

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semih ALAN

**FARKLI BESİ ORTAMLARININ SOĞAN (*Allium cepa* L.)
ISLAH MATERYALLERİNDE GİNOGENESİS UYARTIMINA
ETKİLERİ**

BAHÇE BİTKLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI BESİ ORTAMLARININ SOĞAN (*Allium cepa* L.) ISLAH
MATERYALLERİNDE GİNOGENESİS UYARTIMINA ETKİLERİ**

Semih ALAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 26/08/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 117O386

Not : Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge
ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat
Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BESİ ORTAMLARININ SOĞAN (*Allium cepa* L.) ISLAH MATERYALLERİNDE GİNOGENESIS UYARTIMINA ETKİLERİ

Semih ALAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl: 2019, Sayfa: 51
Jüri : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK

Bu tezde, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanmış beş farklı soğan genotipinin (Pamukkale Üniversitesinde üretilmiş olan üç adet ıslah hattı, bir adet açık tozlanan yerli ve bir adet açık tozlanan yabancı çeşit) ginogenesis uyartımına verdikleri tepkiler gözlemlenmiştir. Beş farklı soğan genotipine ait 29010 açmamış çiçek tomurcuğu BDS ve MS temelli farklı sükroz konsantrasyonu (30 g/l ve 100 g/l) ve bitki büyüme düzenleyicileri (2 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4-D) içeren altı farklı besi ortamına ekilmiştir. Ekilen tomurcukların yaklaşık yarısı 21 gün sonra 30 g/l şeker içeren hormonsuz besi ortamına alt kültüre alınmıştır. Tomurcukların ekilmesinden ve alt kültüre alınmasından yaklaşık iki ay sonra ginogenik tepkiler gözlenmeye başlanmıştır. Yapılan gözlemlerde alt kültüre alınan tomurcuklardan elde edilen ginogenik bitkilerin daha sağlıklı ve güçlü geliştiği görülmüştür. Farklı soğan genotiplerinin ginogenesis oranları karşılaştırıldığında, DELFOS (%0,98) genotipinin en yüksek oranda olduğu ve MBDS-1 besi yerinden MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınmasıyla elde edildiği görülmüştür. Elde edilen ginogenik bitkilerin 76 tanesi flow sitometri ile analiz edilmiştir. Toplamda test edilen ginogenik bitkilerin 48 (%63,10) tanesi haploid, 18 (%23,70) tanesi diploid ve 10 (%13,10) tanesi miksoploid olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Allium, Ginogenesis, Doku kültürü, Haploid

ABSTRACT

MSc. THESIS

EFFECTS OF DIFFERENT NUTRIENT MEDIA ON THE GYNOGENESIS INDUCTION IN ONION (*Allium cepa* L.) BREEDING MATERIALS

Semih ALAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year: 2019, Page: 51
Jury : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Asst. Prof. Dr. Başar SEVİNDİK

In this thesis, gynogenic responses of five onion genotypes (three breeding lines produced at Pamukkale University, one open pollinated domestic line and one open pollinated variety) collected from different regions of Turkey were observed. In this thesis, five onion genotypes with superior quality features collected from different regions of turkey were observed for their gynogenic responses. 29010 surface sterilized unopened flower buds of onion genotypes were cultured in BDS and MS based six different medium containing different sucrose concentration (30 g/l and 100 g/l) and plant growth regulators (2 mg/l BAP and 2 mg/l 2,4-D). Approximately half of the buds were subcultured after 21 days. The subculture medium contains 30 g/l of sugar, without plant growth regulators. Approximately two months after bud cultivation and subculture, gynogenic responses started to be observed. It was observed that the gynogenic plants obtained from the subcultured buds developed healthier and stronger. When the response rates of different onion genotypes to ginogenesis were compared, it was showed that DELFOS (0.98%) genotype was the highest and obtained from subculturing MBDS-1 medium to MBDS-2 medium. 76 of the obtained gynogenic plants were analyzed by flow cytometry. In total, 48 (63.10%) of them were haploid; 18 (23.70%) of them were diploid, and 10 (13.10%) of them were mixoploid.

Key words: Allium, Gynogenesis, Tissue culture, Haploid

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Soğan (*Allium cepa* L.) Allium familyasına ait Dünya’da en fazla tüketilen ve üretilen sebzelerden biridir. Üretim miktarı en fazla Çin ve Amerika olmak üzere 175 ülkede yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye 2018 yılı soğan üretimi yaklaşık 2.1 milyon tondur. FAO’nun 2018 verilerine göre soğan üretimi tüm dünyada sürekli artış eğilimi göstermektedir. Soğan iki yıllık ve yüksek oranda heterozigotluk gösteren bir bitki türüdür. Bu nedenle soğanda klasik kendileme yöntemiyle saf hatların elde edilmesi çok uzun zaman almaktadır. Klasik kendileme çalışmalarıyla 12-14 yıl gerektiren saf hat üretimi ve kendileme uygulamasının kendileme depresyonu gibi sorunlar yaratması soğanda ıslah çalışmalarını zorlaştırmakta ve bu türde genetik olarak tamamen saf hatların elde edilmesi mümkün olamamaktadır. Tamamen saf soğan hatların üretimi ise ancak katlanmış haploid bitkilerin üretilmesiyle mümkündür. Soğanlarda saf hatlar katlanmış haploid tekniğiyle üç yıl gibi kısa bir sürede üretilebilir. Katlanmış haploid soğan hatları bütün alleller için tamamen homozigot hale geldikleri için ıslah çalışmalarının hızlandırılmasına olanak verirler. Elde edilen bitkilerin F1 hibrit çeşitlerin üretiminde kullanılması durumunda, klasik yollarla elde edilmiş ebeveyn hatlara göre, çok daha uniform bitkiler üreten F1 hibrit çeşitlerin elde edilebileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada BDS ve MS temelli farklı şükroz konsantrasyonu (30 g/l ve 100 g/l) ve bitki büyüme düzenleyicileri (2 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4-D) içeren altı farklı besi ortamına toplamda 29010 adet açmamış soğan çiçek tomurcuğu ekilerek ginogenik tepki test edilmiştir. Tomurcukların yaklaşık yarısı 21 gün sonra 30 g/l şeker içeren hormonsuz besi ortamına alt kültüre alınmıştır. Tomurcukların ekilmesinden ve alt kültüre alınmasından yaklaşık iki ay sonra ginogenik tepkiler gözlenmeye başlanmıştır. Farklı soğan genotiplerinin ginogenesise tepki verme oranları karşılaştırıldığında %0,98’lik oranla en yüksek ginogenik bitki DELFOS genotipinin MBDS-1 besi yerinden MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınmasıyla

elde edilmiştir. BİYOM 2 genotipi %0,66, BİYOM 1 genotipi %0,61, Yalova 12 genotipi %0,57 ve BİYOM 3 genotipi %0,24 olarak cevap vermişlerdir. Yapılan gözlemlerde alt kültüre alınan tomurcuklardan elde edilen ginogenik bitkilerin daha sağlıklı ve güçlü oluşup geliştiği gözlemlenmiştir. Ginogenesis uyartımına tepki veren tomurcuklardan elde edilen bitkiler örnek alınacak boyuta ulaştığında genotiplerin ploidi seviyeleri flow sitometri analizi ile hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilmiştir. Analizler sonucunda haploid (n), diploid (2n) ve mixoploid (n+2n) kromozom seviyesinde bitkiler tespit edilmiştir. Kontrol olarak tohumdan üretilen Diploid soğan bitkisinin nükleer DNA miktarı ~32 pg/DNA olarak tespit edilmiştir. Analizi yapılan ginogenik bitkilerden haploid olanları ~16 pg/DNA olarak tespit edilmiştir. Analizi yapılan genotiplerden en yüksek haploid bitki eldesi %69,7 ile DELFOS genotipinde tespit edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkilerin 76 tanesi flow sitometri ile analiz edilmiştir. Toplamda test edilen ginogenik bitkilerin 48 (%63,10) tanesi haploid, 18 (%23,70) tanesi diploid ve 10 (%13,10) tanesi miksoptoid olduğu tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunda çalışmama olanak sağlayan fikirleri, yönlendirmeleri ile bana her daim doğru yolu gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca düşünce ve fikirleri ile maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen yüksek lisans tezimde ikinci danışmanım Prof. Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK'a ve Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN'a emek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine ve TÜBİTAK'a tez çalışmamda gerekli desteği sunduğu için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Bitkiler	9
3.2. Yöntem	10
3.2.1. Soğan Tohumlarının Ekilmesi ve Baş Eldesi.....	10
3.2.2. Soğan Başlarının Dikilmesi ve Çiçeklenmelerinin Sağlanması	10
3.2.3. Ginogenesis Uyartımında Kullanılan Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyon İşlemi.....	12
3.2.4. Ginogenesis Uyartımı Çalışmalarında Kullanılan Besi Yerleri	13
3.2.5. Besi Yerlerinin Hazırlanışı.....	15
3.2.6. Farklı Besi Yerleri Dağılımı.....	15
3.2.7. Ginogenesis Uyartımında Kullanılan Genotiplere Ait Çiçek Tomurcuklarının Uyartım Kültürüne Alınmaları.....	16
3.2.8. Genotiplere Ait Çiçek Tomurcuklarının 21.Günde Aktarılma İşlemi	16

3.2.9. Gözlemlerde Uyarıtma Tepki Veren Tomurcukların Bitki Büyütme Besi Yeri İçeren Ortama Aktarılması.....	17
3.2.10. Uyarıtım Sonucu Tomurcuklardan Elde Edilmiş Bitkiciklerin Bitki Büyütme Besi Yeri İçeren Cam Tüplere Aktarılması.....	17
3.2.11. Çalışmada Elde Edilen Bitkilerden Örnek Alınması, Örnek Hazırlanması ve Ploidi Seviye Tespiti	18
3.2.12. İncelenen Kriterler ve İstatiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. Genotiplerin Ginogenesis Uyarıtım Sonuçları	24
4.1.1. BİYOM1 Genotipinin Ginogenesis Uyarıtımı	27
4.1.2. BİYOM2 Genotipinin Ginogenesis Uyarıtımı	29
4.1.3. BİYOM3 Genotipinin Ginogenesis Uyarıtımı	30
4.1.4. Yalova 12 Genotipinin Ginogenesis Uyarıtımı	32
4.1.5. DELFOS Genotipinin Ginogenesis Uyarıtımı	34
4.2. Genotiplerin Somatik Uyarıtım Sonuçları	35
4.3. Genotiplerin Ploidi Seviyelerinin Tespit Edilmesi	38
4.4. Ginogenik Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi	38
4.5. Somatik Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLolar LİSTESİ**SAYFA**

Tablo 1.1	Dünya’da 2017 yılı kuru soğan üretimindeki ilk 10 ülke.	2
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan donör soğan genotiplerine ait genel özellikler.	9
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan modifiye MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamlarının içerikleri.	13
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan modifiye BDS (Dunstan ve Short, 1977) besi ortamlarının içerikleri.	14
Tablo4.1.	Genotiplere ait ekimi yapılan tomurcuk sayıları.	24
Tablo4.2.	Genotiplere ait ekimi yapılan tomurcukların 21. günde alt kültüre aktarılan tomurcuk miktarları.	24
Tablo4.3.	BİYOM1 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.	29
Tablo4.4.	BİYOM2 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.	30
Tablo4.5.	BİYOM3 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.	32
Tablo4.6.	Yalova 12 Genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.	33
Tablo4.7.	DELFOS Genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.	35
Tablo4.8.	Genotiplerin farklı besi yerlerinde somatik uyartım oluşum oranları.	37
Tablo4.9.	Ginogenik bitkilerden alınan örneklerin ploidi seviyeleri.	40



- Şekil3.1 A. Genotiplere ait tohumların viyollere ekilmesi. B. Genotiplere ait tohumların çimlenmesi. C. Çimlenen soğan fidelerinin araziye dikilmesi. D. Genotiplerin standart soğan yetiştiriciliği yöntemleri ile büyütülmesi. E. Genotiplerin hasat edilmesi ve morfolojik karakterizasyonu. F. Genotiplere ait soğan başlarının viyollere dikilerek çimlendirilmesi. G. Genotiplerin saksılara aktarılıp büyütülmesi. H. %10 antesis aşamasına gelen soğan çiçeği. 11
- Şekil3.2. A. Laboratuvara getirilen genotiplere ait umbellerin açmış çiçeklerinin uzaklaştırılması. B. Sterilizasyon işlemi için kesilen tomurcuklar. C. Sterilizasyon solüsyonuyla sterilizasyon işlemi..... 12
- Şekil3.3. Genotiplere ait ekilmiş tomurcukların 21. günde diğer besi yerine aktarılma işlemi..... 17
- Şekil3.4. Nükleer DNA miktarı hesaplanmasında kullanılan formül. 19
- Şekil3.5. Çimlendirilmiş Arpa bitkisi. B. Soğan ve Arpa bitkisinden alınan örnekler. C. Örneklerle Nuclei isolation buffer eklenmesi. D. Jilet ile parçalama aşaması. E. Pipet ile örneklerin alınması. F. Örneklerin filtreden geçirilmesi. G. Örneklerle Propidium iodide eklenmesi. H. Örneklerin vortekslenmesi. İ. Örneklerin cihazın analiz kabına aktarılması. J. Örneklerin flow sitometri cihazına yerleştirilmesi. K. Flow sitometri analizinin yapılması. L. Analiz sonucu nükleer DNA'nın hesaplanması..... 20
- Şekil4.1. BİYOM1 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik..... 25
- Şekil4.2. BİYOM2 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MMS-1/MMS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik..... 25
- Şekil4.3. BİYOM3 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1/MBDS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik..... 26

Şekil4.4. Yalova12 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1 besi yerinde tomurcuktan gelişen embriyo.	26
Şekil4.5. DELFOS genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS- 1/MBDS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik.....	27
Şekil4.6. DELFOS genotipinin MBDS-1/MBDS-2 besi yerinde Somatik uyartımı.	37



SİMGELER VE KISALTMALAR

mm	: Milimetre
mg	: Miligram
g	: Gram
μ	: Mikron
pg	: Pikogram
ml	: Mililitre
l	: Litre
°C	: Santigrad Derece
MS	: Murashige ve Skoog
BDS	: Dunstan ve Short
BAP	: Benzil Amino Purin
2,4-D	: 2,4- Dikloro Fenoksi Asetik Asit
DH	: Katlanmış Haploid



1. GİRİŞ

Soğan (*Allium cepa* L.) iki yıllık ve yüksek oranda heterozigotluk gösteren bir bitki türüdür. Bu nedenle bu türde klasik kendileme yöntemiyle saf hatların elde edilmesi çok uzun zaman almaktadır. Kendileme yöntemi ile saf hatların elde edilmesi işlemi sırasında yüksek oranda kendileme depresyonu görülen bu türde genetik olarak tamamen saf hatların elde edilmesi mümkün olamamaktadır. Tamamen saf soğan hatların üretimi ise ancak katlanmış haploid (DH) bitkilerin üretilmesiyle mümkündür. Soğanda 1989'dan bu yana haploid ve DH bitkilerin üretilebileceğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (Muren 1989, Champion ve Alloni 1990, Keller 1990, Alan ve ark, 2004). DH soğan hatları bütün alleller için tamamen homozigot hale geldikleri için ıslah çalışmalarının hızlandırılmasına olanak verirler. Elde edilen bitkilerin F1 hibrit çeşitlerin üretiminde kullanılması durumunda, klasik yollarla elde edilmiş ebeveyn hatlara göre, çok daha uniform bitkiler üreten F1 hibrit çeşitlerin elde edilebileceği gösterilmiştir (Hyde ve ark, 2012). Bu nedenle DH yönteminin Türk soğan ıslah programlarına entegre edilmesi ve başarılı bir şekilde uygulaması ülkemizde soğan tohumculuğuna büyük katkılar sağlayacaktır.

Soğangillerde erkek gametten embriyo ve bitki elde edilebilmesi çalışmaları başarılı sonuç vermemiştir (Keller ve Korzun, 1996). Muren (1989) soğanda ginogenik embriyo ve bitkilerin üretilebileceğini göstermiştir. Farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ginogenesis başarısının uyartım ortamı ve soğan genotipine bağımlı olduğu belirtilmektedir (Champion ve Alloni, 1990; Bohanec ve Jakse, 1999; Alan ve ark, 2004; Cho ve ark, 2006; Fayos ve ark, 2015). Türk soğan genotipleriyle gerçekleştirilmiş olan ginogenesis çalışmaları oldukça sınırlıdır (Kaska, 2014; Yaralı ve Yanmaz, 2013). Az sayıda soğan genotipinin kullanıldığı çalışmalarda çok az sayıda DH soğan hattı elde edilmiştir.

Soğan insanlar tarafından yetiştiriciliği yapılan en eski sebzelerden biridir. Dünyanın her yerinde üretimi yapılabilen soğanın günlük diyet içerisindeki önemi büyüktür. Soğan üretimi tüm dünyada sürekli artış eğilimi göstermektedir. TÜİK verilerine göre, Türkiye 2017 yılı kuru soğan üretimi 2.131.513 tondur. Dünyada kuru soğan üretiminde ilk sıralarda yer alan ülkeler; Çin (24.282.531 ton), Hindistan (22.427.000 ton), Amerika (3.731.940 ton), İran (2.379.096 ton), Mısır (2.379.035 ton) Rusya (2.135.974 ton) ve Türkiye (2.131.513 ton) yer almaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Dünya'da 2017 yılı kuru soğan üretimindeki ilk 10 ülke.

Sıra	Ülkeler	Üretim (Ton)
1	ÇİN	24283531
2	HİNDİSTAN	22427000
3	AMERİKA	3731940
4	İRAN	2379096
5	MISIR	2379035
6	RUSYA	2135974
7	TÜRKİYE	2131513
8	PAKİSTAN	1833200
9	BREZİLYA	1622106
10	JAPONYA	1214000

(FAO, 2018)

Gelişmiş ülkelerde ticari soğan yetiştiriciliği genelde F1 hibrit çeşitleri ile yapılmaktadır. Ülkemizde açık tozlanan standart soğan çeşitleriyle üretimin yaygın olmasına rağmen standartlık ve hasat veriminde büyük avantajlar sağlayan F1 hibrit soğan çeşitlerinin üretimi artış göstermektedir. Türkiye'de ekimi yapılan F1 hibrit soğan çeşitlerinin tümü ithalat yoluyla elde edildiği için tohum maliyeti yüksektir. F1 hibrit soğan çeşitlerinin ithalat yoluyla gelmesi ve oldukça pahalı

olması ülkemizdeki soğan üretimi için gerekli tohumluk açısından dışarıya bağımlı hale getirmiştir.

Soğan ıslahı uzun süren ve zahmetli bir işlemdir ve bu nedenle ülkemize uygun soğan çeşitlerinin geliştirilmesi konusunda fazla ilerleme sağlanamamaktadır. Klasik kendileme çalışmalarıyla 12-14 yıl gerektiren saf hat üretimi ve kendileme uygulamasının soğanda kendileme depresyonu yaratması gibi sorunlar soğanda ıslah çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Dihaploid (DH) tekniklerinin soğan ıslahı çalışmalarına entegre edilebilmesi durumunda genetik olarak uniform soğan hatlarının çok kısa sürede üretilebilmesi mümkün olacaktır. Soğanlarda saf hatlar DH tekniğiyle üç yıl gibi kısa bir sürede üretilebilmektedir. DH tekniği ile üretilen soğan hatları tüm karakterler için saflaştırılır ve bu bitkilerde kendileme depresyonu gibi istenmeyen özellikler gözlenmez. DH teknolojisinin bir ıslah programına önemli katkılar yapması için çok sayıda DH bitkinin üretilmesi gereklidir. Bu çalışma Türk soğan hatlarından haploid ve DH bitki üretiminin artırılması için ginogenesis uyartımı yönteminin iyileştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış soğan genotiplerinden üstün kalite özelliklerine sahip soğan çeşitlerinin ginogenesis uyartımına verdikleri tepki gözlemlenmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Haploidizasyonun çeşitli metodları arasında bulunan *in situ* indüklenen ginogenesis ilk olarak 1986 yılında uygulanmıştır. Bu uygulama dahil olarak ısıtılmış polenlerle tozlanma işlemi gerçekleştirilmektedir. Haploidizasyonun diğer bir yöntemi olan *in vitro* ginogenesis yöntemi uygulamaları ilk olarak 1989 yılından itibaren Muren (1989), Keller (1990), Campion ve Alloni (1990) ve Campion ve ark. (1992) gibi bazı araştırmacılar tarafından *Allium cepa*' dan haploid bitki eldesi ile rapor edilmiştir. *In situ* indüklenen ginogenesis yöntemi, embriyo kurtarma tekniği kullanmadan yapıldığı için 1990'lı yıllarda tekrar gündeme gelmiştir. Bu konuda Dore ve Marie (1993) ısıtılma ile inaktive hale getirilen polenlerle tozlamadan sonra *Allium cepa* da ginogenik bitki üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Elde edilen bitkilerin haploid ve diploid hücreler içerdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, bu yöntemle diploid hücrelerden bitkileri elde ettiğinde ne embriyo kurtarma ne de kromozom katlamaya gerek olmadan dihaploid bitkiler elde edilmiş olacağını rapor etmişlerdir. Sevindik (2018) sıklıkla de yapmış olduğu çalışmada haploid embriyolardan spontan katlanma sonucu dihaploid bitkiler elde etmiştir. Araştırmacı spontan katlanmanın nükleer füzyondan kaynaklanabileceğini belirtmiştir.

Ginogenesis, genellikle androgenesis uyartımına cevap vermeyen, erkek kısırlığı gösteren ve erkek ve dişi cinsiyeti taşıyan bitkileri olan türlerde haploid bitki eldesi için kullanılan bir alternatif yoldur (Thomas ve ark, 2000; Bhat ve Murthy, 2007). Döllenenmemiş ovaryum kültürü aracılığı ile yapılan ginogenesis yöntemi ile haploid bitki eldesi ilk olarak San Noeum (1976) arpa bitkisinde yaptığı çalışma ile literatüre geçmiştir. Daha sonraki yıllarda da döllenmemiş ovul ile haploid bitki eldesi için (Yang ve Zhou, 1982; Lakshmi-Sita, 1997; Mukhambetzhonov, 1997; Germana, 2006) yapılan başarısız olmuş çalışmalar rapor edilse de, soğan (Muren, 1989; Bohanec ve ark, 1995; Geoffriau ve ark, 1997; Luthar ve Bohanec, 1999;

Alan ve ark, 2004), *Allium ampeloprasum* (Schum ve ark, 1993); lale (Van-Creij ve ark, 2000), patates (Ruth ve ark,1993), mısır (Tang ve ark, 2006), salatalık (Gemes-Juhasz ve ark, 2002), şeker kamışı (Gurel ve ark, 2000), ve buğday (Sibi ve ark, 2001) gibi birçok bitki türü için başarılı ginogenesis çalışmaları da rapor edilmiştir.

Haploid bitkiler bitki türlerinin bazılarında doğada kendiliğinden oluşabilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark, 2001). Haploid bitkilerin çeşitli yollardan doğada ortaya çıkma sıklığı türlere ve hatta tür içerisinde genotiplere bağlı olarak değişmekte çoğunlukla %0,1-%0,001 gibi çok düşük seviyelerde kalmaktadır. Birçok türde de doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır. Doğal olarak kendiliğinden gelişen ilk haploid embriyo ve bitki *Datura stramonium* ile ışınlanmış polenlerle Blakeslee ve ark (1922) tarafından yapılan çalışma ile literatüre geçmiştir.

Haploid bitkiler erkek ve dişi üreme hücrelerinden üretilebilirler. Bitki türlerinde en yaygın kullanılan haploid bitki üretim teknikleri, gelişmemiş polen (androgenesis) ve dişi yumurta hücresinden (ginogenesis) embriyo uyartımına dayanmaktadır. Soğanda yapılan androgenesis denemeleri başarısız olmuştur (Keller ve Korzun, 1996). Soğan bitkisinde haploid embriyo eldesi sadece ginogenesis yoluyla mümkündür. İlk başarılı ginogenik çalışma 30 yıl kadar önce üç farklı araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Muren 1989, Champion ve Alloni 1990, Keller 1990). İlk ginogenesis çalışmalarında araştırmacılar gelişmemiş ovul, ovaryum ve tüm çiçek tomurcuklarını farklı uyartım ortamlarında kültüre almışlardır. Soğan ovul ve ovaryum eksplantlarının kültüre hazırlanmalarının zor olması nedeniyle açmamış çiçek tomurcuklarının ginogenesis uyartım besi ortamında kültüre alınması tercih edilmektedir (Bohanec ve Jakse 1999, Alan ve ark, 2003). Ginogenesis uyartım ortamında kültüre alınan çiçek tomurcuklarında anterler yüksek nem yüzünden açılmadığı için tozlanma ve döllenme gerçekleşmez ve bu durumda zigotik embriyo oluşmaz (Cohat, 1994).

Soğanda haploid bitki eldesinde kullanılacak olan çiçek tomurcuklarının ginogenesis uyartımına uygun gelişme safhalarında olması gerekmektedir. Muren'e (1989) göre antesisten beş gün önce toplanan çiçek tomurcukları daha erken veya geç dönemlerde toplanan tomurcuklara göre ginogenesis uyartımına daha iyi tepki vermektedirler. Alan ve ark (2004) tarafından yapılan çalışmada Kuzey Amerikan acı ve tatlı soğan genotiplerinde çapları 3 mm'den büyük olan çiçek tomurcuklarının daha küçük (<2-2,5 mm) tomurcuklara göre ginogenik uyartım için daha uygun oldukları bulunmuştur. Ginogenesis uyartımı için en uygun çiçek tomurcuğu gelişme döneminin, embriyo keseciğinin olgunlaşmış olduğu, antesisten 3-5 gün önceki dönem olduğu düşünülmektedir (Musial ve ark, 2001).

Soğanda ginogenesis uyartımında farklı besi ortamları B5 (Gamborg ve ark, 1968), BDS (Dunstan ve Short 1977) ve MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamı kullanılmıştır. Bu besi ortamlarının soğanda ginogenesis uyartımı üzerine etkilerinin detaylı bir şekilde karşılaştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Alan ve ark (2003; 2004) çiçek tomurcuklarının modifiye edilmiş BDS (Bohanec ve Jakse 1999) içeren petri kaplarında kültüre alınmasından en az iki ay sonra ginogenik bitkiciklerin ortaya çıkmaya başladığını ve bu bitkiciklerin sağlıklı büyüebilmeleri için büyütme besi yeri (Jakse ve ark, 2003) içeren tüplere transfer edilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir. Soğan genotiplerinin ginogenesis uyartımına verdikleri karşılık çok farklı olabilmektedir (Geoffriau ve ark 1997, Bohanec ve Jakse 1999, Michalik ve ark 2000, Alan ve ark 2004). Elde edilen ginogenik bitkiciklerin yarıya yakını büyümeye devam etmektedirler. Genellikle haploid (n) sayıda kromozom taşıyan ginogenik bitkiler yanında miksoploid (n+2n) ve spontan diploid (2n) ginogenik bitkilerde elde edilir. Haploid olan bitkilerde kromozom katlaması uygulamasıyla DH soğan bitkileri üretilebilmekte, üretildikleri yılda baş oluşturan DH bitkiler ikinci yılda çiçeklenmekte ve bunlardan kendileme ile tohum üretimi sağlanmaktadır. (Alan ve ark, 2004; 2007).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkiler

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesinde üretilmiş olan üç adet ıslah hattı, bir adet açık tozlanan yerli ve bir adet açık tozlanan yabancı çeşit kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkilerin önemli özellikleri (tat, baş rengi, baş şekli, baş iriliği, başı saran kuru yaprak sayısı, baş içerisinde büyüme merkezleri sayısı) Tablo 3.1’de verilmiştir. Ginogenesis uyartım denemelerinde her bir soğan genotipinden 10 bitkiden çiçek tomurcuğu alınmıştır. Bu durumda çalışma kapsamında beş soğan genotipinden toplam 50 bitki kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan donör soğan genotiplerine ait genel özellikler.

Soğan Genotipleri	Tat	Baş Kabuğu Rengi	Baş Sarkan Kuru Yaprak Sayısı	Baş Şekli	Baş Büyüklüğü (gram)	Merkez Sayısı
BİYOM1 ^a	Acı	Beyaz	2-3	Basık Yuvarlak ve Yuvarlak	100-200	1-3
BİYOM2 ^a	Acı	Sarı	2-3	Basık Yuvarlak ve Yuvarlak	150-200	1-3
BİYOM3 ^a	Acı	Kırmızı	2-3	Basık Yuvarlak ve Yuvarlak	100-150	1-3
Yalova 12 ^b	Acı	Sarı	3-4	Basık Yuvarlak ve Yuvarlak	50-100	1-2
DELFO	Acı	Sarı	2-3	Basık Yuvarlak ve Yuvarlak	100-200	1-3

^aAçık tozlanan ıslah hattı

^bAçık tozlanan standart Türk çeşidi

^cAçık tozlanan standart yabancı çeşit

3.2. Yöntem

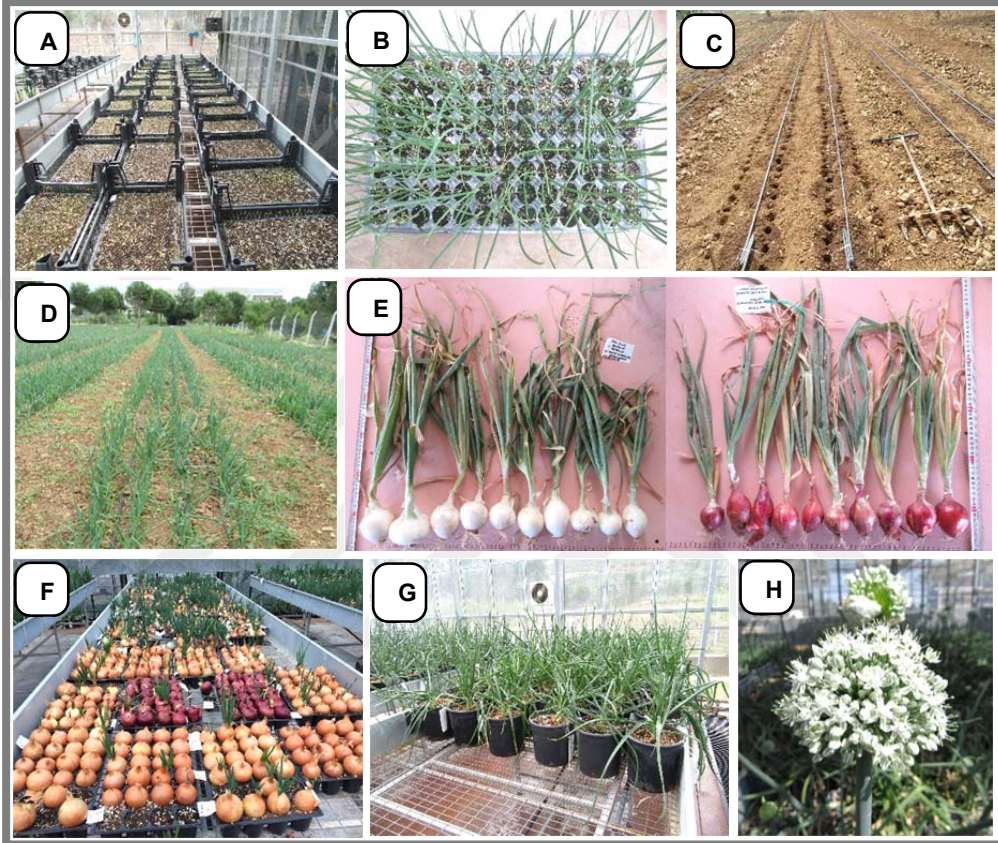
3.2.1. Soğan Tohumlarının Ekilmesi ve Baş Eldesi

Bir önceki yılın (2017) Aralık ayında, soğan genotiplerine ait tohumlar 2:1 oranında torf ve perlit içeren karışım ile doldurulmuş olan 104 lük plastik viyollere ekilmişlerdir. Her soğan genotipi için dört viyole ekim yapılmıştır (Toplam 20 viyol). Tohum ekimi yapılan viyoller ısıtmasız bir cam seraya transfer edilerek büyütme masalarına yerleştirilmişlerdir (Şekil 3.1.A). Tüm genotiplere ait tohumlar ekimden dört hafta kadar sonra yaklaşık %80 oranında çimlenme göstermişlerdir (Şekil 3.1.B). Mart ayında 4-5 yapraklı aşamaya ulaşmış olan soğan fideleri arazide hazırlanan parsellere dikilmişlerdir (Şekil 3.1.C). Araziye dikim sıra üzeri mesafe 10 cm ve sıra arası mesafe 30 cm olarak yapılmıştır. Soğan fideleri hasattan 15 gün öncesine kadar damla sulama sistemi ile sulanıp gübrelenmiştir. Soğan genotipleri standart soğan yetiştiriciliği yöntemleri ile büyütülmüş ve başlar temmuz ayı ortasında hasat edilmiştir (Şekil 3.1.D). Bir gölge evinde kurutulan soğan başları morfolojik olarak karakterize edilmişlerdir (Şekil 3.1.E). Soğan genotiplerine ait başlar fileli çuvalara konulup etiketlendikten sonra +5°C ye ayarlanmış bir depoya alınmış ve Aralık ayına kadar burada depolanmıştır.

3.2.2. Soğan Başlarının Dikilmesi ve Çiçeklenmelerinin Sağlanması

Aralık ayında depodan çıkarılan soğan başları torf ve perlit (2:1) karışımı ile doldurulmuş 24'lük plastik viyollere dikilerek ısıtmasız cam seraya transfer edilmişlerdir (Şekil 3.1.F). Viyollerde yeniden çimlendirilen bitkiler şubat ayı başında torf ve perlit karışımı ile doldurulmuş olan yedi litrelik plastik saksılara transfer edilmiştir (Şekil 3.1.G). Cam serada büyütülen bitkiler mart ayı içerisinde çiçek sapı oluşturmaya başlamıştır. Nisan ayı başlarında çiçek umbelleri belirginleşmeye başlamıştır. Nisan ayı ortasından itibaren umbellerdeki bazı açmamış çiçek tomurcukları ginogenesis uyartımı için uygun aşamaya ulaşmışlardır (Şekil 3.1.H). Umbellerdeki tomurcukların %10 kadarının antesis

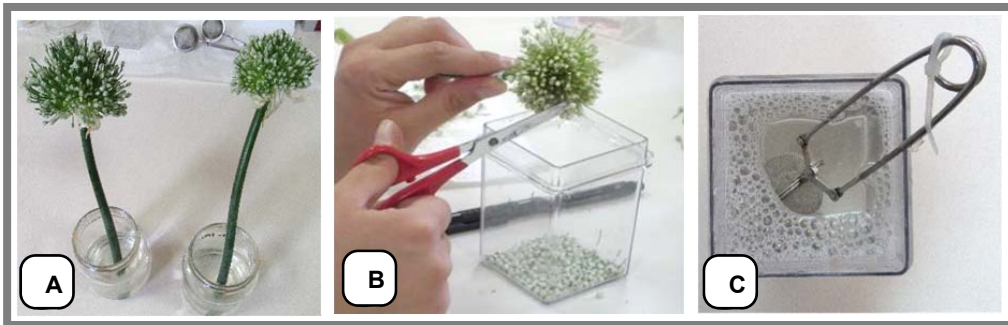
aşamasına ulaşmaya başladığı zaman umbeller 20-30 santimlik çiçek sapı ile birlikte kesilip laboratuvara getirilmişlerdir (Şekil 3.2.A).



Şekil3.1 A. Genotiplere ait tohumların viyollere ekilmesi. B. Genotiplere ait tohumların çimlenmesi. C. Çimlenen soğan fidelerinin araziye dikilmesi. D. Genotiplerin standart soğan yetiştiriciliği yöntemleri ile büyütülmesi. E. Genotiplerin hasat edilmesi ve morfolojik karakterizasyonu. F. Genotiplere ait soğan başlarının viyollere dikilerek çimlendirilmesi. G. Genotiplerin saksılara aktarılıp büyütülmesi. H. %10 antesis aşamasına gelen soğan çiçeği.

3.2.3. Ginogenesis Uyarımında Kullanılan Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyon İşlemi

Laboratuvara getirilen umbellerde bulunan açmış çiçek tomurcukları ginogenesis için geç aşamada olduğundan kopararak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.2.A). Araştırmacıların ginogenesis uyarımı için uygun olduğunu belirttiği antesisten 2-3 gün önceki aşamada bulunan açmamış çiçek tomurcukları (>3 mm) bir makas yardımıyla dikkatlice kesilip çay süzeğinde toplanmıştır (Şekil 3.2.B). Tomurcuklar kesilirken sap kısmının mümkün olduğunca kısa kesilmesine dikkat edilmiştir. Tomurcuk üzerinde uzun kalan saplar kültür aşamasında kallus oluşturup somatik embriyogenesis'e neden olacağı için bu çalışmada istenmeyen bir durumdur. Tomurcuklar yüzey sterilizasyonu amacıyla önce içinde %70'lik etanol bulunan kavanozda 30 saniye kadar tutulup daha sonra da içinde sterilizasyon solüsyonu (%15 clorax+%0,1 Tween-20) bulunan diğer bir kavanoza aktarılıp burada 30 dakika kadar bekletilmiştir (Şekil 3.2.C). Sterilizasyondan sonra tomurcuklar steril su ile üç defa 5'er dakika yıkanıp steril kurutma kağıtları üzerine serilerek ıslaklıklarının giderilmesi sağlanmıştır. Tüm sterilizasyon işlemleri steril kabinde, steril ekipman ile yapılmıştır.



Şekil3.2. A. Laboratuvara getirilen genotiplere ait umbellerin açmış çiçeklerinin uzaklaştırılması. B. Sterilizasyon işlemi için kesilen tomurcuklar. C. Sterilizasyon solüsyonuyla sterilizasyon işlemi.

3.2.4. Ginogenesis Uyarımı Çalışmalarında Kullanılan Besi Yerleri

Türk soğan genotiplerinde ginogenesis potansiyelinin ortaya çıkarılması için yapılmış deneylerde kullanılan besi ortamları, temel besi ortamlarının (Murashige ve Skoog, 1962) (Dunstan ve Short, 1977) modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Modifiye edilen bu besi ortamları Tablo 3.2 ve Tablo 3.3 de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan modifiye MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamlarının içerikleri.

Modifiye Murashige ve Skoog	MMS-1	MMS-2
<u>Makro Elementler</u>		
Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	1,650 mg/l	1,650 mg/l
Calcium chloride (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	332.02 mg/l	332.02 mg/l
Magnesium sulphate (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	180.54 mg/l	180.54 mg/l
Monopotassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	170 mg/l	170 mg/l
Potassium nitrate (KNO ₃)	1,900 mg/l.	1,900 mg/l.
<u>Mikro Elementler</u>		
Boric acid (H ₃ BO ₃)	6.20 mg/l	6.20 mg/l
Cobalt chloride (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025 mg/l	0.025 mg/l
Ferrous sulphate (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8 mg/l	27.8 mg/l
Manganese(II) sulphate (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	16.90 mg/l	16.90 mg/l
Potassium iodide (KI)	0.83 mg/l	0.83 mg/l
Sodium molybdate (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25 mg/l	0.25 mg/l
Zinc sulphate (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.6 mg/l	8.6 mg/l
Ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium (NaFe-EDTA)	37.26 mg/l	37.26 mg/l
Copper sulphate (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025 mg/l	0.025 mg/l
<u>Vitaminler, Hormonlar ve Organikler</u>		
Myo-Inositol	500 mg/l	500 mg/l
Nicotinic Acid	1 mg/l	1 mg/l
Pyridoxine · HCl	1 mg/l	1 mg/l
Thiamine · HCl	10 mg/l	10 mg/l
L-prolin	200 mg/l	200 mg/l
Sukroz	100 g/l	30 g/l
BAP	2 mg/l	-
2,4-D	2 mg/l	-
PH	5.8	5.8
Agar	7 g/l	7 g/l

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan modifiye BDS (Dunstan ve Short, 1977) besi ortamlarının içerikleri.

Modifiye BDS besi ortamı	MBDS-1	MBDS-2
<u>Makro Elementler</u>		
Ammonium phosphate monobasic (NH ₄ H ₂ PO ₄)	230 mg/l	230 mg/l
Calcium chloride (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	150 mg/l	150 mg/l
Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	150 mg/l	150 mg/l
Potassium nitrate (KNO ₃)	2530 mg/l	2530 mg/l
Magnesium sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	247 mg/l	247 mg/l
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	134 mg/l	134 mg/l
Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	320 mg/l	320 mg/l
<u>Mikro Elementler</u>		
Cobalt chloride (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025 mg/l	0.025 mg/l
Manganese(II) sulphate (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	13.20 mg/l	13.20 mg/l
Potassium iodide (KI)	0.75 mg/l	0.75 mg/l
Sodium molybdate (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25 mg/l	0.25 mg/l
Zinc sulphate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	2 mg/l	2 mg/l
Copper sulphate (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025 mg/l	0.025 mg/l
<u>Vitaminler, Hormonlar ve Organikler</u>		
Myo-Inositol	500 mg/l	500 mg/l
L-prolin	200 mg/l	200 mg/l
Nicotinic Acid	1 mg/l	1 mg/l
Pyridoxine · HCl	1 mg/l	1 mg/l
Thiamine · HCl	10 mg/l	10 mg/l
Sukroz	100 g/l	30 g/l
BAP	2 mg/l	-
2,4-D	2 mg/l	-
PH	5.8	5.8
Agar	7 g/l	7 g/l

Çalışmada elde edilen ginogenik bitkicikler bulundukları besi ortamlarından alınarak Alan ve ark (2016) tarafından geliştirilen bitki büyütme besi yerine aktarılmıştır. Bu sayede bitkicikler stres koşullarından uzaklaştırılarak daha iyi bir şekilde gelişip büyümeleri sağlanmıştır.

3.2.5. Besi Yerlerinin Hazırlanışı

Türk soğan genotiplerinde ginogenesis çalışmalarında kullanılacak olan besi yerleri hazırlanırken sıvı stoklar kullanılmıştır. MS makro, BDS makro ve Bitki büyütme stokları 10 kat (10x) yoğunlaştırılmış şekilde hazırlanmıştır. MS mikro, BDS mikro, Bitki büyütme ve FeEDTA stokları ise 100 kat (100x) yoğunlaştırılmış şekilde hazırlanmıştır. Besi yeri yapımında distile saf su kullanılmıştır.

Besi yeri hazırlanırken makro stok, mikro stok, Fe EDTA stok, şeker, vitaminler ve büyümeyi düzenleyiciler eklenip istenilen hacim saf su ile tamamlandıktan sonra pH değeri ölçülmüştür. pH'ı istenilen değere ayarlamak için Sodyum hidroksit (NaOH) ve Hidroklorik asit (HCl) kullanılmıştır. pH istenilen değere ulaştıktan sonra ortam katılaştırıcısı olan agar eklenmiştir. Daha sonra besi yerinin sterilizasyonu için otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınçta 20 dakika tutulmuştur. Otoklavdan çıkarılan besi yeri steril kabin içerisine alınmıştır. Steril kabin içerisinde besi yerinin sıcaklığı 50°-60°C civarına düştüğünde 90x15mm'lik petrilere 30ml besi yeri dökülerek soğuyup katılaşmaları sağlanmıştır.

3.2.6. Farklı Besi Yerleri Dağılımı

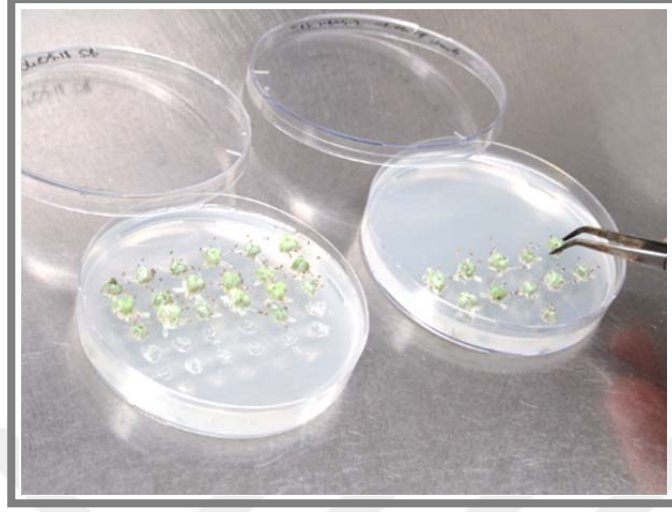
Çalışmada uyartım amacıyla kullanılan tomurcukların bazıları sadece bir ortamda kültüre konulur iken bazıları kültür başlangıcından 21 gün sonra alt kültüre aktarılmıştır. Bu durumda tüm tomurcuklar, MBDS-1, MMS-1, MMS-2, MBDS-2, önce MBDS-1 21 gün sonra MBDS-2 (MBDS-1/MBDS-2) ve önce MMS-1 21 gün sonra MMS-2 (MMS-1/MMS-2) besi ortamında kültüre alınmışlardır.

3.2.7. Ginogenesis Uyarımında Kullanın Genotiplere Ait Çiçek Tomurcuklarının Uyarım Kültürüne Alınmaları

Sterilizasyon işleminden sonra steril kurutma kâğıdı arasında nemi alınan tomurcuklar bekletilmeden 30ml uyarım besi ortamı içeren petrilere ekilmiştir. Tomurcukların petri içine eşit mesafede 5'erli 6 sıra olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Her petriye toplamda 30 adet tomurcuk ekilmiştir. Petrilere ekim işleminden sonra hat adı, besi yeri ve kültüre alınma tarihi bilgileri yazılmıştır. Bu çalışmada bir genotip için yaklaşık 3000 tomurcuk MMS-1 ve MBDS-1 uyarım besi yerlerine ekilmiştir. Bunun yanında MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine kontrol grubu olarak her genotipten tomurcuklar ekilmiştir. Toplamda beş genotipten yaklaşık 29000 tomurcuk ekimi yapılmıştır. Ekim işlemi biten petriler büyütme odasına alınmıştır. Ginogenesis uyarım kültürleri, Alan ve ark. (2016) tarafından yayınlanmış olan kültür koşullarında büyütülmüştür. Bu aşamadan sonra kültürler yedi gün arayla gözlemlenmiştir.

3.2.8. Genotiplere Ait Çiçek Tomurcuklarının 21.Günde Aktarılma İşlemi

Büyütme odasında gözlemleri yapılan kültürlerin yaklaşık yarısı 21.günde alt kültüre alınmıştır. Her genotipe ait tomurcukların MMS-1 besi yerine ekilenlerinin %50'si MMS-2 ye, MBDS-1 besi yerine ekilen tomurcukların %50'si MBDS-2 besi yerine aktarılmıştır. Aktarma işlemlerinin tamamı steril kabinde steril ekipmanlarla yapılmıştır (Şekil 3.3.). Bu işlemten sonra kültürler tekrar büyütme odasına konularak 7 gün arayla gözlemleri yapılmıştır.



Şekil3.3. Genotiplere ait ekilmiş tomurcukların 21. günde diğer besi yerine aktarılma işlemi.

3.2.9. Gözlemlerde Uyarıtma Tepki Veren Tomurcukların Bitki Büyütme Besi Yeri İçeren Ortama Aktarılması

Büyütme odasındaki kültürlerin gözlem aşamasında tespit edilen tomurcuklarından çıkmakta olan ginogenik ve somatik bitkicikler daha iyi gelişim sağlayabilmesi ve stres ortamından uzaklaştırılması için bulunduğu uyarıtım ortamından tomurcuğu ile birlikte alınarak bitki büyütme besi yeri (Alan ve ark, 2016) içeren petrilere aktarılmıştır. Tüm bu işlemler steril ekipmanlarla steril kabin içerisinde yapılmıştır. Bitki büyütme besi yerine alınan bitkicikler büyütme odasına konularak gözlemlenmeye devam edilmiştir.

3.2.10. Uyarıtım Sonucu Tomurcuklardan Elde Edilmiş Bitkiciklerin Bitki Büyütme Besi Yeri İçeren Cam Tüplere Aktarılması

Büyütme odasında gözlemlenen, tomurcuk içerisinden gelen ginogenik ve somatik bitkicikler aktarıldıkları bitki büyütme besi yeri içeren petrilere de yeteri büyüklüğe ulaştıklarında, bitki büyütme besi yeri içeren cam tüpler içerisine aktarılmışlardır. Tüm bu işlemler steril ekipmanlarla steril kabin içerisinde

gerçekleştirilmiştir. Tüplere aktarılan bitkicikler büyütme odasına konularak gelişimlerinin devam etmeleri sağlanmıştır. Gelişip bitki haline gelen bitkiler ploidi seviyesi tespiti için hazır hale gelmişlerdir.

3.2.11. Çalışmada Elde Edilen Bitkilerden Örnek Alınması, Örnek Hazırlanması ve Ploidi Seviye Tespiti

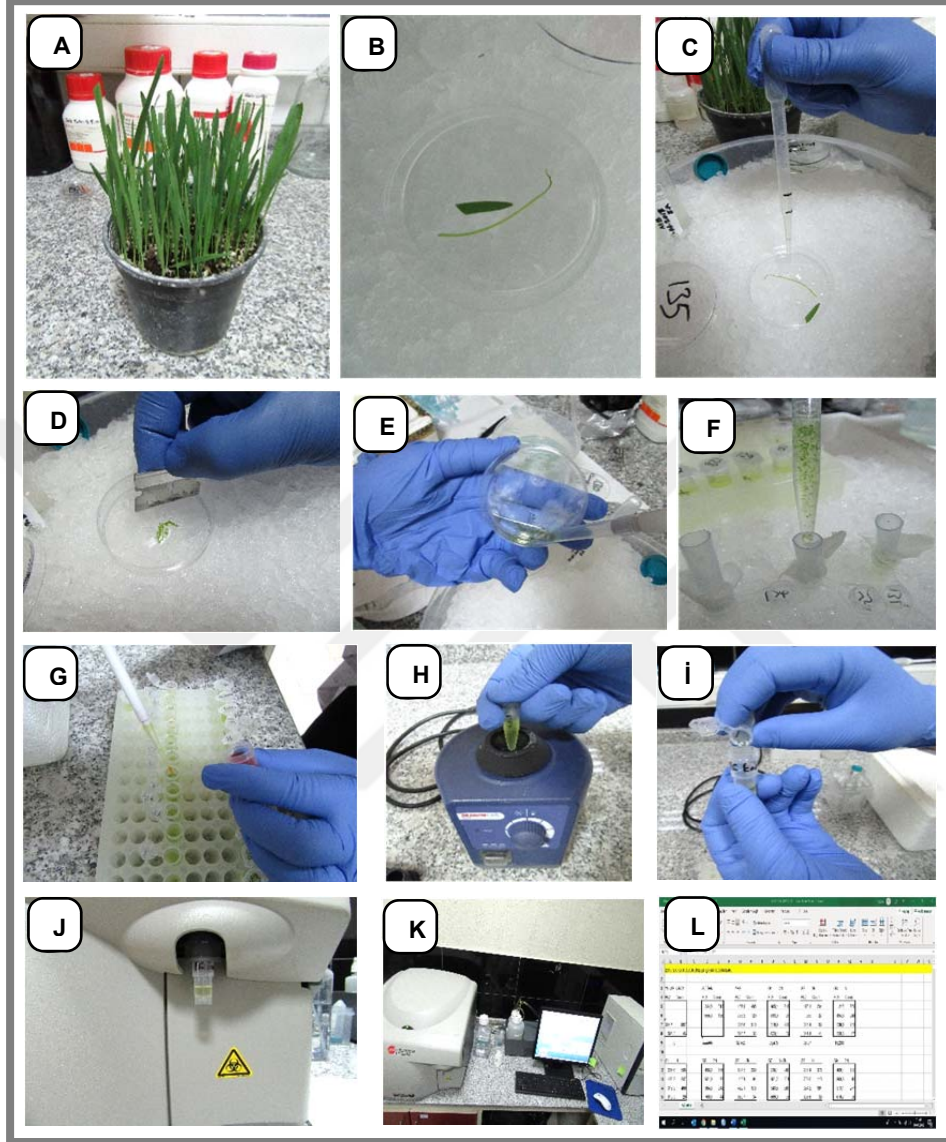
Soğan bitkisinin herhangi bir dokusundan alınan örneklerde nükleer DNA miktarının flow sitometri analizi ile hızlı ve güvenilir ploidi tespiti yapılabildiği için bu çalışmada ploidi tespiti flow sitometri ile yapılmıştır. Diploid olan bir soğan bitkisinin genç yapraklarından alınan dokudaki G1 fazındaki hücrelerin çekirdekleri flow sitometri histogramında ~32 pg/DNA ya karşılık gelmektedir. (Arumuganathan ve Earle, 1991). Bu durumda ginogenik bitkilerden alınan dokularla yapılan analizlerde haploid bitkilerden elde edilen G1 fazındaki çekirdeklerin ~16 pg/DNA'ya karşılık gelmesi beklenmektedir.

Bu çalışmada elde edilmiş olan ginogenik bitkilerde nükleer DNA miktarı ve ploidi tespiti, Alan ve ark (2016) tarafından geliştirilen protokole göre yapılmıştır. Tüplerde 3-4 yapraklı hale gelen bitkiler ploidi seviye tespiti örnek alımı için uygun aşamadır. Ploidi seviye tespiti için soğan bitkisinde kontrol olarak Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisi kullanılmıştır. Ploidi seviye tespiti yapmadan yaklaşık 2-3 hafta önce arpa tohumları bir saksıya ekilerek çimlenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.5.A). Steril kabin içerisinde soğan bitkilerinin yapraklarından steril bir makas yardımı ile dokular alınarak buz dolu bir kap üzerinde duran petrilerin içerisine konulmuştur (Şekil 3.5.B). Ploidi analizi yapılacak bitkilerden 50 mg ve kontrol olarak kullanılan arpa bitkisinden yaklaşık 5 mg alınarak üzerlerine 1 ml Nuclei isolation buffer (Alan ve ark, 2016) çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.5.C). Jilet yardımı ile dokular parçalanarak hücre içerisindeki nükleer DNA'nın açığa çıkması sağlanmıştır (Şekil 3.5.D). Parçalama işleminden sonra 0,5 ml Nuclei isolation çözeltisi daha eklenerek bir filtre yardımı ile 2 ml'lik eppendorf tüp içerisine süzölmüştür (Şekil 3.5.F). Tüm bu aşamalar örneklerin bozulmaması

için buz dolu bir kap üzerinde yapılmıştır. Örnekler test edilmeden önce 1 mg/ml’lik Propidium iodide 10 µl eklenerek (Şekil 3.5.G) vortekslenmiştir (Şekil 3.5.H). Bu aşamadan sonra örnekler cihaz da ploidi seviyesi testi için hazır hale gelmiştir (Şekil 3.5.J). Ploidi seviye tespiti analizi sonucunda soğan genotiplerinin ploidi seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 3.5.L). Tüm bu işlemler Alan ve ark (2016) tarafından geliştirilen protokole göre yapılmıştır. Ploidi seviyesi hesaplama formülü Şekil 3.4’de verilmiştir.

$$\text{Örnek Soğanın Nükleer DNA miktarı} = \frac{\text{Örnek Soğanın Florasan Değeri}}{\text{Arpa'nın Florasan Değeri}} \times \text{Arpa'nın Nükleer DNA miktarı}$$

Şekil3.4. Nükleer DNA miktarı hesaplanmasında kullanılan formül. (Alan ve ark, 2016)



Şekil3.5. Çimlendirilmiş Arpa bitkisi. B. Soğan ve Arpa bitkisinden alınan örnekler. C. Örnekler Nuclei isolation buffer eklenmesi. D. Jilet ile parçalama aşaması. E. Pipet ile örneklerin alınması. F. Örneklerin filtreden geçirilmesi. G. Örnekler Propidium iodide eklenmesi. H. Örneklerin vortekslenmesi. İ. Örneklerin cihazın analiz kabına aktarılması. J. Örneklerin flow sitometri cihazına yerleştirilmesi. K. Flow sitometri analizinin yapılması. L. Analiz sonucu nükleer DNA'nın hesaplanması.

3.2.12. İncelenen Kriterler ve İstatiksel Analiz

Bu çalışmada tomurcuklar kültüre alındıktan sonra haftalık olarak gözlemlenmiştir. Kültüre alınan tomurcuklarda İncelenen kriterler uyartılan tomurcuk sayısı, elde edilen ginogenik bitkicik sayısı ve elde edilen ginogenik bitki sayısıdır. Somatik olarak elde edilen bitkicikler ve somatik olarak elde edilen bitkiler de incelenen kriterler içerisinde yer almaktadır. Yapılan flow sitometri analizi sonucu kromozom miktarlarının haploid, diploid ve mixoploid durumları incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, uyartılan tomurcuk sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Ginogenik bitkicik sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Ginogenik bitki sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Somatik uyartım sonuçları ise uyartılan somatik tomurcuk sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Somatik bitkicik sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Somatik bitki sayılarının ekimi yapılan besi yerine ait toplam tomurcuk sayısına oranı hesaplanmıştır. Flow sitometri analizleri ile elde edilen sonuçlar ise, haploid olarak tespit edilen bitkilerin genotipe ait toplam test edilen bitki sayısına oranı hesaplanmıştır. Diploid olarak tespit edilen bitkilerin genotipe ait toplam test edilen bitki sayısına oranı hesaplanmıştır. Mixoploid olarak tespit edilen bitkilerin genotipe ait toplam test edilen bitki sayısına oranı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar yüzde (%) olarak gösterilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada ilk etapta dört farklı besi ortamına (MMS-1, MBDS-1, MMS-2, ve MBDS-2) toplamda 29010 adet açmamış soğan çiçek tomurcuğu ekilerek ginogenesis için test edilmiştir. Tomurcukların büyük çoğunluğu ilk aşamada MMS-1 ve MBDS-1 besi yerlerine ekilip 21. günde MMS-1 besi yerinde yer alan tomurcukların %50'si MMS-2 besi yerine alt kültüre alınmıştır. MBDS-1 besi yerinde yer alan tomurcukların %50'si MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınmıştır. Tablo 4.1'de ekimi yapılan tomurcuk miktarları verilmiştir. Tablo 4.2'de 21. günde alt kültüre alınan genotiplere ait tomurcuk miktarları verilmiştir. Kültüre alınan tomurcuklar gözlemler sırasında ilk hafta içerisinde gelişimlerine devam edip kapalı tomurcuk formundan açık tomurcuk formuna geçmişlerdir. Tomurcuklar 2-3 hafta içerisinde büyüklükleri en boy olarak artmıştır. 21. günde yöntemde belirtildiği gibi tomurcukların bir kısmı alt kültüre alınarak ginogenik uyartım etkisi gözlemlenmiştir. Kültüre alınan tomurcukların bazıları somatik rejenerasyon göstermiştir. Somatik rejenerasyon tomurcukların sap ve taç yaprak gibi vegetatif kısımlardan meydana gelen kalluslardan oluşmuştur. Elde edilen çoğu ginogenik bitkicikler tomurcuğun yumurtalıklarının içerisinde geldiği için gözlem sırasında ayırt edilebilmektedir. Oluşan tüm bitkiciklerden örnekler alınarak flow sitometri analizi sonucunda ploidi seviyeleri belirlenmiştir.

Tablo4.1. Genotiplere ait ekimi yapılan tomurcuk sayıları.

Genotip	Besi yerleri ve ekilen tomurcuk sayıları			
	MMS-1	MBDS-1	MMS-2	MBDS-2
BİYOM1 ^a	900	4590	540	870
BİYOM2 ^a	750	1050	570	900
BİYOM3 ^a	630	1290	480	390
Yalova 12 ^b	2520	5340	300	420
DELFOS	2070	4560	270	270

^aAçık tozlanan ıslah hattı^bAçık tozlanan standart Türk çeşidi^cAçık tozlanan standart yabancı çeşit

Tablo4.2. Genotiplere ait ekimi yapılan tomurcukların 21. günde alt kültüre aktarılan tomurcuk miktarları.

Genotip	MMS-1→MMS-2	MBDS1→MBDS-2
BİYOM1 ^a	390	1800
BİYOM2 ^a	450	540
BİYOM3 ^a	210	540
Yalova 12 ^b	840	1830
DELFOS ^c	690	2040

^aAçık tozlanan ıslah hattı^bAçık tozlanan standart Türk çeşidi^cAçık tozlanan standart yabancı çeşit

4.1. Genotiplerin Ginogenesis Uyarım Sonuçları

Farklı besi ortamlarında genotiplerin ginogenesis uyarımı sonucu oluşan bitkiciklere örnek Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de gösterilmiştir. Gözlemler sırasında tespit edilen genotiplere ait ginogenik bitkicikler binoküler mikroskop yardımı ile görüntülenmiştir.



şekil4.1. BİYOM1 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik



şekil4.2. BİYOM2 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MMS-1/MMS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik.



şekil4.3. BİYOM3 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1/MBDS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik.



şekil4.4. Yalova12 genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1 besi yerinde tomurcuktan gelişen embriyo.



Şekil4.5. DELFOS genotipine ait ginogenesis uyartımı sonucu MBDS-1/MBDS-2 besi yerinde tomurcuktan gelişen bitkicik.

4.1.1. BİYOM1 Genotipinin Ginogenesis Uyartımı

BİYOM1 genotipinden toplamda 6900 adet tomurcuk kültüre alınmış ve 21. günde 2190 adet tomurcuk alt kültüre alınmıştır. MMS-1 besi yerinde 510 adet tomurcuktan ginogenesis beş (%0,98) adet tomurcuk cevap vermiştir. Beş adet tomurcuktan beş (%0,98) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin iki (%0,39) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinde 2790 adet tomurcuktan ginogenesis 55 (%1,97) adet tomurcuk cevap vermiştir. 55 adet tomurcuktan 56 (%2) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin 45 (%0,61) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-2 besi yerinde 540 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-2 besi yerinde 870 adet tomurcuktan ginogenesis sekiz (%0,92) adet tomurcuk cevap vermiştir. Sekiz adet tomurcuktan sekiz (%0,92) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin beş (%0,57) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1 besi yerinden 21. günde MMS-2 besi yerine alt kültüre alınan 390 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-1 besi yerinden 21. günde MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 1800 adet

tomurcuktan ginogenesisise 11 (%0,61) adet tomurcuk cevap vermiştir. 11 adet tomurcuktan 11 (%0,61) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin 10 (%0,55) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür.

BİYOM1 genotipinden toplamda 6900 adet tomurcuk farklı besi yerlerine ekilerek uyartım gözlenmiştir ve bunun sonucunda BİYOM1 genotipinden toplamda 79 (%1,15) adet tomurcuk uyartımı gerçekleşerek 80 (%1,16) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 62 (%0,90) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1, MBDS-1, MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine ekilen BİYOM1 genotipine ait 4710 adet tomurcuktan toplamda 68 (%1,44) adet tomurcuk ginogenesis uyartıma cevap vermiştir. 68 adet tomurcuktan 69 (%1,46) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 52 (%1,10) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Alt kültüre alınan BİYOM1 genotipine ait 2190 adet tomurcuktan toplam 11 (%0,50) adet tomurcuk uyartıma cevap vermiştir. 11 adet tomurcuktan 11 (%0,50) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 10 (%0,45) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. BİYOM1 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesisise verdiği cevap Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo4.3. BİYOM1 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyartılan tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)
BİYOM1	MMS-1	510	5 (%0,98)	5 (%0,98)	2 (%0,39)
	MBDS-1	2790	55 (%1,97)	56 (%2)	45 (%0,61)
	MMS-2	540	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MBDS-2	870	8 (%0,92)	8 (%0,92)	5 (%0,57)
	MMS-1→MMS-2	390	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MBDS-1→MBDS-2	1800	11 (%0,61)	11 (%0,61)	10 (%0,55)
Σ Toplam		6900	79 (%1,15)	80 (%1,16)	62 (%0,90)

4.1.2. BİYOM2 Genotipinin Ginogenesis Uyartımı

BİYOM2 genotipinden toplamda 3270 adet tomurcuk kültüre alınmış ve 21. günde 990 adet tomurcuk alt kültüre alınmıştır. MMS-1 besi yerinde 300 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-1 besi yerinde 510 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına iki (%0,39) adet tomurcuk cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan üç (%0,59) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin iki (%0,39) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-2 besi yerinde 570 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-2 besi yerinde 900 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MMS-1 besi yerinden 21. günde MMS-2 besi yerine alt kültüre alınan 450 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına iki (%0,44) adet tomurcuk cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan üç (%0,66) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin hepsi (%0,66) ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinden 21. günde MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 540 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır.

BİYOM2 genotipinden toplamda 3270 adet tomurcuk farklı besi yerlerine ekilerek uyartım gözlenmiştir ve bunun sonucunda BİYOM2 genotipinden toplamda dört (%0,12) adet tomurcuk uyartımı gerçekleşerek altı (%0,18) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin beş (%0,15) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1, MBDS-1, MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine ekilen BİYOM2 genotipine ait 2280 adet tomurcuktan toplamda iki (%0,08) adet tomurcuk ginogenesis uyartıma cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan üç (%0,13) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin iki (%0,09) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Alt kültüre alınan BİYOM2 genotipine ait 990 adet tomurcuktan toplam iki (%0,20) adet tomurcuk uyartıma cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan üç (%0,30) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin hepsi (%0,30) ginogenik bitkiye dönüşmüştür. BİYOM2 genotipinin ginogenesisise verdiği cevap Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo4.4. BİYOM2 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyartılan tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)
BİYOM2	MMS-1	300	0 (%0)	0 (%0)	0
	MBDS-1	510	2 (%0,39)	3 (%0,59)	2 (%0,39)
	MMS-2	570	0 (%0)	0 (%0)	0
	MBDS-2	900	0 (%0)	0 (%0)	0
	MMS-1→MMS-2	450	2 (%0,44)	3 (%0,66)	3 (%0,66)
	MBDS-1→MBDS-2	540	0 (%0)	0 (%0)	0
Σ Toplam		3270	4 (%0,12)	6 (%0,18)	5 (%0,15)

4.1.3. BİYOM3 Genotipinin Ginogenesis Uyartımı

BİYOM3 genotipinden toplamda 3090 adet tomurcuk kültüre alınmış ve 21. günde 1050 adet tomurcuk alt kültüre alınmıştır. MMS-1 besi yerinde 420 adet

tomurcuktan ginogenesis uyartımına bir (%0,24) adet tomurcuk cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir adet (%0,24) ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkicik (%0,24) ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinde 750 adet tomurcuktan ginogenesisise iki (%0,27) adet tomurcuk cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan iki (%0,27) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin bir (%0,13) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-2 besi yerinde 480 adet tomurcuktan ginogenesisise cevap alınamamıştır. MBDS-2 besi yerinde 390 adet tomurcuktan ginogenesisise cevap alınamamıştır. MMS-1 besi yerinden 21. günde MMS-2 besi yerine alt kültüre alınan 210 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-1 besi yerinden 21. günde MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 840 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına beş (%0,60) adet tomurcuk cevap vermiştir. Beş adet tomurcuktan beş (%0,60) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerden iki (%0,24) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür.

BİYOM3 genotipinden toplamda 3090 adet tomurcuk farklı besi yerlerine ekilerek uyartım gözlenmiştir. Bunun sonucunda BİYOM3 genotipinden toplamda sekiz (%0,26) adet tomurcuk uyartımı gerçekleşerek sekiz (%0,26) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin dört (%0,13) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1, MBDS-1, MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine ekilen BİYOM2 genotipine ait 2040 adet tomurcuktan toplamda üç (%0,14) adet tomurcuk ginogenesis uyartıma cevap vermiştir. Üç adet tomurcuktan üç (%0,14) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin iki (%0,10) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Alt kültüre alınan BİYOM3 genotipine ait 1050 adet tomurcuktan toplam beş (%0,48) adet tomurcuk uyartıma cevap vermiştir. Beş adet tomurcuktan beş (%0,48) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin iki (%0,19) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. BİYOM3 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo4.5. BİYOM3 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyartılan tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)
BİYOM3	MMS-1	420	1 (%0,24)	1 (%0,24)	1 (%0,24)
	MBDS-1	750	2 (%0,27)	2 (%0,27)	1 (%0,13)
	MMS-2	480	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MBDS-2	390	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MMS-1→MMS-2	210	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MBDS-1→MBDS-2	840	5 (%0,60)	5 (%0,60)	2 (%0,24)
	Σ Toplam	3090	8 (%0,26)	8 (%0,26)	4 (%0,13)

4.1.4. Yalova 12 Genotipinin Ginogenesis Uyartımı

Yalova 12 genotipinden toplamda 8580 adet tomurcuk kültüre alınmış ve 21. günde 2670 adet tomurcuk alt kültüre alınmıştır. MMS-1 besi yerinde 1680 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına iki (%0,12) adet tomurcuk cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan iki (%0,12) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin hepsi (%0,12) ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinde 3510 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına 25 (%0,71) adet tomurcuk cevap vermiştir. 25 adet tomurcuktan 25 (%0,71) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin 20 (%0,57) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-2 besi yerinde 300 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-2 besi yerinde 420 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MMS-1 besi yerinden 21. günde MMS-2 besi yerine alt kültüre alınan 840 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına bir (%0,12) adet tomurcuk cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir (%0,12) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu bitkicik (%0,12) ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinden 21. günde MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 1830 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına yedi (%0,38) adet tomurcuk cevap vermiştir.

Yedi adet tomurcuktan yedi (%0,38) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin altı (%0,33) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür.

Yalova 12 genotipinden toplamda 8580 adet tomurcuk farklı besi yerlerine ekilerek uyartım gözlenmiştir ve bunun sonucunda Yalova 12 genotipinden toplamda 35 (%0,40) adet tomurcuk uyartımı gerçekleşerek 35 (%0,40) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 29 (%0,34) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1, MBDS-1, MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine ekilen Yalova 12 genotipine ait 5910 adet tomurcuktan toplamda 27 (%0,46) adet tomurcuk ginogenesis uyartıma cevap vermiştir. 27 adet tomurcuktan 27 (%0,46) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 22 (%0,32) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Alt kültüre alınan Yalova 12 genotipine ait 2670 adet tomurcuktan toplam sekiz (%0,30) adet tomurcuk uyartıma cevap vermiştir. Sekiz adet tomurcuktan sekiz (%0,30) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin yedi (%0,26) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Yalova 12 genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis verdiğini cevap Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Tablo4.6. Yalova 12 Genotipinin farklı besi yerlerinde uyartım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyartılan tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)
Yalova 12	MMS-1	1680	2 (%0,12)	2 (%0,12)	2 (%0,12)
	MBDS-1	3510	25 (%0,71)	25 (%0,71)	20 (%0,57)
	MMS-2	300	0 (%)	0 (%)	0 (%)
	MBDS-2	420	0 (%)	0 (%)	0 (%)
	MMS-1→MMS-2	840	1 (%0,12)	1 (%0,12)	1 (%0,12)
	MBDS-1→MBDS-2	1830	7 (%0,38)	7 (%0,38)	6 (%0,33)
Σ Toplam		8580	35 (%0,40)	35 (%0,40)	29 (%0,34)

4.1.5. DELFOS Genotipinin Ginogenesis Uyartımı

DELFOS genotipinden toplamda 7170 adet tomurcuk kültüre alınmış ve 21. günde 2730 adet tomurcuk alt kültüre alınmıştır. MMS-1 besi yerinde 1380 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına 10 (%0,72) adet tomurcuk cevap vermiştir. 10 adet tomurcuktan 11 (%0,80) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin üç (%0,22) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinde 2520 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına 13 (%0,52) adet tomurcuk cevap vermiştir. 13 adet tomurcuktan 13 (%0,52) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin yedi (%0,28) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-2 besi yerinde 270 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MBDS-2 besi yerinde 270 adet tomurcuktan ginogenesis uyartımına cevap alınamamıştır. MMS-1 besi yerinden 21. günde MMS-2 besi yerine alt kültüre alınan 690 adet tomurcuktan 10 (%1,45) adet tomurcuk ginogenesis uyartımına cevap vermiştir. 10 adet tomurcuktan 10 (%1,45) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin altı (%0,87) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinden 21. günde MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 2040 adet tomurcuktan 21 (%1,03) adet tomurcuk ginogenesis uyartımına cevap vermiştir. 21 adet tomurcuktan 22 (%1,08) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Bu ginogenik bitkiciklerin 20 (%0,98) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür.

DELFOS genotipinden toplamda 7170 adet tomurcuk farklı besi yerlerine ekilerek uyartım gözlenmiştir ve bunun sonucunda DELFOS genotipinden toplamda 54 (%0,75) adet tomurcuk uyartımı gerçekleşerek 56 (%0,78) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 36 (%0,50) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. MMS-1, MBDS-1, MMS-2 ve MBDS-2 besi yerlerine ekilen DELFOS genotipine ait 4440 adet tomurcuktan toplamda 23 (%0,52) adet tomurcuk ginogenesis uyartıma cevap vermiştir. 23 adet tomurcuktan 24 (%0,54) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 10 (%0,23) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. Alt kültüre alınan

DELFOF genotipine ait 2730 adet tomurcuktan toplam 31 (%1,14) adet tomurcuk uyarıtıma cevap vermiştir. 31 adet tomurcuktan 32 (%1,17) adet ginogenik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen ginogenik bitkiciklerin 26 (%0,95) tanesi ginogenik bitkiye dönüşmüştür. DELFOF genotipinin farklı besi yerlerinde uyarıtım sonucunda ginogenesisine verdiği cevap Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo4.7. DELFOF Genotipinin farklı besi yerlerinde uyarıtım sonucunda ginogenesis oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyarılan tomurcuk sayısı (%)	Ginogenik bitkicik sayısı (%)	Ginogenik bitki sayısı (%)
DELFOF	MMS-1	1380	10 (%0,72)	11 (%0,80)	3 (%0,22)
	MBDS-1	2520	13 (%0,52)	13 (%0,52)	7 (%0,28)
	MMS-2	270	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MBDS-2	270	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	MMS-1→MMS-2	690	10 (%1,45)	10 (%1,45)	6 (%0,87)
	MBDS-1→MBDS-2	2040	21 (%1,03)	22 (%1,08)	20 (%0,98)
Σ Toplam		7170	54 (%0,75)	56 (%0,78)	36 (%0,50)

4.2. Genotiplerin Somatik Uyarıtım Sonuçları

Genotiplere ait tomurcuklar kültüre alındıktan sonra düşük oranda somatik uyarıtım gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Tomurcuklar kültüre alınmadan önceki hazırlık aşamasında, tomurcukların çiçek sapından keserken sap kısmının bir miktar tomurcuk üzerinde kalmasından kaynaklı kallus oluşmaktadır. Bu dokular üzerinden somatik uyarıtım gerçekleşerek bitkiler elde edilmiştir. Şekil 4.6’da somatik uyarıtıma cevap veren tomurcuktan elde edilen bitkicik gösterilmiştir.

BİYOM1 genotipinde MMS-1 besi yerine 510 adet tomurcuk kültüre alınmış olup bu tomurcuklardan bir (%0,19) adet tomurcuk somatik uyarıtıma cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir (%0,19) adet bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkicik somatik bitkiye dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerine 2790 adet tomurcuk kültüre alınmış olup bu tomurcuklardan iki (%0,07) adet tomurcuk

somatik uyartıma cevap vermiştir. İki adet tomurcuktan iki (%0,07) adet bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkicikler somatik bitkilere dönüşmüştür. MBDS-1 besi yerinden 21 gün sonra MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 1800 adet tomurcuktan bir (%0,05) adet tomurcuk somatik uyartıma cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir (%0,05) adet bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkicik somatik bitkiye dönüşmüştür. BİYOM2 genotipinden toplamda 3270 adet tomurcuk kültüre alınmıştır fakat somatik uyartıma bu genotipten hiç cevap alınamamıştır. BİYOM3 genotipinden MBDS-1 besi yerinden 21 gün sonra MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 840 adet tomurcuktan bir (%0,12) adet tomurcuk somatik uyartıma cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir (%0,12) adet somatik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkicik somatik bitkiye dönüşmüştür.

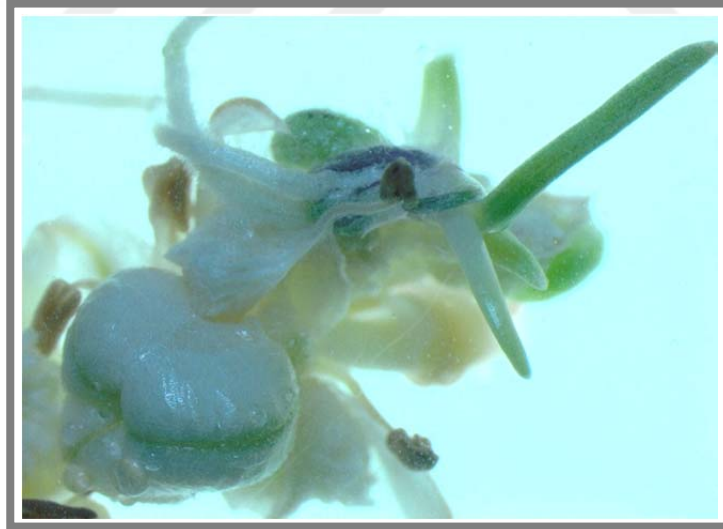
YALOVA 12 genotipinden MBDS-1 besi yerinden 21 gün sonra MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınan 1830 adet tomurcuktan dört (%0,22) adet tomurcuk somatik uyartıma cevap vermiştir. Dört adet tomurcuktan dört (%0,22) adet somatik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bitkicikler somatik bitkilere dönüşmüştür.

DELFOS genotipinde MMS-1 besi yerinde 1380 adet tomurcuktan bir (%0,07) adet tomurcuk somatik uyartıma cevap vermiştir. Bir adet tomurcuktan bir (%0,07) adet somatik bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkicik somatik bitkiye dönüşmüştür. Genotiplere ait somatik uyartıma alınan cevaplar Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada uyartım sonucunda toplamda 28710 adet tomurcuktan 18 (%0,06) adet tomurcuk somatik olarak uyartılmıştır. Bu tomurcuklardan 18 (%0,06) adet bitki elde edilmiştir.

Tablo4.8. Genotiplerin farklı besi yerlerinde somatik uyartım oluşum oranları.

Genotip	Besi yeri	Tomurcuk sayısı	Uyartılan tomurcuk sayısı (%)	Somatik bitkicik sayısı (%)	Somatik bitki sayısı (%)
BİYOM1	MMS-1	510	1 (%0,19)	1 (%0,19)	1 (%0,19)
	MBDS-1	2790	2 (%0,07)	2 (%0,07)	2 (%0,07)
	MBDS-1→MBDS-2	1800	1 (%0,05)	1 (%0,05)	1(%0,05)
BİYOM2	-	3270	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
BİYOM3	MBDS-1→MBDS-2	840	1 (%0,12)	1 (%0,12)	1 (%0,12)
YALOVA 12	MBDS-1→MBDS-2	1830	4 (%0,22)	4 (%0,22)	4 (%0,22)
DELFO5	MMS-1	1380	1 (%0,07)	1 (%0,07)	1 (%0,07)
	MMS-1→MMS-2	690	3 (%0,43)	3 (%0,43)	3 (%0,43)
	MBDS-1→MBDS-2	2040	5 (%0,24)	5 (%0,24)	5 (%0,24)
ΣÇalışmadaki toplam tomurcuk		28710	18 (%0,06)	18 (%0,06)	18 (%0,06)



Şekil4.6. DELFO5 genotipinin MBDS-1/MBDS-2 besi yerinde Somatik uyartımı.

4.3. Genotiplerin Ploidi Seviyelerinin Tespit Edilmesi

Bu çalışmada genotiplerin ploidi seviyeleri flow sitometri analizi ile hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilmiştir. Kontrol olarak tohumdan üretilen Diploid soğan bitkisinin nükleer DNA miktarı ~32 pg/DNA olarak tespit edilmiştir. Analizi yapılan ginogenik bitkilerden haploid olanları ~16 pg/DNA olarak tespit edilmiştir.

4.4. Ginogenik Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada uyartım sonucu tomurcuklardan elde edilen ginogenik bitkicikler ginogenik bitkiye belli oranlarda dönüşmüştür. Oluşan kayıplar bitkilerin ölmesi, kontaminasyon veya örneğin cihazda okunamaması sonucu olmuştur. Genotiplere ait bitkilerden örnekler alınarak analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda haploid, diploid ve mixoploid bitkiler tespit edilmiştir. Amaca uygun şekilde dişi gamet hücresinin uyartımıyla oluşan embriyodan elde edilen bitkiler haploid olarak flow sitometri aleti ile tespit edilmiştir. Bunun yanında ginogenik olarak gözlemlenen bitkiciklerden diploid seviyede kromozoma sahip olanlar, dişi gamet hücresinin spontan katlanmasıyla oluşmuş olabilir ya da dişi gamet hücresinin bulunduğu yerdeki 2n kromozoma sahip dokulardan oluşmuş olabilir. Mixoploidi, bir diploid ve bir poliploid olan iki hücre hattının aynı organizma içerisinde bir arada bulunduğu durumdur.

BİYOM1 genotipinden elde edilen ginogenik bitkilerden alınan örnekler flow sitometri aleti ile test edilmiştir. Analizi yapılan 28 örnekten altı (%21,4) tanesi mixoploid ($n+2n$), beş (%17,8) tanesi diploid ($2n$), 17 (%60,7) tanesi haploid (n) olarak tespit edilmiştir. BİYOM2 genotipinden elde edilen altı adet ginogenik bitkiciklerden iki tanesi analiz edilmiştir. Alınan örnekler flow sitometri aleti ile test edilmiştir. Analizi yapılan iki örneğin ikisi de diploid ($2n$) olarak tespit edilmiştir. BİYOM3 genotipinden elde edilen sekiz adet ginogenik bitkicikten analiz için örnek alınamamıştır.

YALOVA 12 genotipinden elde edilen ginogenik bitkilerden alınan örnekler flow sitometri aleti ile test edilmiştir. Analizi yapılan 13 örnekten bir (%7,7) tanesi mixoploid ($n+2n$), dört (%30,7) tanesi diploid ($2n$), sekiz (%61,5) tanesi haploid (n) olarak tespit edilmiştir.

DELFOS genotipinden elde edilen ginogenik bitkilerden alınan örnekler flow sitometri aleti ile test edilmiştir. Analizi yapılan 33 örnekten üç (%9) tanesi mixoploid ($n+2n$), yedi (%21,2) tanesi diploid ($2n$), 23 (%69,7) tanesi haploid (n) olarak tespit edilmiştir.

Tüm genotiplerle yapılan bu çalışmada toplamda 76 adet örnek analiz edilmiştir. Analiz edilen bu örneklerin 10 (%13,1) tanesi mixoploid ($n+2n$) olarak tespit edilmiştir. Örneklerin 18 (%23,7) tanesi diploid ($2n$) olarak tespit edilmiştir. Uyarım sonucunda amaca uygun 48 (%63,1) tanesi haploid (n) olarak tespit edilmiştir. Haploid bitki oranı genotiplerde birbirine yakın oranda %60-70 aralığında oluşmuştur. BİYOM2 ve BİYOM3 genotiplerinin uyarıma verdikleri cevap çok düşük oranda olmuştur. BİYOM3 genotipinden hiç örnek alınamamıştır. Tablo 4.9'da ginogenik bitkilerden alınan örneklerin ploidi seviyeleri gösterilmiştir.

Tablo4.9. Ginogenik bitkilerden alınan örneklerin ploidi seviyeleri.

Test edilen				
Genotip	bitki sayısı	n (%)	2n (%)	n+2n (%)
BİYOM1	28	17 (%60,7)	5 (%17,8)	6 (%21,4)
BİYOM2	2	0 (%0)	2 (%100)	0 (%0)
BİYOM3	0	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
YALOVA 12	13	8 (%61,5)	4 (%30,7)	1 (%7,7)
DELFOŞ	33	23 (%69,7)	7 (%21,2)	3 (%9)
ΣToplam	76	48 (%63,1)	18 (%23,7)	10(%13,1)

4.5. Somatik Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada uyartım sonucu tomurcuklardan elde edilen somatik bitkiler flow sitometri aleti ile analiz edilmiştir. Tomurcuklar kültüre alınmadan önceki hazırlık aşamasında tomurcukların çiçek sapından kesilirken sap kısmının bir miktar tomurcuk üzerinde kalmasından kaynaklı kallus oluşmuştur. Bu dokular üzerinden somatik uyartım gerçekleştirilerek bitkiler elde edilmiştir. Toplamda 28710 adet tomurcuktan somatik uyartımla elde edilen 18 bitki analiz edilmiştir. Bitkilerden alınan örneklerin tamamının ploidi seviyeleri diploid (2n) olarak tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada üç adet Türk soğan genotipi ve iki adet standart soğan genotipinin ginogenesis uyartımına verdikleri cevaplar gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu yöntemin soğan (*Allium cepa* L.) bitkisinin ginogenesis uyartımına cevap verdiğini göstermiştir. Genotiplerin farklı oranlarda uyartıma cevap vermeleri genotip etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle ginogenesis cevap verme oranı yüksek olan genotiplerle ıslah programını yönlendirmek gerekmektedir. MS ve BDS temelli besi yerleri kullanılarak 5 farklı soğan genotipine ait ginogenesis uyartımı yapılan tomurcuklardan 185 (%0,68) adet ginogenik bitkicik tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda ginogenesis uygulamaları benzer sonuçlar vermiştir (Campion ve ark 1992; Bohanec ve ark 1995; Jakse ve ark 1996; Geoffriau ve ark 1997; Puddephat ve ark 1999; Alan ve ark 2003;2004). Bu ve buna benzer çalışmalar soğan (*Allium cepa* L.) bitkisinde ginogenesis yöntemiyle haploid bitki elde edilebileceğini göstermiştir.

Çalışmada yer alan soğan (*Allium cepa* L.) genotipleri içerisinde ginogenesis uyartımına farklı besi yerlerinden toplamda en yüksek tomurcuk cevabını veren genotip %1,15 oranla BİYOM1 genotipi olmuştur. Bununla birlikte ginogenesis uyartımında farklı besi yerlerinden toplamda en yüksek bitki oranı %0,90 oranla BİYOM1 genotipinden elde edilmiştir. BİYOM1 genotipinden sonra sırasıyla en yüksek ginogenik bitki oranı %0,50 ile DELFOS, %0,34 ile YALOVA 12, %0,15 ile BİYOM2 ve %0,13 ile BİYOM3 genotiplerinden sağlanmıştır. Yapılan çalışmada bütün genotiplerden toplamda 29010 adet tomurcuk kültüre alınmış ve bu tomurcukların %0,62'si ginogenesis uyartımına cevap vermiştir ve ginogenik bitkicik oranı %0,68 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada tüm genotiplerden ve farklı besi yerlerinden toplamda %0,47 oranında ginogenik bitki elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar soğan (*Allium cepa* L.) bitkisinin literatürdeki diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir. (Campion ve ark

1992; Bohanec ve ark 1995; Jakse ve ark 1996; Geoffriau ve ark 1997; Puddephat ve ark 1999; Alan ve ark 2003;2004). Düşük ginogenesis uyartım oranının nedeni olarak çalışmada kullanılan soğan (*Allium cepa* L.) genotiplerinin genetik özelliklerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülebilir. Literatürde yapılan çalışmalarda %118,3 oran ile en yüksek ginogenik bitki oranı Javornik ve arkadaşlarının (1998) G126 genotipi ile 2 mg/l BAP, 2 mg/l 2,4-D ve 100 g/l Şeker içeren BDS besi yerinde elde edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda genellikle %0 ile %3 değerleri arasında ginogenik bitki elde edilmiştir (Bohanec ve Jakse, 1999, Geoffriau ve ark, 1997). Alan ve ark (2004) tarafından yapılan çalışmada %16,4 ginogenik bitki oranı elde edilmiştir. Genel anlamda ginogenesis uyartımında genotip etkisinden dolayı farklı cevaplar alındığından ıslah programlarında ginogenesis uyartım oranı yüksek olan genotiplerin kullanılması daha faydalı olacaktır.

Bu çalışmada modifiye edilmiş BDS ve MS besi yerleri kullanılmıştır. BDS ve MS temelli besi yerlerine 2 mg/l BAP, 2 mg/l 2,4-D ve 100 g/l Şeker eklenerek uyartım gerçekleştirilmiştir. Tomurcukları kültüre alma işleminden 21 gün sonra 30 g/l şeker içeren hormonsuz besi ortamına alt kültüre alınmıştır. Yapılan gözlemlerde alt kültüre alınan tomurcuklardan elde edilen ginogenik bitkilerin daha sağlıklı ve güçlü oluşup geliştiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebi alt kültürle bitkiciklerin yüksek şeker ve hormon etkisinden kurtulmasıdır. Çalışmada besi yerleri arasında %0,98'lik oranla en yüksek ginogenik bitki DELFOS genotipinin MBDS-1 besi yerinden MBDS-2 besi yerine alt kültüre alınmasıyla elde edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında BDS temelli 2 mg/l BAP, 2 mg/l 2,4-D ve 100 g/l şeker içeren besi yerinin diğer çalışmalarda da gösterdiği gibi soğan (*Allium cepa* L.) bitkisinde etkili şekilde ginogenesis uyartımı yapıldığını teyit edilmiştir. Bu besi yerine ekilen tomurcukların 21 gün sonra alt kültüre alınması daha sağlıklı ve güçlü ginogenik bitkicikler elde edilmesine ve ginogenik bitki oranının artırılmasına neden olmaktadır.

Ginogenesis uyartımına cevap veren tomurcuklardan elde edilen bitkiler örnek alınacak boyuta ulaştığında flow sitometri analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda haploid (n), diploid (2n) ve mixoploid (n+2n) kromozom seviyesinde bitkiler tespit edilmiştir. Analizi yapılan genotiplerden en yüksek haploid bitki eldesi %69,7 DELFOS genotipinde tespit edilmiştir. BİYOM1 genotipi için haploid bitki oranı %60,7, iken YALOVA 12 genotipi için haploid bitki oranı %61,5 olarak tespit edilmiştir. Flow sitometri ile analiz edilen toplamda 76 örneğin %63,1'i haploid (n) olarak saptanmıştır. Analizi yapılan örneklerin %21'i diploid (2n) ve %13,1'i ise mixoploid (n+2n) olarak tespit edilmiştir. Soğanda (*Allium cepa* L.) çok az oranda spontan katlanmanın olduğu bilinmektedir (Campion ve ark 1995, Geoffriau ve ark 1997, Jakse ve ark 2002, Grzebelus ve Adamus 2004, Alan ve ark 2007). Ginogenik olarak gözlemlenen bitkiciklerden analiz sonucu diploid olarak belirlenen bitkiler, dişi gamet hücresinin spontan katlanmasıyla oluşmuş olabilir ya da dişi gamet hücresinin bulunduğu yerdeki diploid kromozoma sahip dokulardan oluşmuş olabilir. Mixoploid olarak tespit edilenler ise bir haploid ve bir diploid olan iki hücre hattının aynı genotip içerisinde bir arada bulunduğu durumdur. Çalışma sonucunda haploid olarak tespit edilen bitkilerde mayoz bölünme gerçekleşemediği için gamet hücreleri oluşmamaktadır. Bu yüzden haploid bitkilerin uyartım yoluyla katlanarak dihaploid bitkilere getirilmesi gerekmektedir. Spontan katlanma oluşumu ise kromozom katlama işlemine gerek duyulmadan dihaploid bitki elde edilmesini sağlamaktadır. Spontan katlanma moleküler düzeyde tespit edilebilir (Alan ve ark, 2007). Ticari anlamda spontan katlanma faydalı olmaktadır. Bu sayede kromozom katlama işlemi için ekstra maliyet ve zamana ihtiyaç duyulmamaktadır. Katlama işlemi başarısı düşük olduğundan dolayı genotip kaybına da neden olmaktadır.



KAYNAKLAR

- Alan A.R., Mutschler M.A., Brants A., Cobb E., Earle E.D., 2003. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn, Plant Science, 165, 1201-1211.
- Alan A.R., Brants A., Cobb E., Mutschler M.A., Earle E. D., 2003. Utilization of doubled-haploid technique in developing onion inbreds, Allium Improvement Newsletter, 13, 34-36.
- Alan A. R., Brants A., Cobb E., Goldschmied P. A., Mutschler M.A., Earle E.D., 2004. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials, Plant Science, 167, 1055–1066.
- Alan A. R., Lim W., Mutschler M.A., Earle E.D., 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.), Plant Science, 173,25-31.
- Alan A.R., Celebi-Toprak F., Kaska A., 2016. Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 125: 249-259
- Arumuganathan, K., Earle, E. D., 1991. Nuclear DNA content of some important plant species, Plant Molecular Biology Reporter 9, 208-218.
- Bhat, J.G., Murthy, H.N., 2007. Factors affecting in vitro gynogenic haploid production in Niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.). Plant Growth Regul 52:241–248.
- Blakeslee,A.F., Belling,J., Farnham,M.E.: Bergner,A.D., 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, "Datura stramonium". Science.55:646-647.

- Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A., Javornik, B., 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants, *Plant Sci.* 104 215–224.
- Bohanec, B., Jakse M., 1999. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions, *Plant Cell Reports*, 18, 737-742.
- Bohanec, B., 2002. Doubled-haploid onions, eds: H.D. Rabinowitch and L. Currah, *Allium Crop Science: Recent Advances*, CABI Publishing, Wallingford, UK, Pp: 145–158.
- Campion, B., 1990. Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 20, 1-6.
- Campion, B., M.T. Azzimonti, E. Vicini, M. Schiavi, A. Falavigna, 1992, *Advances in haploid plant induction in onion (Allium cepa L.) through in vitro gynogenesis*, *Plant Sci.* 86 97–104.
- Cho, KS, Hong SY, Yun BY, Kwon YS, Huh EJ., 2006. Production and analysis of doubled haploid lines in long-day onion (*Allium cepa*) through in vitro gynogenesis. *Hort. Environ. Biotechnol.* 47(3):110-116.
- Cohat, J., 1994. Obtention chez l'échalote (*Allium cepa* L. var *aggregatum*) de plantes haploïdes gynogénétiques par culture in vitro de boutons floraux, *Agronomie*, 14, 299–304.
- Dore, C. and Marie, F., 1993. Production of Gynogenetic Plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. *Planr Breeding*. 111:142-147.

- Dunstan D. I., 1977. Short K.C., Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa*, Physiologia Plantarum, 41, 70-72.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı,N., Abak,K., 2001. Haploid bitki üretimi. Babaoğlu, M., Gürel E., Özcan S. Biti Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Seçuk Üniv. Basımevi.
- Fayos O, Vallés MP, Garcés-Claver A, Mallor C, Castillo AM., 2015. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. Front. Plant Sci. 6:384.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018 <http://www.fao.org/faostat>
- Gamborg O.L., Miller R.A., 1968. Rancillac M., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50, 151-158.
- Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristof, Z., 2002 Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Rep. 21:105–111.
- Geoffriau E., Kahane R., Rancillac M., 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.), Euphytica, 94, 37-44.
- Germana, M.A., 2006. Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Vol. 86, Issue 2, pp. 131-146.
- Gürel, S., Gurel, E., Kaya, Z., 2000. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep 19:1155–1159.

- Hyde P.T., Earle E.D., Mutschler M.A., 2012. Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) Lines and their impact on hybrid performance. HortScience 47:1690–1695.
- Jakse M., Havey M.J., Bohanec B., 2003. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos, Plant Cell Reports, 21, 905-910.
- Kaska A., 2014. Bazı yenilebilir allium türlerinde ginogenesis uyartımı ve klonal çoğaltma olanaklarının araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
- Keller J., 1990. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.), Euphytica, 47, 241–247.
- Keller E.R.J., Korzun L., 1996. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species, eds: Jain S.M., Sopory S.K. and Veilleux R.E. In vitro Haploid Production in Higher Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 3. The Netherlands, Pp: 51-75.
- Lakshmi Sita, G., 1997. Gynogenic haploids in vitro. Current Plant Science and Biotechnology in Adriculture. Vol. 29, pp. 175-193.
- Luthar, L., Bohanec, B., 1999. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two step flower or ovary culture. Plant Cell Reports. 18:797-802.
- Michalik B., Adamus A., Nowak E., 2000. Gynogenesis in Polish onion cultivars, Journal of Plant Physiology, 156, 211-216.
- Mukhambetzhanov, S.K., 1997. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult. 48:111-119.

- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cell culture, *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Muren P., 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion, *Hortscience*, 24, 833-834.
- Musial K., Bohanec B., Przywara L., 2001. Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.), *Sexual Plant Reproduction*, 13, 335-341.
- Ruth, S.K., Stephen, L.S., John, C.B., 1993. Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 32:77–82.
- San Noeum LH., 1976. Haploides d'Hordeum vulgare L. par culture in vitro d'ovaries non fécondés. *Ann. Amélior. Plantes*, 26, 4: 751-754.
- Schum, A., Mattiesch, L., Timmann, EM., Hofmann, K., 1993. Rejuvenation of dihaploids via gynogenesis in *Allium-Porrum* L. *Gartenbauwissenschaft*, volume:58, Issue:5, Pages:227-232.
- Sevindik B., 2018. Siklamende anter ve ovül kültürü yöntemleri ile haploid bitkilerin elde edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Sibi, M.L., Kobbaissi, A., Shekafandeh, A., 2001. Green haploidplants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs.). *Euphytica*. 122:351–359.
- Tang, F., Tao, Y., Zhao, T., Wang, G., 2006. In vitro production of haploid and double haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 84:233–237.

- Thomas, WTB, Newton AC, Wilson A, Booth A, Macaulay M, Keith R., 2000. Development of recombinant chromosome substitution lines: a barley resource. SCRI annual report 1999/2000, pp 99–100.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, 2018 <http://www.tuik.gov.tr>
- Van-Creijl, M.G.M., Kerckhoffs, D.M.F.J., De Bruijn, S.M, Vreugdenhil, D., Van Tuyl, J.M., 2000. The effect of medium composition on ovary-slice culture and ovule culture in interspecific *Tulipa gesneriana* crosses. Plant Cell Tiss Organ Cult. 60:61–67.
- Yang, H.Y., and Zhou, C., 1982. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet. 63:97-104.
- Yarali F, Yanmaz R., 2013. Utilization of haploidy techniques in breeding of *Allium* species. Turk. J. Sci. Rev. 6(2):44-50.

ÖZGEÇMİŞ

1991 Adana ilinde doğdu. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde lisans eğitime başlayıp 2015 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılında Çukurova üniversitesi Bahçe bitkileri Anabilim Dalında Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ danışmanlığında Yüksek Lisans eğitime başladı.

