sukroz varlığının ginogenesis etkisi gözlemlenmiştir ve hormon içermeyen 100 g/l sukroz içeren MS temelli besi ortamında en yüksek oranda ginogenik *A. ampeloprasumlar* elde edilmiştir. Alan ve diğ. (2016) yaptığı diğer bir çalışmada ise şeker miktarının ginogenesisite alınan cevap miktarını etkilediği gözlemlenmiştir. Ginogenesisite elde edilen başarılarla bakıldığında

zaman içinde çalışmalardaki başarının arttığı gözlemlenmektedir. Geliştirilen protokoller sayesinde elde edilen ginogenik bitki sayısının arttırılabileceği görülmektedir. Bir umbelden elde edilen tomurcuk sayısının fazla olması ginogenesisteki başarıyı arttırma yönünde olan avantajlardan bir diğeridir.

Yapılan çalışmalar sonucu ginogenesis yolu ile diploid pırasa bitkilerinin elde edilebileceği ve bu bitkilerin *in vivo* ya adapte edilebileceği kanıtlanmıştır. Bitkilere daha önceki çalışmada kromozom katlaması uygulanmıştır ve bu çalışma ile 11 adet bitkinin *in vivo* da takibi gerçekteştirilmiştir. Tohum oluşturma dönemine kadar da hayatta kalanların morfolojik gözlemleri yapılarak büyümeleri takip edilmiştir. Ginogenik dihaploid bitkilerin elde edilebilmesi için kromozom sayısı dönor bitkinin seviyesine getirilen bitkilerin ikinci kez ginogenesis uygulamasına tabi tutulması gerekmektedir. Elde edilecek olan haploid bitkiler diploid seviyeye getirilerek kendi aralarında melezlenerek ışlah çalışmaları daha verimli hale getirilebilecektir.

A.ampeloprasum türünde uygulanan ginogenesis çalışmaları zor olması sebebiyle yaygın değildir. Gerçekteştirilen çalışmada elde edilen başarı geliştirilecek olan protokollere avantaj sağlamaktadır. *A. ampeloprasumda* dihaploid bitkilerin verimi henüz gözlemlenmemiştir. Fakat bu bitkilerin elde edilmesi, *in vivo* da takip edilmesi ve bu bitkilerin diğerleriyle karşılaştırılması gelecekteki çalışmalara ışık tutacaktır.

5. KAYNAKLAR

Akgün, S., “Farklı Sukroz Konsantrasyonlarının Pırasada (*Allium ampeloprasum* L.) Ginogenesis Uyartımına Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2018).

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

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

Alan, A. R., Kaska, A. and Toprak, F. C., “Edible *Allium* improvement via doubled haploidy technology”, *COBIOT*, (24), S42, (2013).

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

Alan, AR., and Celebi-Toprak, F., “Ploidy manipulation strategies for economically important *Allium* crops”, *European Biotechnology Conference*, Riga, Latvia. *J. Biotechnol.* 231:S31 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.127, (2016).

Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E. and Van Droogenbroeck, B., “Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. porrum)”, *Food chem.* 134(2), 669-677, (2012).

Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E. and Bergner, A. D. “A haploid mutant in the jimson weed, *Datura stramonium*”, *Science*, 55(1433), 646-647, (1922).

Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A. and Javornik, B., “Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants”, *Plant Sci.* 104, 215–224, (1995).

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

Bohanec, B., “Doubled-haploid onions”, *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI, Pub Wallingford Oxon New York, 145-157, (2002).

Bouvier, L., Fillon, F. R. and Lespinasse, Y., “Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots”, *Plant Breed.* 113(4), 343-346, (1994).

Brewster, J. L., “Onion and other vegetable alliums”, *CABI*, 93-115, (1994).

Brewster, J. L., “Onions and other vegetable alliums”, (Vol. 15). *CABI*, (2008).

Brunet, J., Ziobro, R., Osvatic, J. and Clayton, M. K., “The effects of time, temperature and plant variety on pollen viability and its implications for gene flow risk”, *Plant Biol.* 21(4), 715-722, (2019).

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

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

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 Culture*, 104, 311-319, (2011).

Celebi Toprak, F. and Alan, A. R., “Optimization of gynogenesis induction in leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*)”, *J. Biotechnol.* (231), S30, (2016).

Celebi Toprak, F., Akgün, S. and Alan, A.R., “Importance of Sucrose in Gynogenesis Induction in Two Turkish leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) Lines”, *The 3rd International Symposium on Euro Asian Biodiversity Minsk-BELARUS* Page.98, (2017).

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

Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D. and Ortiz, R., “Haploids: constraints and opportunities in plant breeding”, *Biotechnology Advances*, 33(6), 812-829, (2015).

Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. and Touraev, A., “The resurgence of haploids in higher plants”, *Trends in Plant Science*, 12(8), 368-375, (2007).

Fritsch, R. M. and Friesen, N., “Evolution, domestication and taxonomy”, *Allium crop science: Recent Advances*, 5-30, (2002).

Golabadi, M., Ghanbari, Y., Keighobadi, K. and Ercisli, S., “Embryo and callus induction by different factors in ovary culture of cucumber”, *JABFQ*, 90, (2017).

Guenauoui, C., Mang, S., Figliuolo, G. and Neffati, M., “Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(1), 97-114, (2013).

Hansen, N. J. P. and Andersen, S. B., “Efficient production of doubled haploid wheat plants by in vitro treatment of microspores with trifluralin or APM”, *Plant Breed.* 117(5), 401-405, (1998).

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

Jakše, M., Bohanec, B. and Ihan, A., “Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants”, *Plant Cell Rep.* 15(12), 934-938, (1996).

Kaska, A., “Bazı yenilebilir *Allium* Türlerinde Ginogenesis Uyartımı Ve Klonal Çoğaltma Olanaklarının Araştırılması”, Doktora, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, (2013).

Kaska, A., Toprak, F. C. and Alan, A. R., “Gynogenesis induction in leek (*Allium ampeloprasum* L.) breeding materials”, *COBIOT*, (24), S42, (2013).

Keller, E. J. and Korzun, L., Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. In *In vitro* haploid production in higher plants (pp. 51-75). Springer, Dordrecht, (1996).

Keller, E. J. and Kik, C., “*Allium* genetic resources. In The *Allium* Genomes”, (pp. 23-52). Springer, Cham, (2018).

Kik, C., “Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species”, *Allium crop science: Recent Advances*, 81100, (2002).

Koch, H. P. and Lawson, L. D., “Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species”, Lippincott Williams & Wilkins, (1996).

Labani, R. M. and Elkington, T., “Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L.(*Liliaceae*)”, *Heredity*, 59(1), 119., (1987).

Lanzotti, V., Bonanomi, G. and Scala, F., “What makes *Allium* species effective against pathogenic microbes?”, *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 751-772, (2013).

Mishra, R. and Rao, G. J. N., “In-vitro androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects”, *Rice Science*, 23(2), 57-68, (2016).

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

Murovec, J. and Bohanec, B., “Haploids and doubled haploids in plant breeding”, *In Plant breed. IntechOpen*. Chapter 5pp.87-106.DOI: 10.5772/29982, (2012).

Musial, K., Bohanec, B., Jakše, M. and Przywara, L., “The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), 446-452, (2005).

Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H. and Kılınc, F. M., “Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum”, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 1(2), 11-28, (2012).

Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, S., Ergül, A. and Gürel, E., “Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment”, *PCTOC*, 132(1), 85-97, (2018).

San Noeum, L. H., “Haploides d, *Hordeum vulgare* L. par culture in vitro non fecondes”, *Ann. Amelior Plantes*, 26, 751-754, (1976).

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

Smith, B. M., Godwin, R. M., Harvey, E. and Werner, C. P., “Gynogenesis from whole flower buds in bulb onions (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.)”, *Journal of Genetics and Breeding*, 45(4), 353-357, (1991).

Stearn, W. T., “How many species of *Allium* are known?. The Kew Magazine”, 9(4), 180-182, (1992).

Stone, J. L., Thomson, J. D. and Dent-Acosta, S. J., “Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review”, *AJB*, 82(9), 1186-1197, (1995).

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

Veiskarami, G. H., Khodayari, H., Heubl, G., Weigend, M. and Zarre, S., “Phylogenetic relationships in *Allium* sect. *Allium* (*Amaryllidaceae*, *Allioideae*) in Iran

as inferred from nrDNA ITS, cpDNA rps16 and trnL-F sequences”, *Nordic Journal of Botany*.1:1-15, (2019).

Watts, A., Kumar, V., Raipuria, R. K. and Bhattacharya, R. C., “*In Vivo* Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges”, *Plant Molecular Biology Reporter*, 36(5-6), 685-694, (2018).

Wheeler, E. J., Mashayekhi, S., McNeal, D. W., Columbus, J. T. and Pires, J. C., “Molecular systematics of *Allium* subgenus *Amerallium* (*Amaryllidaceae*) in North America”, *AJB*, 100(4), 701-711, (2013).

Zenkteler, M., Dębowska, W., Knaflewski, M. and Zenkteler, E., “Screening of *Asparagus officinalis* L. Seeds for occurrence and ploidy of twin embryos”, *ABCbot*, 54(2), 121-128, (2012).

Zhang, Y. X., Lespinasse, Y. and Chevreau, E., “Induction of haploidy in fruit trees”, *In I International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 280 (pp. 293-306), (1989).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Vesile KOCAKAYA

Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın 03.06.1992

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Y. Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik Posta : vesile.9292@gmail.com

Posterler:

- Alan, S., Celebi-Toprak, F., Kaska, A., Kocabas, C., Kocakaya, V., Duzgun, F., Alan, A.R., Responses of Chive (*Allium schoenoprasum*) and Japanese Leek (*A. fistulosum*) to Gynogenesis Induction. 30. International Horticultural Congress 12-16 August 2018, Istanbul, Turkey. S2. P31. Page 31..

Sunduğu Seminer:

- Kocakaya V., “Fil Sarımsağında (*A. Ampeloprasum* var. *ampeloprasum*) Ginogenesis” Yüksek Lisans Semineri, Pamukkale Üniversitesi/ Denizli (2018).