

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI TESCİLLİ ARPA ÇEŞİTLERİ İLE *Hordeum spontaneum*
MELEZLERİNDEN *in vitro* KOŞULLARDA DOUBLE HAPLOİD BİTKİ ELDE
EDİLMESİ

Gülden ÇETİN ÖZKAN

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

GÜLDEN ÇETİN ÖZKAN tarafından hazırlanan “Bazı Tescilli Arpa Çeşitleri İle *Hordeum spontaeum* Melezlerinden *in vitro* Koşullarda Double Haploid Bitki Elde Edilmesi” adlı tez çalışması 27/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Khalid MAHMOOD KHAWAR



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Saime ÜNVER İKİNCİKARAKAYA
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Khalid MAHMOOD KHAWAR
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nurdan ŞAHİN DEMİRBAĞ
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Muhammad AASIM
Necmettin Erbakan Üniversitesi /Biyoteknoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Sevil SAĞLAM
Ahi Evran Üniversitesi /Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27.07.2017

Gulden ÇETİN ÖZKAN

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI TESCİLLİ ARPA ÇEŞİTLERİ İLE *Hordeum spontaneum* MELEZLERİNDEN
in vitro KOŞULLARDA DOUBLE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ

GÜLDEN ÇETİN ÖZKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Bu araştırma 2013-2016 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri ABD ve Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, Yenimahalle’de yürütülmüştür. Araştırmanın amacı *Hordeum spontaneum* (yabani türü) ve 5 adet kültür arpa çeşitleri arasında sera koşullarında yapılan resiprok melezlerden elde edilen bitkilerde anter kültürü ile double haploid bitki üretimidir. Daha sonra elde edilen melezler double haploid bitki üretimi için kullanılmıştır. Elde edilenlerden rejenerasyon gerçekleşebilmesi için anterler 3 farklı ön muamele (0,7 M mannitol, 0,3 M mannitol ve +4°C’de 21 gün bekletme) işlemlerine tabi tutulmuştur. Kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından ortalamalar arasında; bütün genotipler ve melezler arasında önemli derecede farklılık ($p<0.01$) belirlenmiş olup, en verimli kallus oluşumu 0,7 M mannitol ön muamelesi uygulamasında izlenmiştir. Daha sonra, kurulan deneme sonuçlarına göre sera koşullarına adaptasyonu sağlanan bütün çeşitler ve genotiplerde diploidleşme oranı hesaplanmış ve spontan katlanma gerçekleştiği gözlenmiştir. Örneklerin ploidi düzeyleri hem Ploidy analyser (Sysmex CyFlow Ploidy Analyser) cihazı ile hemde binoküler mikroskop altında ($2n=2x=14$ kromozom sayıları) tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam 316 double haploid arpa bitkisi elde edilmiştir. Arpa bitkisinde double haploid üretim teknikleri Türkiye’de arpa haploidi ıslah programı için yeni bir olanak sunmaktadır. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre bu tekniğin doğru kullanılması, Türkiye’de haploid ıslah programına olumlu katkılar sağlayacaktır.

Temmuz 2017, 133 sayfa

Anahtar Kelimeler: arpa, melez, anter, diploidleşme, double haploid

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRODUCTION OF BARLEY DOUBLE HAPLOIDS USING HYBRIDS OF *Hordeum spontaneum* INTO SOME CERTIFIED BARLEY CULTIVARS UNDER *in vitro* CONDITIONS

Gülden ETİN ÖZKAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

This research was carried out between 2013-2016 at Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops and Biotechnology Research Center of Central Field Crops Research Institute, Yenimahalle. The aim of the study was to produce double haploid plants using anther culture from reciprocal hybrids made between *Hordeum spontaneum* (wild species) and 5 cultivated barley varieties under greenhouse conditions. These hybrids were used for double haploid production through anther culture after subjecting them to pretreatments with 0.7 M mannitol, 0.3 M mannitol and 21 days at + 4 ° C. Among the means callus induction, shoot formation rate and number of rooted plants showed significant differences ($p < 0.01$) among all parent and hybrids. and the most efficient callus formation was observed using 0.7 M mannitol pretreatment. Subsequently, the rate of diploidization in all genotypes adapted to greenhouse conditions was calculated and spontaneous diploid induction was observed in all genotypes.. The ploidy levels of the samples were determined and confirmed as ($2n = 2x = 14$ chromosome) both with a Ploidy analyzer (Sysmex CyFlow Ploidy Analyzer) and under a binocular microscope. A total of 316 double haploid barley plants were obtained as a result of this study. Double haploid production techniques on barley plants offer a new possibility for the barley haploid breeding programs in Turkey. It is concluded that the correct use of this technique will positively contribute to the haploid breeding programs in Turkey.

July 2017, 133 pages

Key Words: barley, hybrid, anther, diploidization, doubled haploid

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Türkiye’de arpa, çok büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışmada anter kültürü tekniği kullanılarak klasik ıslah süresinin kısaltılması ve double haploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır. *H. Spontaneum* yabani türü ve Türkiye’de yetiştirilen kültür arpaları kullanılarak resiprokal melezleme yapılmış ve resiproklar ve kültür çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri araştırılmıştır. Arpa bitkisinde elde edilen melezlerin ve katlanmış bitkilerin daha sonraki ıslah ve moleküler çalışmalar için çok önemli olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışma sonuçları ile 2’li, 3’lü ve daha kompleks melezlerin double haploid bitki üretiminde kullanılmasıyla Türkiye bu konuda yeni boyutlar kazanacaktır.

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve tecrübelerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan ve desteğini her zaman içtenlikle aktaran danışman hocam sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR’a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Saime ÜNVER İKİNCİKARAKAYA ((Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) ve sayın Doç.Dr.Muhammed AASIM’a (Necmettin ERBAKAN Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı) ve bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Dilek BAŞALMA’ya ((Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) teşekkürü bir borç bilirim. Jüri üyesi hocalarımdan sayın Prof. Dr. Nurdan ŞAHİN DEMİRBAĞ ve sayın Doç. Dr. Sevil SAĞLAM’a destekleri ve değerli katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Arpa tohumlarının temininde emeği geçen Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Arpa Islah Birim Başkanı İsmail SAYIM başta olmak üzere, Namuk ERGÜN ve Sinan AYDOĞAN’a, Enstitü Müdürümüz İlhan Subaşı’na, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi bölüm başkanı Dr. Hümeysra YAMAN’a, ve laboratuvar ve sera çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım, Yusuf COŞKUN ve Meryem SAĞKOL’a teşekkür ederim. Ayrıca, en başta beni akademik olarak yönlendiren ve bu haklı gururu yaşamama sebep olan çok değerli insan merhum babam Sayın Mustafa Çetin (2014) olmak üzere, en büyük destekçim canım annem sayın Yeter ÇETİN’e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi bildirmekten kıvanç duyarım. Sevgilerini göstermekten kaçınmayan ablam Gülay SİRTAŞ ve enistem Burak SİRTAŞ’a, manevi

desteklerinden dolayı kayınpederim sayın Ramazan ÖZKAN ve kayınvalidem sayın Ayşe ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Her koşulda desteklerini esirgemeyen, beni zor zamanlarımda motive eden ve şartlandıran canım eşim İsa ÖZKAN ve oyun zamanlarımızdan çaldığım halde yine de bir gülüşüyle dünyayı ayaklarımın altına seren biricik kızım Beren ÖZKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Gülden ÇETİN ÖZKAN

Ankara, Temmuz 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1 Materyal	25
3.2 Yöntem	29
3.2.1 Tescilli çeşitler ve yabancı türün yetiştirilmesi	29
3.2.2 Melez tohumların hasadı	33
3.3 Anter Kültürü Çalışmaları.....	34
3.3.1 Anter kültürü uygulamaları.....	34
3.3.2 Donör bitkilerin ekimi	35
3.3.3 Başakların hasat edilmesi	36
3.3.4 Sterilizasyon.....	39
3.3.5 Ön muamele	40
3.3.6 Stok çözeltilerin hazırlanması	41
3.3.7 Anterlerin besi ortamına aktarılması.....	42
3.3.8 Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması	44
3.3.9 Kalluslardan gelişen bitkiciklerin köklendirme ortamına aktarılması ve vernalizasyona tabi tutulması	47
3.3.10 Kök gelişimini tamamlayan bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması	49
3.4 Bitkilerde Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi	50
3.4.1 Haploid bitkilerde kromozom katlaması	51
3.5 Sitolojik İnceleme Yöntemleri	52
3.5.1 Kromozom sayımları	52
3.5.2 İlk işlem	52
3.5.3 Fiksasyon.....	52
3.5.4 Hidroliz	53
3.5.5 Kök uçlarının boyanması	53
3.5.6 Preparatların hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi.....	54
3.6 Çeşitler ve Melezlerinin Bazı Morfolojik Özellikleri.....	53
3.6.1 Bitki boyu.....	56
3.6.2 Başak boyu.....	56
3.6.3 Bayrak yaprak boyu	56
3.7 İstatistiksel Değerlendirme.....	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1 Tarm-92 Çeşidi ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik Özellikler.....	57
4.1.1 Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	58

4.2 Bülbül-89 �eşidi ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik �zellikler.....	63
4.2.1 Bülbül-89 �eşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	63
4.3 Aydanhanım �eşidi ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik �zellikler.....	69
4.3.1 Aydanhanım �eşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	69
4.4 Zeynelağa �eşidi ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik �zellikler.....	75
4.4.1 Zeynelağa �eşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	75
4.5 Akar �eşidi ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik �zellikler.....	81
4.5.1 Akar �eşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	81
4.6 <i>H. spontaneum</i> Türü ve Melezlerine Ait Bazı Morfolojik �zellikler.....	87
4.6.1 <i>H.spontaneum</i> türü ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi.....	87
4.7 Tescilli �eşitler ve Melezlerde Anter Kültürü Uygulamaları.....	93
4.7.1 Tarm-92 �eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	93
4.7.2 Bülbül-89 �eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	97
4.7.3 Aydanhanım �eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	100
4.7.4 Zeynelağa �eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	103
4.7.5 Akar �eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	106
4.7.6 <i>H.spontaneum</i> türü ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları	110
4.8 Yapılan Sitolojik �alışmalar.....	112
4.8.2 Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi	112
5. TARTIşMA.....	114
6. SONUÇLAR.....	119
7. ÖNERİLER.....	121
KAYNAKLAR	123
�ZGE�Mİş.....	131

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

g	Gram
mg	Mili gram
°C	Santigrad derece
l	Litre
ml	Mili litre
µl	Mikro litre
M	Molar
cm	Santi metre
mm	Mili metre
mM	Mili molar
µmol	Mikro mol

Kısaltmalar

Ha	Hektar
Hg	Hektogram
bç	baz çifti
<i>H.spontaneum</i>	<i>Hordeum spontaneum</i>
kg/da	Kilogram/dekar
BAP	6 Benzylaminopurine
F	F testi
GA3	Giberellik asit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
IBA	Indol 3 butirik asit
IAA	Indol 3 asetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Arpa başaklarının sıralanması	1
Şekil 1.2 Tek bir arpa çiçeğinin erkek ve dişi organ yapısı	2
Şekil 1.3 Arpa tohumunun ventral ve dorsal görünüşleri.....	3
Şekil 1.4 Arpa tarlasından genel bir görünüm	4
Şekil 1.5 Yabani, iki sıralı ve altı sıralı arpaların morfolojik görünümü.....	9
Şekil 3.1 Tarm-92 çeşidine ait tohumlar	25
Şekil 3.2 Bülbül-89 çeşidine ait tohumlar	26
Şekil 3.3 Aydanhanım çeşidine ait tohumlar.....	27
Şekil 3.4 Zeynelağa çeşidine ait tohumlar	27
Şekil 3.5 Akar çeşidine ait tohumlar.....	28
Şekil 3.6 <i>Hordeum spontaneum</i> yabani türüne ait tohumlar	29
Şekil 3.7 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsüne ait sera koşullarında deneme bitkilerinin yetiştirilmesi	30
Şekil 3.8 Sera koşullarında melezleme	31
Şekil 3.9 Yabani tür ve kültür çeşidi melezinden elde edilen F1 başak görüntüsü	32
Şekil 3.10 Hasat olgunluğuna gelmiş melez bir başak görüntüsü.....	34
Şekil 3.11 Anter kültürü çalışmalarında kullanılan donör bitkilerin ekimi	36
Şekil 3.12 Arpada mikrospor gelişme safhaları	37
Şekil 3.13 Arpa anterlerine uygulanan canlılık testi	38
Şekil 3.14 Arpa'da anter kültürü için orta tek çekirdek aşamasındaki başlangıç materyalinin seçilmesi.....	39
Şekil 3.15 Steril kabinde %70 etanol muamelesi ile yüzey sterilizasyon işlemi	39
Şekil 3.16 İklim odasından alınan bitkiciklerin dış koşullara alıştırılma aşamaları	49
Şekil 3.17 Seralarda kök gelişimini tamamlayan bitkiciklerin büyük saksılara aktarım aşamaları.....	49
Şekil 3.18 Kullanılan Ploidy analyser cihazı	50

Şekil 3.19 Double haploid bitkilerin kök uçlarında kromozom icelemesi.....	55
Şekil 4.1 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 25 gün sonra Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşumları.....	61
Şekil 4.2 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 25 gün sonra Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşumları.....	65
Şekil 4.3 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 25 gün sonra Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşumları 0	71
Şekil 4.4 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait sürgün görüntüleri	72
Şekil 4.5 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 24 gün sonra Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşumları.....	77
Şekil 4.6 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 35 gün sonra Akar çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşumları.....	83
Şekil 4.7 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 35 gün sonra <i>H.spontaneum</i> türü ve melezlerine ait kallus oluşumları	89
Şekil 4.8 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması	94
Şekil 4.9 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü	95
Şekil 4.10 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması	97
Şekil 4.11 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü.....	98
Şekil 4.12 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması.....	100
Şekil 4.13 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü.....	101
Şekil 4.14 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması	103

Şekil 4.15 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü.....	104
Şekil 4.16 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra Akar çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması	107
Şekil 4.17 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen Akar çeşidi ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü.....	108
Şekil 4.18 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen <i>H.spontaneum</i> türü ve melezlerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü.....	110
Şekil 4.19 Haploid kromozom sayısına sahip bitkiden elde edilen ploidi görüntüsü.....	112
Şekil 4.20 Double haploid kromozom sayısına sahip bitkilerden elde edilen ploidi görüntüsü.....	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

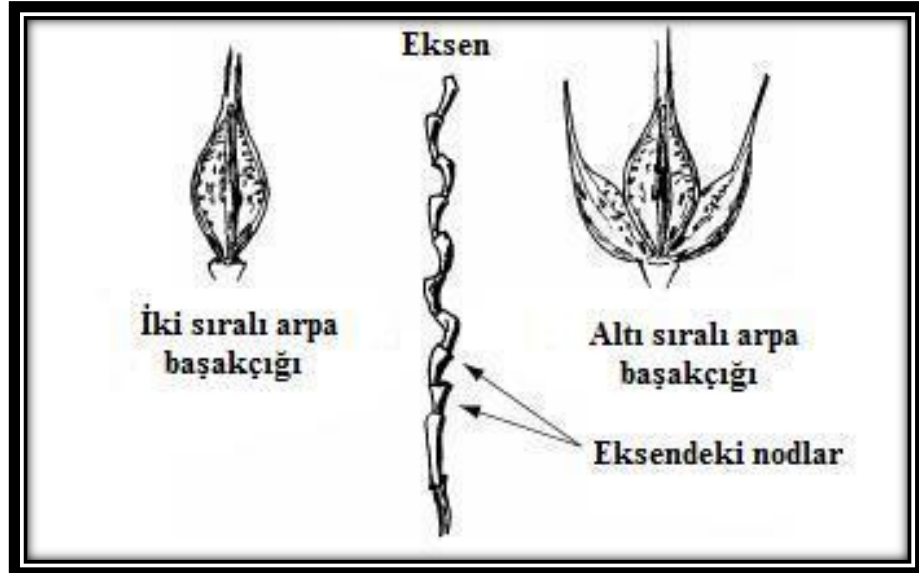
Çizelge 1.1	Türkiye’de yıllara göre arpa üretimi.....	6
Çizelge 1.2	Dünyada yıllara göre arpa üretim verileri.....	7
Çizelge 3.1	Tez kapsamında belirtilen arpa çeşitlerinin sera koşullarında melezlemeleri.....	33
Çizelge 3.2	Mikrostok Çözeltisi.....	41
Çizelge 3.3	FHG stok solüsyonu.....	42
Çizelge 3.4	Kasha vd. (2003)’de belirtilen yöntemle göre kullanılan protokol.....	43
Çizelge 3.5	Szarejko ve Kasha (1991)’de belirtilen yöntemle göre kullanılan Protokol.....	46
Çizelge 4.1	Tarm-92 çeşidi ve ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri.....	57
Çizelge 4.2	Farklı ön muamele uygulamalarının Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	58
Çizelge 4.3	Farklı ön muamele uygulamalarının Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	62
Çizelge 4.4	Bülbül-89 çeşidi ve ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri.....	63
Çizelge 4.5	Farklı ön muamele uygulamalarının Bülbül-89 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	64
Çizelge 4.6	Farklı ön muamele uygulamalarının Bülbül-89 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	68
Çizelge 4.7	Aydanhanım çeşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri.....	69
Çizelge 4.8	Farklı ön muamele uygulamalarının Aydanhanım çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	70
Çizelge 4.9	Farklı ön muamele uygulamalarının Aydanhanım çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	74
Çizelge 4.10	Zeynelağa çeşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri.....	75
Çizelge 4.11	Farklı ön muamele uygulamalarının Zeynelağa çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	76

Çizelge 4.12 Farklı ön muamele uygulamalarının Zeynelağa çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	80
Çizelge 4.13 Akar çeşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri.....	81
Çizelge 4.14 Farklı ön muamele uygulamalarının Akar çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	82
Çizelge 4.15 Farklı ön muamele uygulamalarının Akar çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları	86
Çizelge 4.16 <i>H. spontaneum</i> türü ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri	87
Çizelge 4.17 Farklı ön muamele uygulamalarının <i>Hordeum spontaneum</i> türü ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait varyans analiz sonuçları	88
Çizelge 4.18 Farklı ön muamele uygulamalarının <i>Hordeum spontaneum</i> türü ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	92
Çizelge 4.19 Tarm-92 çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları.....	98
Çizelge 4.20 Bülbül-89 çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları.....	99
Çizelge 4.21 Aydanhanım çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturmalarına ait veriler	102
Çizelge 4.22 Zeynelağa çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları.....	105
Çizelge 4.23 Akar çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları.....	109
Çizelge 4.24 <i>H. spontaneum</i> türü ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturmalarına ait veriler	111

1. GİRİŞ

Buğdaygiller (Poaceae) familyasının Triticeae oymağı buğday (*Triticum*), arpa (*Hordeum*) ve çavdar (*Secale*) gibi tahıl cinslerini kapsar. Arpa (*Hordeum vulgare* L.), diploid ($2n=2x=14$), tek yıllık bir tahıl türüdür. Dünya üzerinde hayvan ve insan besin alımında, yenilenebilir enerji kullanımında ve malt üretiminde önemli yere sahiptir (Schulze 2007). Genetik, fizyolojik, ve morfolojik bakımından varyasyon göstermesi, büyük ölçüde haritalarının ve genetik stoklarının bulunması ve kendine döllenebilmesi ile çok yönlü uygulanabilmesi gibi nedenler arpayı hem tarımsal açıdan hem de fizyolojik ve biyoteknolojik çalışmalar açısından önemli kılmaktadır (Evrensel 2010).

Morfoloji: Tahıl bitkileri arasında arpa türü en çok “kardeşlenenlerden” olup 5 - 8 kardeş vermekte ve 6, 4 ve 2 sıralı olarak bulunmaktadır. Bitki boyu yaklaşık 35-100 cm civarında başakları 8 - 15 cm uzunluğundadır. Arpa çiçeği kavuz ve kapçık ile sarılır; ancak, kavuzlu arpalarda her ikisi tanelere yapışık olarak bulunur. Her tanede yaklaşık % 10 - 14 arasında kavuz bulunmaktadır. Kuru tanelerde % 9 – 14 protein, % 68 kadar karbohidrat bulunmaktadır.



Şekil 1.1 Arpa başaklarının sıralanması (<http://www.brewingtechniques.com>).

Başığın merkezi eksen olarak adlandırılır (Şekil 1.1). Bu eksen nodyumlar ve internodyumlarla birlikte eksen nodyumlarında birleşen daha sonra içinde tohum gelişecek olan başakçıktan oluşmaktadır.



Şekil 1.2 Tek bir arpa çiçeğinin erkek ve dişi organ yapısı (Acosta 2015)

Arpa bitkisinde her bir başakçık bir çiçektir (Şekil 1.2). Çiçek iç kavuz ve kapçık arasında kalan 3 erkek organ, 1 dişi organ ve 1 çift pulcuktan oluşan yapıdır (<http://www.brewingtechniques.com>).

Döllendikten sonra olgunlaşarak gelişen taslak ve içinde oluşan embriyodan meydana gelen yapı tohum olarak bilinmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3.a. Arpa tohumunun ventral, b. dorsal görünüşleri (Anonymous 2017)

En dışta yer alan testa iki integumentten oluşmuştur ve mekaniksel olarak çok kuvvetlidir. Endosperm denilen besin dokusunda karbonhidrat depo edilir. Embriyo ise ince çeperli, çok sıkı düzenlenmiş, canlılığını koruyan parenkima hücrelerinden meydana gelmiştir (Uysal ve Yıldırım 2003).

Arpanın Türkiye ve dünya'daki yeri ve önemi : Türkiye Afrika, Avrupa ve Asya kıtaları arasında geçiş bölgesinde ve jeolojik ve topografik çeşitlilikler, ekolojik, iklim, farklı su ortamı çeşitlilikleri (deniz, akarsu, göl, vb) yükselti farkları bulunduğu için çok sayıda bitki takson ve türün gen merkezi olarak bilinmektedir (Atalay 1994, Çelik 2003).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), dünyanın yaklaşık olarak her yerinde ekilebilir ve geniş bir çeşitliliğe sahiptir (Şekil 1.4). Yabani arpanın orijini ve aynı zamanda ıslah edildiği ilk bölge, yakın doğunun verimli hilal bölgesi olabileceği düşünülmüştür (Badr vd. 2000, Feuillet vd. 2008).



Şekil 1.4 Arpa tarlasından genel bir görünüm (Orijinal, İkizce Araştırma Çiftliği, Haymana/Ankara, 2016)

Kültürü yapılan arpanın orijin merkezinin Orta Doğu'daki Verimli Hilal olduğu bildirilmesine karşın (Harlan 1975, Badr vd. 2000), arpanın evrim süreci içerisinde iki farklı yerde birbirinden bağımsız olarak kültüre alınmış olabileceği de belirtilmiştir (Zohary 2000, Neale vd. 1988, Morrell ve Clegg 2003). Bununla birlikte başka merkezlerin de arpanın orijini olduğu hipotezleri de mevcuttur (Molina-Cano vd. 1999). Kültür arpaları ile tek yıllık yabancı arpalar hem kışlık hem de yazlık formda olabilmektedir (Briggs 1978).

Birçok ekonomik bitkilerin üretiminde Türkiye kendine yeterli ülkeler arasında yer alıp, dünya tarımında önemli rol oynamaktadır; pamuk, hububat, fındık, tütün, kurutulmuş ve taze meyve, baklagiller, şekerpancarı sebze gibi önemli ürünlerde üretici ve ihracatçı konumundadır. 2016 yılı verilerine göre, 38 milyon hektarlık tarla ürünleri ekim alanı içerisinde, tahıllar ve diğer bitkisel ürünler 15 milyon hektarlık alanı almaktadır (Anonim 2016).

Türkiye arpa (*Hordeum vulgare* L.) için, 6,7 milyon ton üretimi ile dünya çapında önemli üretim merkezlerinden biridir. Arpa, başlıca Türkiye'nin yüksek kesimlerinde; daha çok Orta Anadolu (Konya, Ankara, Eskişehir ve Kırşehir) ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde (Şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin) kurak şartlar altında üretilir ve üretimin % 90'ı hayvan yemi olarak kullanılır. Ancak maltlık arpa için ülke içinden ve dışından talep son 10 yılda giderek artmaktadır (Akar vd. 2008, Karahocagil 2008, Dizkırıncı 2010).

Soğuk, kurak, alkali ve tuzlu topraklar gibi farklı iklim ve stres koşullarına uyabilen arpa dünyanın çok çeşitli bölgelerinde yetişebilir. Türkiye'nin tüm bölgeleri iklim koşulları açısından arpa yetiştirilmesine uygunluk göstermektedir. Türkiye'de yıllara göre arpa üretimi çizelge 1.1'de belirtilmiştir. Üretimi yapılan arpanın çok büyük kısmı yurt içinde tüketilmekte, yem endüstrisinde hayvan yemi olarak, bira sanayinde maltlık ve gıda endüstrisinde insan besini olarak kullanılmaktadır. Arpanın ana bileşenleri nişasta, protein, β -glukan ve serbest yağlardır. Ayrıca; E vitamini, B vitaminleri, mineraller ve fenolik bileşikler gibi bileşenler içermektedir. Bir tür B vitamini olan niasinin, kandaki kolesterol ve lipoprotein seviyesini düşürdüğü saptanmış ve arpanın gıda endüstrisinde daha fazla kullanımı önerilmiştir (Gupta vd. 2010).

Çizelge 1.1 Türkiye’de yıllara göre arpa üretimi (Anonim 2016a)

Yıllar	Ekim Alanı (Dekar)	Arpa Üretimi (Ton)
2003	34.000.000	8.100.000
2004	36.000.000	9.000.000
2005	36.500.000	9.500.000
2006	36.498.000	9.551.000
2007	34.280.165	7.306.000
2008	29.500.000	5.923.000
2009	30.100.000	7.300.000
2010	30.400.000	7.250.000
2011	28.688.331	7.600.000
2012	27.487.664	7.100.000
2013	27.205.100	7.900.000
2014	27.872.973	6.300.000
2015	27.835.830	8.000.000
2016	27.400.521	6.700.000

Arpa dünyada 60 milyon ton üretimi ile AB ülkelerinde önemli bir yere sahiptir. Geniş yayılış alanı ve kullanıma sahip olan arpa; abiyotik (kuraklık, tuzluluk ve besin maddesi yetersizliği), biyotik (virüs, bakteriyel, fungal enfeksiyon ve böcekzararı) gibi stresler sebebiyle verimi daha da düşmekte ve çevre koşullarından olumsuz etkilenmektedir (Um vd. 2007, Bankima ve Gaile 2009).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2014 yılına ait arpa üretim verilerine göre Türkiye; Rusya, Almanya, Fransa, Kanada, Ukrayna, İspanya ve Avustralya’dan sonra 8. sırada yer almaktadır. Dünyada arpa ekim alanı ve üretim verileri çizelge 1.2’de gösterilmektedir (faostat.fao.org).

Çizelge 1.2 Dünyada yıllara göre arpa üretim verileri (faostat.fao.org)

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Üretim (Ton)
2003	57.720.704	142.564.393
2004	57.553.390	153.903.621
2005	55.337.541	138.679.501
2006	56.377.361	139.521.659
2007	55.746.542	134.173.767
2008	55.314.531	154.820.539
2009	53.922.324	151.773.710
2010	47.315.832	123.541.951
2011	48.425.164	132.530.751
2012	49.176.737	132.291.516
2013	49.367.777	143.476.579
2014	49.426.652	144.489.996

Arpa, fazla soğuk ve fazla sıcak olmayan, nispi nemi yüksek olan yerlerde iyi gelişir. Sıcaklığın 0 °C'nin altına düşmediği ve 18 – 20 °C'nin üzerine çıkmadığı, nispi nemi % 70–80 olan yerler arpa için çok uygundur. Soğuk bölgelerde iki sıralı, ılıman bölgelerde ise altı sıralı arpalar yetiştirilmektedir.

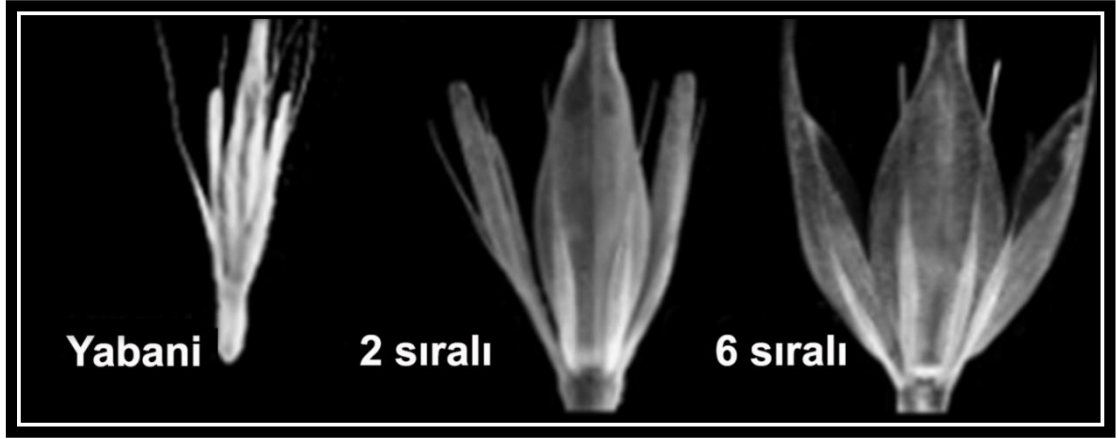
Arpa, toprak isteği bakımından da seçicidir. Arpanın toprak isteği; havalanması iyi, en az %5 organik madde içeren, nötr ve tınlı topraklardır. Asitli topraklara duyarlı, tuzlu topraklara dayanıklıdır. Toprakta fazla miktarda tuz kaldırdığı için sulı tarım alanlarında ekim nöbetinde önemli bir yer tutmaktadır.

Arpanın Orijini ve Evrimi: Verimli hilalin çeşitli bölgelerinde arkeolojik kalıntıların incelenmesi, bu bölge boyunca diğer tahıllarla beraber arpanın yaklaşık 10,000 yıl önce kültüre alındığını göstermekte ve bu eski dünya ziraatinin temellenmesine yol açmaktadır (Nishikawa 2002, Pandey 2006). Kültürü yapılan arpalar sıra sayısına göre 5 grupta incelenmekte; 2 ve 6 sıralı olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır (Briggs

1978). Arpanın evcilleşmesinin, yakın doğuda iki sıralı yabani arpa olan *Hordeum vulgare* L. subsp. *spontaneum*'dan gerçekleştiği var sayılmaktadır (Harlan vd. 1966; Pandey 2006). Kültür arpasının yabani formu *Hordeum spontaneum*'dur.

Yapılan bilimsel çalışmalar *H. spontaneum*'un kültüre alınmış arpadan daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir (Forster vd. 2000, Van- Rijn 2001). Özellikle yapılan çalışmalarla, *H. spontaneum*'un külleme hastalığına (Gustafson ve Claesson 1998) ve yaprak pasına (Moseman vd. 1990) karşı dayanıklılık gibi birçok özellik bakımından yararlı genler barındırdığı tespit edilmiştir. Bunların dışında *H. spontaneum*'un verim ve verim unsurları, çiçek yapısı, protein içeriği, bitki boyu vb. gibi özellikler açısından kendi içinde geniş bir varyasyon gösterdiği ve bu özelliklerin klasik melezleme ıslahı yoluyla kültür arpa çeşitlerine aktarılabilceği birçok araştırmada rapor edilmiştir (Giles ve Bengtsson 1988, Jaradat 1991, Nevo 1992, Ivandic vd. 2000, Volis vd. 2000, 2002, Ivandic vd. 2002). *H. spontaneum* 'un özellikle tuza (Forster 1997), soğuğa (Baum vd. 2003) ve kuraklığa (Robinson vd. 2000) karşı dayanıklılıkta kullanılabilecek iyi bir gen kaynağı olduğu bildirilmiş olup, bu bağlamda hem Avrupa'da hem de ABD'de büyük ölçekli projelere başlanmıştır.

Yabani türler, ticari ıslah faaliyetleri için potansiyel gen kaynağı olarak büyük bir ilgi odağıdır (Vanhala 2004). Yabani yıllık arpa türleri diğer türlere göre göreceli olarak açık habitatlarda düşük rekabetle yetişirler (Von Bothmer vd. 1992). Yabani arpa Doğu Akdeniz bölgesi, Kuzeybatı Asya'da geniş iklim ve topraklarda yayılmıştır. Özellikle yakın doğu verimli hilal bölgelerinde yaygındır (Zohary 1969). Genellikle yabani arpa uç düşüklükteki sıcaklıklara toleranslı değildir ve 1500 m rakım üzerinde nadiren bulunur. Ancak yabani buğdaya göre kuraklığa daha dayanıklıdır. Nispeten sıcak steplerde ve çöllerde yaygın olarak bulunur (Zohary vd. 1988 ve Vanhala vd. 2004). Yabani arpa ve iki sıralı kültür arpası kısmen benzer morfolojiye sahiptir. En göze çarpan fark yabani arpanın kırılğan başak eksen ve kabuklu taneleridir (Sekil 1.5). Altı sıralı arpa kültüre alınma sırasında evrimleşmiştir. Bu özelliği kromozom 2 üzerindeki tek bir gen tarafından kontrol edilmektedir (Komatsuda vd. 1999, Tanno vd. 2002, Vanhala vd. 2004).



Şekil 1.5 Yabani, iki sıralı ve altı sıralı arpaların morfolojik görünümü (<http://www.ukmalt.com>)

Arpa Genomu: *Hordeumcinsi* tek yıllık ve çok yıllık olmak üzere 32 türden ve 45 taksondan oluşur. Tüm arpa taksonları temelde diploid ($2n=14$) olmakla beraber tetraploid ($2n=4x=28$) veya hekzaploid ($2n=6x=42$) olabilirler (Nishikawa vd. 2002). Arpanın haploid genomu yaklaşık olarak 5.36×10^9 bç'dir (Bennett vd. 2000). Yabani arpa yerel iklime bağlı olarak yazlık ve kışlık olabilir, diploittir ve ıslah edilir.

Bazı populasyonlarda dış döllenme (outcrossing) sıklığı yüksektir. Bu, ortalama % 1.6'dır ve 0'dan % 9.6'ya kadar değişir. Çevreye bağlı olarak, kurak bölgelere göre ılıman bölgelerde daha yüksektir (Brown vd. 1978, Vanhala 2004).

Hordeumcinsinin en önemli türleri *bogdanii*, *brachyantherum*, *bulbosum*, *depressum*, *jubatum*, *marinum*, *murinum*, *pusillum*, *secalinum* ve *vulgare* olarak sayılabilir (Vicent vd. 2005).

Anter Kültürü: Arpa verimindeki olumsuz değişimlerin engellenebilmesi ve kalitenin ve verimin daha yüksek seviyelere eriştirilebilmesi için, kurak, soğuk ve hastalık gibi farklı stres faktörlerine toleranslı dane kalitesi yüksek arpa çeşitlerinin ıslah edilmesi amaçlanmaktadır.

Türkiye'de bir çok tarımsal kuruluşlar arpa çeşitlerinde ıslaha yönelik çalışmalar sürdürmektedirler. Klasik ıslah çalışmalarından faydalanarak kaliteli ve yüksek verimli

pek çok çeşit geliştirilip, insanların hizmetine sunulmasına rağmen, başta zararlı ve hastalık olmak üzere abiyotik ve biyotik streslere karşı dayanıklılıkta istenilen sonuç alınamamıştır.

Popülasyonlardaki genetik varyasyon klasik bitki ıslahındaki başarıyı doğrudan etkilemekte ve var olan varyasyonu artırılması büyük önem taşımaktadır. Genetik tabanda oluşan daralma türü genetik varyasyonun sınırlı kalmasına sebep olduğundan dolayı, klasik ıslah metodları ile oluşabilecek biyolojik verimin yükselmesini de sınırlamaktadır. Fakat hala yaygın olarak kullanılan klasik ıslah metodlarıyla bir arpa varyetesinin ıslah edilmesi için uzun yıllara ve yoğun işgücüne gereksinim vardır.

Dünya’da 1980’li yıllardan itibaren tek başına veya biyoteknolojik teknikler veya geleneksel ıslah yöntemleriyle entegratif çalışmalarıyla bu sürecin kısaltılabileceği öne sürülmektedir. Bitki ıslahda kullanılan çeşitli biyoteknolojik yöntemlerinden biri olan anter kültürü; homozigot hatların daha kısa sürede elde edilmesini sağlayan tekniklerden birisidir.

Anter kültürü; uygun aşamadaki bitkiden alınan anterlerin elverişli bir besi yerine kültüre alınarak yeni bitkilerin elde edilmesidir.

Yüzde yüz (% 100) homozigot hatlar; haploid bitkilerin kromozomlarının katlanması sayesinde oluşabilmektedir. Dolayısıyla, uzun yıllar gerektiren saflaştırılmış işlemi, kısa bir sürede yapılır ve double haploid bitkileri; F1 hibrid çeşit geliştirme ve ıslahı çalışmalarında zaman açısından önemli seviyede kazanç sağlayabilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001). Normal bir bitkide bulunan tüm organlara sahip olmalarına karşın, diploid bitkiler ile karşılaştırıldıklarında yaprakları dar ve küçük, boyları daha kısa, çiçekleri ise küçüktür. İndirgenmiş kromozom sayısına sahip gametlerin yapısını gösterdiklerinden kısırdırlar, ve tohum bağlamamaktadır. Haploid bitkilerin tohum bağlanması ve döllerini devam için kromozom sayılarının heksaklorosikloheksan, asenaften, kloral hidrat, etil merkuriklorit, azot perotoksit, kolkisin, kafein, sulfinilamid gibi kimyasal yardımıyla çift sayıyakatlaması gerekmektedir (Sarı 1994).

Blakeslee vd. (1922), tarafından *Datura stramonium* L. bitkisinde ilk doğal haploid bitkilerin keşfedilmesiyle anter kültürü çalışmaları başlamıştır. Bundan sonra, bir çok bitkide kendiliğinden haploid bitki oluşturmak için çalışmalar artmıştır (Khush ve Virmani 1996). Yapay olarak ilk haploidler arpada 1934’de Johansen ve 1938’de Muntzing tarafından geliştirilmiştir (Johansen 1934; Muntzing 1938). *In vitro* kültüre alınan genç anterlerden haploidlerin başarılı bir şekilde elde edilmesi ilk kez 1964 yılında *Dature stramonium* bitkisinde Guha ve Maheshwari tarafından gerçekleştirilmiştir (Guha ve Maheshwari 1964). Doğada spontan haploid bitki oluşma sıklığı çok düşük seviyelerde olmakta, tür ve hatta tür içindeki genotiplere göre değişmekte, bazı genotiplerde ise spontan haploidi oluşumu hiç görülmemektedir (Pochard ve Dumas de Vault 1979). Doğal haploidinin yetersiz ve düzensiz oluşumu, ıslah programlarında kullanılmasına olanak sağlamaması, araştırmacıları haploid embriyo uyartımını teşvik amacıyla uzak akrabalar arasındaki melezler, gecikmiş tozlanma, eksik veya yetersiz (ışınlanmış) polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, UV ve X ışınlarının kullanılması, çeşitli kimyasallar ile muamele edilmesi gibi farklı yöntemlere yönelilmiştir (Emiroğlu ve Gürel 1993).

Double haploid tekniği; buğday, arpa, çeltik, mısır, biber, kolza, patlıcan, *Brassica* türleri, gerbara, karpuz, kavun, kabakta yaygın olarak kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2001).

Ellialtıoğlu vd. (2001), haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında araştırmacılara sağladığı avantajları şu şekilde gruplandırmışlardır:

Haploidleri kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotinin çok kısa bir zamanda elde edilebilmesidir. Double haploid hatların kullanılması ıslah ve genetik çalışmalarını kolaylaştırmakta ve daha kısa sürede sonuca gidilebilmektedir.

Resesif genler, dominant genler tarafından maskelenemeyeceğinden, double haploid veya homozigot bireylerde genetik varyasyon izlemek çok basit ve kolay bir işlemdir.

Homozigot bitkilerin üretimi özellikle dioik türlerde ve kendine uyumsuzluk sorunu olan bitkilerde zor olduğundan anter kültürü oldukça kolaylık sağlamaktadır.

Yabancı döllen türlerde heterozigoti oranı oldukça yüksek olduğundan dolayı homozigot hatları sağlamak için 10-12 jenerasyon süresince kendilemeler yapılmaktadır; kendine döllen türlerde dahi 5-7 jenerasyon boyunca bu işleme ihtiyaç duyulmaktadır.

F1 hibrid çeşitlerinin ıslah edilmesinde homozigotlar arasında kombinasyon yeteneği yüksek olanların belirlenmesinin hibrit çeşit geliştirilmesinde önemi büyüktür.

Patates ve yonca gibi tetraploidlerin bulunduğu türlerde haploidizasyon, diploid bitkilerin eldesinde kullanılabilir. Üretilen diploidler gibi bu yolla elde edilen bazı tetraploidler de kültür çeşitleri ile yabani türler arasında diploid düzeyde melezleme yapılarak hibridler oluşturulabilmektedir.

Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi aracılığı ile, F1 deki melezlerden haploid seçerek; başka genotiplerde olan ve bir genotipte olması istenen özellikteki bitkileri kazanmak olasıdır.

Haploidi, resesif mutasyonların açığa çıkartılması ve bunlardan homozigot bireylerin kazanılmasının yanı sıra somatik hibridizasyonundiploid protoplastlara kıyasla oldukça kolay yapılabilmesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra iki haploid ‘protoplast birleşmesi sonucu “diploid” olduğundan; protoplast kültürü ile yapılan somatik hibridizasyo tekniğinde dezavantajların çoğunluğu engellenmektedir.

Double Haploidler, gen haritalarının çıkartılmasında kolaylık sağlanmakta ve fenotipik işaretleyicilerin (markör) belirlenmesi oldukça etkin olabilmektedir. Double Haploidlar hatlardaki bir gen, bitki ya da markör seviyesinde ise (çoğunlukla RFLP yöntemiyle belirlenmektedir); 1:1 oranında açılım göstermektedir.. Böyle bir durum,

özellikle poligenik şekilde denetlenen bir karakterin haritası oluşturarak kolaylık sağlamaktadır.

Double haploid teknolojisi, heterozigot anne ve babadan tek adımda %100 homozigot saf hatların elde edilmesini sağlamaktadır. Yabancı döllenmiş türlerdeki uzun kendileme süresini tek jenerasyona indirip, mutlak homozigot biki elde edilebilmektedir. Dolayısıyla, F1 hibrit çeşit ve kombinasyon ıslahı programlarında zaman açısından önemli avantaj sağlanabilmektedir. Ayrıca haploid bitkiler, her bir bölgedeki allellerden yalnızca bir seriyi içerir ve resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına kolaylık sağlamaktadır ve bu özellikleriyle ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadırlar (Ellialtıoğlu vd. 2001).

Anter kültürü uygulamalarının özellikle tahıllarda bazı problemleri bulunmaktadır. Bu problemlerden en önemlisi; farklı genotiplerin anter kültürüne farklı reaksiyon göstermesidir. Yine, yapılan araştırmalarda donör bitkilerin yetiştirme koşulları, mikrosporların gelişme devresi, anterlerin kültüre alınmadan önce veya sonra düşük sıcaklığa maruz bırakılması ve kültür ortamı anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler olarak ortaya çıkmıştır (Fadel ve Wenzel 1990; Yıldırım vd. 1990; Flehinghaus vd. 1991; Hatipoğlu ve Genç 1992; Daniel 1993; Immonen 1999; Dağüstü 2002).

Pek çok genotipin anter kültürüne yanıtının düşük olması ve yüksek frekansta albino bitkilerin oluşması bu tekniğin kullanılmasını sınırlamaktadır (Cistue vd. 1999). Yapay olarak ilk haploidler arpada 1934'de Johansen ve 1938'de Muntzing tarafından geliştirilmiştir (Johansen 1934; Muntzing 1938). 1970'li yılların başında bu yöntemle geliştirilen Mingo (Ho ve Jones 1980) çeşidi double haploid teknolojisinin ıslahat kullanımının yaygınlaşmasında kilometre taşı olmuştur. Anter kültürü tekniği kullanılarak arpada 96, kolzada 47, buğdayda ise 20 çeşit geliştirilmiştir (Thomas vd. 2003). Avrupa'da yetiştirilen arpa çeşitlerinin % 50'sinin katlanmış haploid teknikleriyle geliştirilmiş çeşitler olduğu bildirilmektedir (Foster vd. 2009).

Bu çalışmanın amacı; yabancı dölleme oranı oldukça az olan arpada, anter ve ovaryum kültürü ile double haploid bitki elde edilmesi teknikleri kullanılarak uzun ve uğraşı gerektiren saflaştırma sürecinin, birkaç ay gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmesi ve bunun sonrasında elde edilen % 100 homozigot genotipleri arpa ıslah çalışmalarında uygun şekilde değerlendirilebilmesidir.



2. KURAMSAL TEMELLER

Arpa, Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen önemli bir serin iklim tahılı cinsidir. Günümüzde ıslah edilecek arpa çeşitlerinde verim, kalite ve hastalıklara tolerans gibi birçok özelliğin bir arada olması hedeflenmektedir. Bu hedeflere ulaşabilmek amacıyla; bu doktora çalışması kapsamında ıslahçıların geleneksel ıslah tekniklerine anter kültürü metotlarının entegrasyonu sağlanmış ve homozigot hatları geliştirmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Bu çalışma ile ilgili bazı bilimsel araştırma makaleleri ve tezlerden alınan özetler aşağıda verilmiştir.

Foroughi-Wehr ve Mix (1979), arpa anterlerinde kallus indüksiyonunun donör bitkilerin yetiştirildiği çevre şartlarından etkilendiğini, donör bitkilerin ilkbahar ve yaz aylarında açık arazide yetiştirilmesi durumunda gerek kallus üretimi, gerekse takip eden safhada rejenerant bitki oranının, sonbahar-kış aylarında serada yetiştirmeye oranla daha yüksek olduğunu, serada 18000-20000 lüks ışık şiddetinde yetiştirilen bitkilerin anterleri % 0.3-3.2 arasında reaksiyon gösterirken, 8000-10000 lüks ışık şiddetinde yetiştirilen donör bitki anterlerinden % 0-0.8 arasında reaksiyon elde edilebildiğini, bu nedenle birinci uygulamanın daha avantajlı bir yetiştirme sistemi olduğunu, ayrıca en yüksek reaksiyonun donör bitkiler gündüz 12 °C, gece ise 5 °C sabit sıcaklıkta yetiştirildiğinde elde edildiğini saptamışlardır.

Arpa üzerinde yapılan bir çalışmada, başakların orta kısımlarında bulunan başakçıklara ait çiçeklerden alınan anterlerin, anter kültüründe haploid bitki üretimi için uygun olduğu ortaya konulmuştur (Huang ve Sunderland 1982, Powell 1988).

Olsen (1987) tarafından, arpa anter kültürüne besin ortamı içeriğinin etkisi araştırılmıştır. Ficoll içeren sıvı arpa anter kültürü ortamında amonyum nitrat içeriği artırılmış ve azot kaynağı olarak glutamin kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, bu ortamda mikrosporelerden direk embriyoidler gelişmiş ve bu embriyoidlerden gelişen

yeşil rejenerant bitki sayısı da artmıştır. Besin ortamında amonyum nitrat miktarının artırılması ve glutamininin varlığı kültür gelişimi için yararlı olmuştur.

Barbara vd. (1988), Batı Asya, Mısır, İran, Girit ve Türkiye'den toplanan yabani arpa tohumları ekilerek yetiştirilmiş ve elde edilen başakların anter uzunlukları arasındaki fark incelenmiştir. 46 bitki ve 15 popülasyondan gelen 478 anterde ölçümler yapılmıştır. ANOVA ile popülasyonlar, bitkiler, bitkicikler ve çiçek içindeki anterler arasındaki varyasyon tahmini yapılmıştır. Popülasyonlar arasında anter uzunluğu farklılığı diğer bitkilerin ölçüleriyle karşılaştırılmıştır. Örneğin; boyları, bayrak yaprak genişlikleri, kılçık uzunlukları, bitkide başak sayısı ve tohum ağırlıkları ölçülmüştür. Anter uzunluğu ve tohum ağırlığı arasında pozitif yönde bir korelasyon bulunmuştur. Anter uzunluğu ile kılçık, sap ve baş uzunluğu arasında pozitif bir korelasyon vardır. Bitki başına tabla sayısı ile anter uzunluğu arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Anter uzunluğu ve 10 tane ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Sonuç olarak bitkinin genel boyutuna göre anter boyutu belirlenemez. Bayrak yaprak uzunluğu ve bayrak yaprak genişliği arasında pozitif bir korelasyon olması bunun bir göstergesidir.

Knudsen vd. (1989), Farklı arpa çeşitleri kullanılarak yapılan bir araştırmada arazide yetiştirilen donör bitkiden alınan anterlerden meydana gelen ortalama yeşil rejenerantların oranı % 22.80, iklim odalarında yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerin oluşturduğu yeşil rejenerantların oranı ise % 14.30 olmuştur.

Roberts-Oehlschlager ve Dunwell (1990), Igri arpa çeşidinde farklı ön uygulamaların etkilerini araştırdıkları çalışmada, 0.3 M manitol içeren ortamda, 25 °C'de, 4 gün boyunca ön uygulamaya tabi tutulan anterlerin, 14 gün boyunca 4 °C'de soğuk ön uygulamaya tabi tutulan anterlere oranla daha iyi yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Ön uygulama geçiren anterleri sonrasında ise maltoz içeren ortama transfer etmişler, mikrospor bölünmesinin ve yeşil bitki rejenerasyonunun arttığını ifade etmişlerdir.

Szarejko ve Kasha (1991) tarafından farklı arpa hat ve çeşitleri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, anterlere 0, 7, 14, 21 ve 28 gün sürelerle +4 °C'de soğuk ön

uygulama yapılmıştır. Genotiplere göre ön uygulama süresinin değiştiği, ancak tepki gösteren anter oranı yönünden 14 günlük sürenin uygun olduğu bildirilmiştir.

Baba (1992)'nın yaptığı bir çalışmada anter kültürü ile çeşitli yerli arpa çeşitlerinde N6 ortamında 15 ve 30 günlük +4 °C'de soguk ön muamele sonucu kallus ve embriyoid eldesi araştırılmıştır. 15 günlük ön uygulamada Tokak, Yerçil ve Gem çeşitlerinden kallus, Gem çeşidinden ise embriyoid elde edilmiştir.

Cai vd. (1992) tarafından yazlık arpa genotipleri kullanılarak yapılan çalışmada, indüksiyon ortamında karbon kaynağı ve büyüme düzenleyici kompozisyonunun etkisinin anter kültürüne tepkileri araştırılmıştır. Anterler ficoll içeren maltoz, sakkaroz (%6, a/h) karbonhidratlarından birinin ilave edilmiş olduğu BAC3 (Szarejko ve Kasha, 1991) ortamında kültüre alınmışlardır. Maltoz içeren ortamlarda sakkaroz içeren ortamlara oranla, tepki veren anter sayısında, kallus ya da embriyoid üretiminde ve yeşil bitki rejenerasyonunda önemli bir şekilde artış gözlenmiştir. Büyüme düzenleyicileri arasında test uygulandığında, oksin NAA (naftalenasetikasit) (2 mg/l) ve sitokinin BAP (6-benzilaminopürin) (1 mg/l) kombinasyonu, oksin 2.4-D ve sitokinin BAP ya da Zeatin riboside kombinasyonundan daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Ziauddin vd. (1992), phenylacetic asit oksininin buğday anter ve arpa anter/mikrospor kültürü üzerine etkilerini araştırdıklarını; PAA kullanıldığında indüksiyon oranının kontrole göre önemli farklılıklar göstermediğini, ancak hem buğday anter kültüründe hem de arpa mikrospor kültüründe daha fazla miktarda yeşil bitki rejenerasyonu elde edildiğini, bununla birlikte arpa anter kültüründe PAA kullanımının yararı olmadığını bildirmişlerdir.

Cistué vd. (1994) arpa anter kültürüne farklı ön uygulamaların etkilerini araştırdıkları çalışmada, 0.7 M manitol içeren ve 8 g/l agar ile katılaştırılan ortamda ön uygulamaya tabi tuttıkları anterlerde, bölünen mikrospor sayısının ve yeşil bitki rejenerasyonun albino bitki rejenerasyonuna oranla arttığını belirtmişlerdir.

Luckett ve Smithard (1995) anter kültüründe besin ortamı içeriğinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, farklı araştırmacılar tarafından arpa anter kültürü için geliştirilmiş farklı besin ortamlarını kullanmışlardır. Bu ortamlar; FHG (Hunter, 1987), K&FW (Kuhlman ve Foroughi-Wehr, 1989), BAC3 (Szarejko ve Kasha, 1991), Kao (Kao vd. 1991) olup, biri anter kültürü için model çeşit olan Igri olmak üzere toplam üç çeşitte çalışmışlardır. Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde ise, sonuçlar genotipe bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Çeşidin birinde en yüksek embriyoid ve rejenerant bitki oluşumunu sağlayan bir ortam diğer çeşitte etkisiz olmuş hiçbir sonuç alınamamıştır. Genotipe göre besin ortam içeriğinin optimize edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Bilgen, G. 1996'da yaptığı çalışmada, Yedi kültür x yabani arpa melezinde ebeveyn (P1, P2) ve açılan generasyonların (F2, F3) ortalama değerleri kullanılarak bitki boyu, basak boyu, basakta dane sayısı, basak verimi ve bin dane ağırlığı özelliklerine ilişkin gen etkileri tahmin edilmistir. Basak boyu için melezlerde yeterli bir genetik varyasyonun yaratılamadığı, tüm melezlerde bin dane ağırlığının kalıtımında epistasinin söz konusu olabileceği belirlenmiştir. Buna karşın bitki boyu için üç, basakta dane sayısı için dört ve basak verimi için bes melezde eklemeli - dominatlık modelinin geçerliliği saptanmıştır. Bitki boyu özelliği için Melez-6 (Quantum-A) ve Melez-7 (Quantum-B)' de, basak verimi için Melez-1 (Tokak-X)' de seçimin F2' de; basakta dane sayısı için Melez-1, Melez-2 (Kaya-X), Melez-6 ve Melez-7' de, basak verimi için Melez-2, Melez-4 (Kaya-Y), Melez-5 ve Melez-6' da seçimin ileri generasyonlarda yapılmasının başarıyı artıracığı sonucuna varılmıştır.

Lezin vd. (1996), farklı arpa genotiplerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, +4 °C'de 14 günlük soğuk uygulamasının anterlerde kallus oluşumunu ve buna bağlı olarak yeşil bitki rejenerasyonunu arttırdığını saptamışlardır.

Çelikaş ve Hatipoğlu (1997) tarafından arpa üzerine yapılan bir çalışmada, kültüre alınan 14.400 anterden, tüm varyantların ortalaması olarak % 0.27'lik bir tepki oranı elde edilmiş ve bu oranın genotiplere bağlı olarak % 0.00 - % 1.31 arasında değiştiği ortaya konulmuştur.

Hoekstra vd. (1997), Igri çeşidini bitki yetiştirmedeki optimal koşulları bulmak için araştırmışlardır. Ön uygulama olarak kalsiyum ve mannitol konsantrasyonlarının etkisi çalışılmıştır. Mikrosporu çıkarılarak çalışılan bitkiler, büyük genotipik farklılıklar içerdiğinden bitki ıslahında kullanılması kısıtlıdır. 3 ihtiyaç karşılanabilirse birçok arpa genotipinde androgenesis aracılığıyla double haploid bitki üretilebilir. İlk olarak mikrosporumların gelişim aşamasının mitozun erken aşamasında olması, ikincisi doğru ön uygulama ile gametofitik gelişme yönünü sporofitik gelişmeye dönüştürmesinin gerekli olması ve son olarak bitki üretiminde kullanılacak anterlerden izole edilen mikrosporumların doğru hormonla muamele edilmesinin gerekliliğidir. Arpada bu BAP ve 2,4-D hormonuyla başarılmıştır. Arpa için ön uygulamalar başakların soğuk ön uygulamaya tabi tutulması yada anterlerin mannitol solüsyonunda bekletilmesi olarak sayılabilir. İkinci olarak mikrospor canlılığı double haploid bitki üretimini artırdığını ve bitki üretiminde yüksek verim sağlayacağını vurgulamışlardır.

Cistué vd. (1999) tarafından, model (Igri çeşidi) ve düşük tepki veren çeşitlerde, anter ön uygulaması ve kültür ortamı içeriğinin yeşil double haploid bitki üretimi üzerine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada; mannitol ön uygulamasının bazı düşük tepki veren çeşitler için soğuk ön uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ön uygulama için mannitolün optimum konsantrasyonunun çeşide bağlı olarak değiştiği ve düşük tepki veren genotipin, iyi tepki verene göre daha fazla mannitol içeriğine ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Sıvı besin ortamına ficoll ilavesi ile embriyo ve yeşil bitki oluşumunun arttığı tespit edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerden, 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) ve TIBA (2,3,5-triiodobenzoik asit)'nin etkileri denenmiştir ve antioksin olan TIBA'nın düşük tepkili bazı çeşitlerde iyi embriyo oluşumu sağladığı kaydedilmiştir. İki sıralı çeşitlerden, altı sıralı olanlara göre daima daha fazla embriyo ve yeşil bitki oluştuğu tespit edilmiştir.

Hatipoğlu (1999), donör bitkilerin anterlerin alındığı döneme kadar çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmesi gerektiğini ve suni ışığın güneş ışığının yerini alamayacağını belirtmiştir. Ayrıca polen gelişimi aşamasında pestisit uygulamasından kaçınılması gerektiği kaydedilmiştir.

Savaşkan vd. (1999), anter kültürü tekniğinin dört arpa çeşidine (*Hordeum vulgare* L. var. Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86 ve Tokak-157/37) uygunluğunu araştırmışlardır. BAC3 ve FHG kültür ortamları kullanılmış ve 21 gün soğuk ön uygulamanın etkisi araştırılmıştır. Anter kültürü için kullanılan başaklar, mikrosporlar tek çekirdekli safhadayken toplanmış, 21 günlük soğuk ön uygulamadan sonra % 2'lik asetokarmin ile kontrol edildikten sonra anterler kültür ortamlarına alınmış ve 27 ± 1 °C sıcaklık ve karanlıkta inkübasyona alınmıştır. BAC3 ortamı FHG ortamından daha iyi sonuç vermiştir. BAC3 ortamında, 21 gün soğuk ön uygulamadan sonra Tokak ve Cumhuriyet çeşitlerinde kallus üretimi sırasıyla % 97.6 ve % 75.3 olarak bulunmuştur. Anadolu ve Obruk çeşitlerinde ise bu oran % 40.4 ve % 34.5 olarak bulunmuştur. BAC3 ortamında bütün çeşitlerde bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir ve en yüksek yeşil bitki üretimi Cumhuriyet-50 çeşidinde görülmüştür.

Doğramacı-Altuntepe vd. (2001), buğdayda donör bitkilerin yetiştirme şartlarının anter kültürüne etkilerini araştırmışlardır. Serada ve tarlada yetişen bitkilerin iklim odasında yetişenlere göre önemli derecede iyi sonuç verdiğini, tarlada yetişen materyalin ise serada yetişenlerden daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Yeşil bitki rejenerasyonunun tarlada ve serada yetişen materyalden elde edildiğini, ancak farkın önemli olmadığını; her iki ortamda yetişen materyalden albino bitkilerin de oluştuğunu; ancak iklim dolabında yetişen materyalden anter reaksiyonu alınmasına rağmen, albino veya yeşil bitki rejenerasyonu gerçekleşmediğini ifade etmişlerdir.

Kruczkowska vd. (2002), biri androjenetik potansiyeli yüksek Igri çeşidi olmak üzere 3 arpa çeşidinde 3 farklı ön uygulama yönteminin anter kültürüne etkilerini araştırmışlardır. Ön uygulama yöntemleri sırasıyla 1) 4 °C'de, 28 gün 11) 0.3 M mannitol içeren ortamda, 25 °C'de, 4 gün 111) 0.3 M mannitol içeren ortamda 4 °C'de, 4 gün şeklindedir. Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, soğuk ön uygulama yönteminin (1) embriyoid/kallus oluşum oranını artırdığı, mannitol ön uygulaması yönteminin (11) ise, 13 yeşil rejenerant bitki sayısını artırdığı gözlemlenmiştir. Mannitol+soğuk ön uygulama (111) yöntemi ise etkisiz kalmıştır.

Lazaridou vd. (2005) yaptıkları çalışmada, farklı arpa çeşit, melez ve populasyonlarının anter kültüründe, 4 °C’de 14 ve 28 gün süre boyunca soğuk ön uygulamadan sonra iki farklı katı başlangıç ortamında, embriyoid oluşturma frekansı ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. İçerik ve enerji kaynağı bakımından (FHG’de maltoz, N6’da sukroz) birbirinden farklı olan N6 (Chu, 1978) ve FHG (Hunter, 1987) besin ortamları kullanılmıştır. Embriyoid sıklığı ve yeşil bitki rejenerasyonu her iki ortamın içeriklerine ve soğuk ön uygulamaya bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 28 gün soğuk ön uygulama ile FHG ortamının kombinasyonu haploid embriyo oluşma ve yeşil bitki üretiminde en etkili sonuç vermiştir. Ayrıca, yeşil bitki üretimi genotipe bağlı olarakta değişmektedir. Çalışılan genotiplerden, Thermi çeşidi ve Niki x Thermi F1 melezinde en yüksek frekansta yeşil bitki üretimi oluşmuştur. Anter kültüründe embriyoid oluşumu yüksek ya da orta frekanslı olan ebeveyn, F1 melez ya da F2 generasyonunda yeşil bitki üretiminin etkinliğinin artmasına yol açmaktadır.

Jacquard vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, arpada donör bitkilerin yıllık döngüsü ve anter/başak pozisyonunun anter kültüründe bitki eldesi ve albinizm üzerine etkileri tespit edilmiştir. Çalışmada anter kültürüne tepkileri benzer fakat yeşil bitki oluşumu sırasıyla % 78 ve % 2 olarak bilinen “İgri” kışlık çeşidi ve “Cork” yazlık çeşidi kullanılmıştır. Her iki çeşitte de Şubat ve Temmuz ayları arasında alınan anterlerde Ağustos ve Aralık aylarında alınanlardan daha fazla sayıda rejenerant bitki elde edilmiştir. Bununla birlikte albino bitki oluşumu oranı etkilenmemiştir. Anterlerin ana başaktan ya da 4. kardeşten alınmasına göre çeşitlerin anter kültürüne tepkisi değişiklik göstermiştir. “İgri” çeşidinde % 76.6’dan % 31.5’e, “Cork” çeşidinde % 58’den % 32’ye düştüğü kaydedilmiş böylece anter kültürüne tepkide genotipin etkisi gözlemlenmiştir.

Slama-Ayed vd. (2009), Makarnalık buğdayda izole mikrospor kültüründe ön uygulamaların etkisini araştırmışlardır. İslahçılar tek bir jenerasyonda saf hat üretebilmek için androgenesis yoluyla double haploid bitki üretmektedirler. Androgenesis izole mikrospor kültürü ile başarılabılır fakat çok az yeşil bitki üretimi sağlar. Haploid makarnalık buğday rejenerasyonunu artırabilmek için 8 farklı ön uygulamayı karşılaştırmışlardır. Bunlardan ilki 5 haftalık soğuk ön uygulaması, 4 °C’de

12 günlük 0,3 M Mannitol, 4 °C'de 7 günlük 0,3 M Mannitol, 4 °C'de 5 günlük 0,7 M Mannitol, 4 °C'de 1.5 % PEG4000 5 gün, 4 °C'de 1 % PEG4000 15 gün, 4 °C'de 1 % PEG4000 10 gün ve ön uygulama yapılmayan olarak gruplandırmışlardır. 5 haftalık soğuk ön uygulaması en etkin ön uygulama olarak belirlenmiştir. Bu ön uygulama embriyogenesis indüksiyonunu ve yeşil bitki üretimini önemli ölçüde artırmıştır. 4 °C'de 1 % PEG 4000 10 gün'lük ön uygulama umut verici bir uygulama olarak görülmüştür ve yeni denemelerdeki sonuçları kayda değer görülmektedir.

Cistue' L, vd. (2011), erkek ve dişi gametler kullanılarak elde edilen double haploid Oregon Wolfe arpalarında karşılaştırmalı haritalama çalışması yapmışlardır. Oregon Wolfe arpaları; genetik araştırmalar için bir kaynaktır. Önceki araştırmalar DH çalışmalarında dişi gamet kullanılarak yapılan *Hordeumbulbosum* methoduna dayanıyordu. Bu çalışmada ise erkek gamet kullanılarak yapılan anter kültürü yöntemi geliştirilmiştir. 1328 tek nükleotid polimorfizm bağlantıları kullanılarak her iki alt popülasyonlar için bağlantı haritaları oluşturulmuştur. Lokus sıralamasında hiçbir fark görülmemiştir. Anter kültürü yoluyla elde edilen alt popülasyonlarda *Hordeumbulbosum* yöntemine göre elde edilen alt popülasyonlara göre daha büyük bir açılım gözlenmiştir.

Kahrız vd. 2011'de 90 mg / l sukroz, 2 mg / l 2,4-D ve 0.1 mg/l Kinetin takviyeli katı FHG indüksiyon ortamı üzerinde anter kültürüne 12 İran kış diploid arpa çeşidinin (*Hordeum vulgare* L.) tepkisini belirlemek üzere bir çalışma yapmışlardır. Soğuk ön işlem için, seçilen her başak 14 gün boyunca 4 °C'de buzdolabında tutulmuştur. Denemeler dört tekrarlamalı rastgele bir tasarımdan (CRD) oluşmuştur. Tüm genotiplerde embriyogenezis ve yeşil bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. 100 anter başına yeşil ve albino bitki sayılarının yanı sıra embriyoid sayısı ve toplam bitki yenilenmesi kaydedilmiştir. Sonuçlar, genotipin embriyo indüksiyonu, toplam bitki yenilenmesi, yeşil ve albino rejenerasyonunda önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. 9 no'lu genotip, embriyo üretimi, yeşil ve toplam bitki rejenerasyonu için en iyi sonucu vermiştir (sırasıyla % 74.792, % 7.293 ve % 17.29). Doğrusal korelasyon analizi, embriyo indüksiyonu ile yeşil bitki yenilenmesi arasında pozitif ve anlamlı (p <0.01) bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Lazaridou vd. (2011); düşük ve yüksek bitki yoğunluğunda seçilen yüksek ve düşük verimli F2 arpa bitkilerinin soyundan kaynaklanan anterlerin in vitro kültür cevabı araştırılmıştır. Genç başaklar toplanmış ve 28 gün 4 derecede bekletildikten sonra anterler FHG ortamına alınmıştır. 60 farklı F2 popülasyonu kullanılmış ve bunların 39'u anter kültürüne cevap vermiş, bunlardan da sadece 15 popülasyon yeşil bitkicik oluşturmuştur. % 72,7 fertil bitki elde edilmiş ve tohum bağlamıştır. 60 popülasyondan sadece 39 u anter kültürüne tepki vermiş ve embriyo oluşturmuştur. Bu 39 familyanın da 22 si yüksek verimli genotipten 17 si düşük verimli genotipten elde edilmiştir. F2 bitkilerinde yüksek veya düşük bitki yoğunluğu altında seçilmiş olanlarda yeşil bitkiler üreten bitkilerin % 67'si yüksek verimden kaynaklanmaktadır. Yüksek verimli familyalardan gelen anterler, 100 anter başına düşük verimli olanlardan daha fazla yeşil bitki üretmiştir. Sonuç olarak yüksek verimli bitkiler daha yüksek oranda embriyo, daha yüksek oranda yeşil bitkicik ve daha az albino bitki oluşturmuştur. Verim kapasitesi ve anter kültürüne tepki arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir.

Al-Ashkar (2013), bazı buğday genotillerinin tuz toleransına ve anter kültürüne tepkisini araştırdığı çalışmada 5 farklı ekmeklik buğday çeşidinin (4 tanesi F1 melez kombinasyonu) anter kültürüne tepkisini ölçmek için 4 farklı besiyeri kullanmıştır. Test edilen genotipler arasında önemli genetik varyasyonlar gözlenmiştir. Kallus oranları % 4,67 ile 9,42 arasında değişirken, yeşil bitkicik oranları % 2,42 ile 5,40 arasında değişmiştir. NaCl konsantrasyonları ile ilgili olarak NaCl içermeyen besiyeri diğerine göre çoklu sürgün verme bakımından daha iyi sonuç vermiştir.

Begona ve Cistue (2015) arpa ve ekmeklik buğdayda ön muamelede DMSO ilavesi ile androgenik etkiyi artırmayı amaçlamışlardır. DMSO membran geçirgenliğini artırırken, zar akışkanlığını azaltan fizikokimyasal özelliğe sahiptir. Bu nedenle % 0, 0.2, 1 ve 2 dozlarında denemeler kurmuşlardır. Arpada 0,7 M Mannitol, 40 mM CaCl₂.H₂O % 8 Sea Plaque agarose ilavesi ile katılaştırılmış bir besiyeri hazırlanmıştır. Hunter 1988'de belirtilen yöntemle göre anterler 4 gün 24 °C'de karanlıkta bekletilmiş ve 4 gün sonra 1,5 ml Ficoll 200 içeren FHG besiyerine aktarılmıştır. 10 gün sonra kallusları güçlendirmek için Ficoll 400 içeren besiyerine alınmıştır. Rejenerasyon için 2 mg/l NAA içeren MS ortamı hazırlanmış ve burada yeşil sürgün oluşturması sağlanmıştır.

Sonuç olarak % 1 DMSO uygulaması en iyi sonucu vermiştir. % 2 DMSO uygulaması toksik etkiden dolayı olumsuz sonuç alınmıştır.

Sriskandarajah vd. 2015 yılında; arpa bitkisinde anter kültürü çalışmalarında albino bitki oluşumunun büyük bir sıkıntı olduğunu belirtmişlerdir. Bu özellik kısmen genetik olarak kontrol edildiği için, abinizimi azaltmak adına kültür koşulları genotipe göre uyarlanmalıdır. Kullandıkları yazlık çeşitte kültür koşullarını iyileştirerek yeşil bitki oranını % 6'dan % 42'ye kadar artırdıklarını bildirmişlerdir. Yeni oluşturdukları protokolde, ara rejenerasyon ortamına kazein hidrolizat ilavesi ile yeşil bitki sayısı maksimuma çıkmıştır. Embriyolar için kullanılan sürgün ve kök geliştirme ortamı, literatürde bildirilen standart besiyerinden daha üstün olmuştur. Modifiye edilen yöntemin diğer inatçı genotipleri test etmek için mükemmel bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırmada T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Arpa Islah birimi, Ankara'dan temin edilen iki sıralı arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerinden Bülbül-89, Tarm-92, Akar, Zeynelağa ve Aydanhanım ile yabani arpa türü olan *H. spontaneum* K. Koch, L. ve onların resiprokal melez kombinasyonları kullanılmıştır. *H. Spontaneum* türü Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle yerleşkesinden toplanmıştır. Tür teşhisi için Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'dan (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) yardım alınmıştır.

Tarm-92; 1992 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescil ettirilmiş, 2 sıralı yemlik bir çeşittir. Kılçıklı, uzun başaklı, kavuzlu-beyaz daneli, ince uzun yapraklı, bitki boyu 90-100 cm'dir. Alternatif gelişme tabiatında, yatmaya dayanıklı, kurak ve mikro element (Çinko ve Bor) toksisitesine toleranslı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, ekim nöbetinde en istikrarlı, orta-erkenci, başak kırılıcılığı yok ve kolay harmanlanabilir bir çeşittir (Şekil 3.1). Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına orta dayanıklıdır. Kuru koşullarda verimi 350-450 kg/da'dır (Anonim 2017).



Şekil 3.1 Tarm-92 çeşidine ait tohumların şematik görüntüsü (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

Bülbül 89; 1989 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescil ettirilmiş 2 sıralı yemlik bir çeşittir. Kılçıklı, uzun başaklı, kavuzlu, beyaz daneli, dar-koyu yeşil yapraklı, bitki boyu 90-100 cm'dir. Alternatif gelişme tabiatında, yatmaya orta dayanıklı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, orta geççi, başak kırılıcılığı yok ve kolay harmanlanabilir (Şekil 3.2). Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına orta dayanıklıdır. Kuru koşullarda verimi 350-450 kg/da'dır (Anonim 2017).



Şekil 3.2 Bülbül-89 çeşidine ait tohumların şematik görüntüsü tohumlar (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

Aydanhanım; 2002 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescil ettirilmiş 2 sıralı maltlık bir çeşittir. Kılçıklı, düzgün ve uzun başaklı, ince kavuzlu beyaz iri daneli, geniş-uzun yapraklı, 95-115 cm boyundadır. Kışlık gelişme tabiatında, yatmaya dayanıklı, kardeşlenmesi yüksek, suya ve azota tepkisi iyi, eş zamanlı oluma sahip, orta-geççi, başak kırılıcılığı yoktur ve kolay harmanlanabilir özelliktedir (Şekil 3.3). Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına orta dayanıklıdır. Destek sulu koşullarda verimi 450-550 kg/da'dır (Anonim 2017).



Şekil 3.3 Aydanhanım çeşidine ait tohumların şematik görüntüsü (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

Zeynelağa; 2003 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescil ettirilmiş 2 sıralı maltlık bir çeşittir. Saplar 80-100 cm uzunluğunda yatmaya dayanıklı yapraklar, açık yeşil ve yarı dik, 2 sıralı, uzun, sık, yarı dik, kılçıkları paralel ve dişli olup, alternatif gelişme tabiatlıdır. Kışa ve yatmaya dayanıklı, orta erkenci, suya ve gübreye reaksiyonu iyi ve yüksek verimli bir çeşittir. Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına orta dayanıklıdır (Şekil 3.4). Destek sulu koşullarda verimi 400-500 kg/da civarındadır (Anonim 2017).



Şekil 3.4 Zeynelağa çeşidine ait tohumların şematik görüntüsü (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

Akar; 2012 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescil ettirilmiş 2 sıralı yemlik bir çeşittir. Kılçıklı, uzun ve düzgün başaklı, beyaz ve iri daneli, geniş uzun yapraklı ve uzun boylu bir çeşittir. Kışlık-alternatif gelişme tabiatında, sağlam saplı yatmaya dayanıklı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, suya ve azota tepkisi iyi, eş zamanlı olgunlaşmaya sahip, başaklanma zamanı orta, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilen, yüksek verimli bir çeşittir. Destek sulu koşullarda 450-650 kg/da'dır (Şekil 3.5). Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına karşı orta dayanıklıdır (Anonim 2017).



Şekil 3.5 Akar çeşidine ait tohumların şematik görüntüsü (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

H. spontaneum, başak ekseninin bir boğumundan üç başakçık çıkar. Bunlardan yalnızca ortadaki dane bağlar; yandakiler kısırdır. Daneleri geç çimlenir. Başak uzun, seyrek; başak eksenini kırılıcılı, başak eksenini boğumları sık tüylüdür. Kılçığı çok uzun (12-15 cm) ve dişlidir. Siyah, gri-kahve ve beyaz başaklı varyeteleri vardır. Daneleri kavuzludur. Doğu Akdeniz çevresinde yaygındır.

Kültür arpasının yabani formudur. Yapılan bilimsel çalışmalar *H. spontaneum*'un kültüre alınmış arpadan daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiş ve özel çevresel koşullara uygun birçok farklı allele sahip olduğu bildirilmiştir (Forster vd. 2000, Van- Rijn, 2001). Verim ve verim unsurları, çiçek yapısı, protein içeriği, bitki boyu vb. gibi özellikler açısından kendi içinde geniş bir varyasyon gösterdiği (Şekil 3.6) ve bu özelliklerin klasik melezleme ıslahı yoluyla kültür arpa çeşitlerine aktarılabileceği

birçok araştırmada rapor edilmiştir (Ivandic vd. 2000, 2002; Volis vd. 2000, 2002). Biyotik ve abiyotik strese karşı olan dayanıklılığı artırmak için ıslahı gerçekleştirilmiş mahsullerde ve doğal popülasyonlarda genetik çeşitliliğin korunması gerekmektedir. Islahı gerçekleştirilen popülasyonlardaki çeşitlilik aynı zamanda genetik gelişimin de sürdürülebilirliğini sağlamak açısından önemlidir (Martin vd. 1991). Yabani türler ticari ıslah faaliyetleri için potansiyel gen kaynağıdır (Vanhala, 2004).



Şekil 3.6 *Hordeum spontaneum* yabani türüne ait tohumların şematik görüntüsü (Orijinal, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle/Ankara)

Bu çalışmada Merck KGaA (Darmstadt, Almanya), SigmaAldrich (St. Lo. MI ABD) ve Duchefa (Harlem, Hollanda)'dan temin edilen kimyasal maddeler kullanılmıştır. Laboratuvar malzemeleri SigmaAldrich (St. Lo. MI ABD)'den temin edilmiştir. Katılaştırıcı olarak Phytigel ve Agar (SigmaAldrich - St. Lo. MI ABD) kullanılmıştır.

Sanyo versatile marka (MLR-352 H) (Moriguchi, Osaka, Japonya) tip iklim dolabı kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tescilli çeşitler ve yabani türün yetiştirilmesi

Bülbül-89, Tarm-92, Akar, Zeynelağa ve Aydanhanım arpa kültür çeşitleri ile yabani arpa türü olan *H. spontaneum*'un ekim işlemlerine 2013 yılının Ekim ayında başlanmış

olup, 15 gün aralıklarla 3 farklı zamanda devam edilmiştir. Tohumlar 5 numaralı plastik saksılara 1:1:1 (toprak: kum: torf içeren) karışımlara ekilmiştir. Daha sonra, deneme bitkilerine haftada bir kere Vilmorin™ sıvı bitki gübresi (Anadolu Tohum Üretim ve Pazarlama A.Ş. İstanbul-Türkiye) üretici talimatı doğrultusunda hazırlanarak verilmiştir.

Melezleme, varyasyon yaratmak amacıyla bitki ıslahçıları tarafından kullanılan önemli tekniklerden biridir. Melez programı; anaç hatların seçimi, melezlemenin yapılması ve melez materyalin işlenmesi aşamalarını içeren çalışmaları kapsamaktadır. Tez kapsamındaki melezleme çalışmaları; 2014 yılı Ocak ayının ikinci haftasından itibaren başakların kından çıkmasıyla uygun aşamaya gelen bitkilerden başaklar seçilerek yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsüne (Yenimahalle/Ankara) ait sera koşullarında deneme bitkilerinin yetiştirilmesi (Orijinal)

Ana olarak kullanılacak bitkilerin bayrak yaprağı kınından tam çıkmamış başaklarında; kın pens ile kesilerek dışarı çıkartılmıştır. Steril başakçıklar pens yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra fertil başakçıkların kavuzları üst kısmından makasla kesilmiştir. Daha sonra, her başakçıktaki 3 adet anterin hepsi pens yardımıyla çıkartılarak kastrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem bütün başakta tamamlanmıştır. Son olarak, başak 3×15 cm boyutlarındaki ‘Eskiz kağıdı’ ile kapatılmıştır (Şekil 3.8). Melezleme: baba olarak kullanılacak olgunlaşmış çiçek tozu içeren başaklardaki anterlerin eskiz kağıdının üzerine dökülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kastrasyondan

yaklaşık 3–6 gün sonra toz verilmiştir. Melezlemede çeşitler ana ve baba olacak şekilde resiproklı (Çift taraflı) olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.8 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsüne (Yenimahalle/Ankara) ait sera koşullarında melezleme (Orijinal);

- a. Steril başakcıkların pensle uzaklaştırılması,
- b. Başakcıkların üstten 1/3'lik mesafeden kesilmesi,
- c. Pens yardımıyla 3 adet anterin başakcıktan uzaklaştırılması
- d. Kastrasyonu tamamlanan başak üzerine saydam zarfın geçirilmesi



Şekil 3.9 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsüne (Yenimahalle/Ankara) ait sera koşullarında; a. kültür çeşidi (Aydanhanım), b. F1 arpa başağı görüntüsü ve c. *Hordeum spontaneum* melezinden elde edilen (Orijinal)

Her bir kombinasyondan yaklaşık 25-30 adet melez yapılmıştır. Anterlerin uzun süre elde edilebilmesi için melez tohumlar, 2015 yılı Ocak ve Ekim ayı ile 2016 yılı Mart aylarında ekilerek haploid bitki üretimi için materyal sağlanmıştır (Şekil 3.9). Sera koşullarında yapılan melezleme çalışmaları çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında belirtilen arpa çeşitlerinin sera koşullarında melezlemeleri

Tarm-92 × Bülbül-89	Zeynelağa × Tarm-92
Tarm-92 × Aydanhanım	Zeynelağa × Bülbül-89
Tarm-92 × Zeynelağa	Zeynelağa × Aydanhanım
Tarm-92 × Akar	Zeynelağa × Akar
Tarm-92 × <i>H. spontaneum</i>	Zeynelağa × <i>H. spontaneum</i>
Bülbül-89 × Tarm-92	Akar × Tarm-92
Bülbül-89 × Aydanhanım	Akar × Bülbül-89
Bülbül-89 × Zeynelağa	Akar × Aydanhanım
Bülbül-89 × Akar	Akar × Zeynelağa
Bülbül-89 × <i>H. spontaneum</i>	Akar × <i>H. spontaneum</i>
Aydanhanım × Tarm-92	<i>H. spontaneum</i> × Tarm-92
Aydanhanım × Bülbül-89	<i>H. spontaneum</i> × Bülbül-89
Aydanhanım × Zeynelağa	<i>H. spontaneum</i> × Aydanhanım
Aydanhanım × Akar	<i>H. spontaneum</i> × Zeynelağa
Aydanhanım × <i>H. spontaneum</i>	<i>H. spontaneum</i> × Akar

3.2.2 Melez tohumların hasadı

Melezleme çalışması sonrası tohum bağlayan bütün başaklardan tohumlar 2014 yılı Eylül ayında hasat edilmiştir (Şekil 3.10). Hasat edilen melez tohumları fungal ve bakteriyel hastalıklardan ve zararlılardan korumak amacıyla kese kağıtları içerisinde serin ve karanlık yerde saklanmıştır.



Şekil 3.10 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsüne (Yenimahalle/Ankara) ait sera koşullarında hasat olgunluğuna gelmiş olan Tarm-92 × Bülbul-89 melez bir arpa başağı görüntüsü (Orijinal)

3.3 Anter Kültürü Çalışmaları

3.3.1 Anter kültürü uygulamaları

Anter kültürü çalışmaları aşağıda belirtilen başlıklar şeklinde yapılmıştır,

- i. Donör Bitkilerin serada kültüre alınması
- ii. Başakların toplanması
- iii. Sterilizasyon
- iv. Stok Çözeltilerin Hazırlanması
- v. Ön Muamele,
- vi. Anterlerin Besi Ortamına Alınması,
- vii. Kallusların oluşumu ve adventif sürgün gösteren eksplantların rejenerasyon ortamına aktarılması,
- viii. Gelişen bitkiciklerin köklendirilmesi ve üzerindeki dormansi kırmak amacıyla vernalizasyona tabi tutulması,
- ix. Kök gelişimini tamamlayan bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması (adaptasyon/aklimatizasyon)

- x. Bitkilerde mikroskop veya ploidi analyzer cihazı ile ploidi düzeylerinin belirlenmesi,
- xi. Haploid bitkilerde kromozom katlamasının belirlenmesi ve sera koşullarında başakların elde edilmesi

Bu safhalar alt başlıklar halinde tek tek açıklanmıştır.

3.3.2 Donör bitkilerin ekimi

Donör bitkiler; 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık, 24 ± 2 °C sıcaklık ve Vilmorin™ (Anadolu Tohum Üretim ve Pazarlama A.Ş. İstanbul/Türkiye) sıvı bitki besin ortamı ile optimal şartların sağlandığı sera koşullarında yetiştirilmiştir.

Bitkilerin sağlıklı gelişimini sağlamak için toprak: kum: torf eşit oranlarda karıştırılarak kullanılmış ve 5 l'lik plastik saksılara, her bir saksıda 3 adet tohum olacak şekilde ekim yapılmıştır. Çimlendikten 10 gün sonra bitkilerin vernalizasyon (soğuklama) ihtiyaçlarını karşılamak amaçlı 4-5 hafta sıcaklığı 4 °C'de, 16 saat ışık fotoperiyodunda iklim dolabında (Sanyo Versalite Environmental Test Chamber, England) vernalize edilmiştir. Bu çalışma kapsamındaki kültür çeşitleri ve yabani tür olan *H. spontaneum* ile melez tohumların ekimi 2015 yılının Ocak ayında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11). Ayrıca, bitkilerin sağlıklı gelişimi açısından, her bir saksıya 5 günde bir 500 ml çeşme suyu ilave edilmiştir. Daha sonra bitkiler, 24 ± 2 °C' sıcaklığa ayarlanmış sera koşullarına alınmıştır ve başakların anter kültürü için uygun aşamaya gelmesi beklenmiştir.



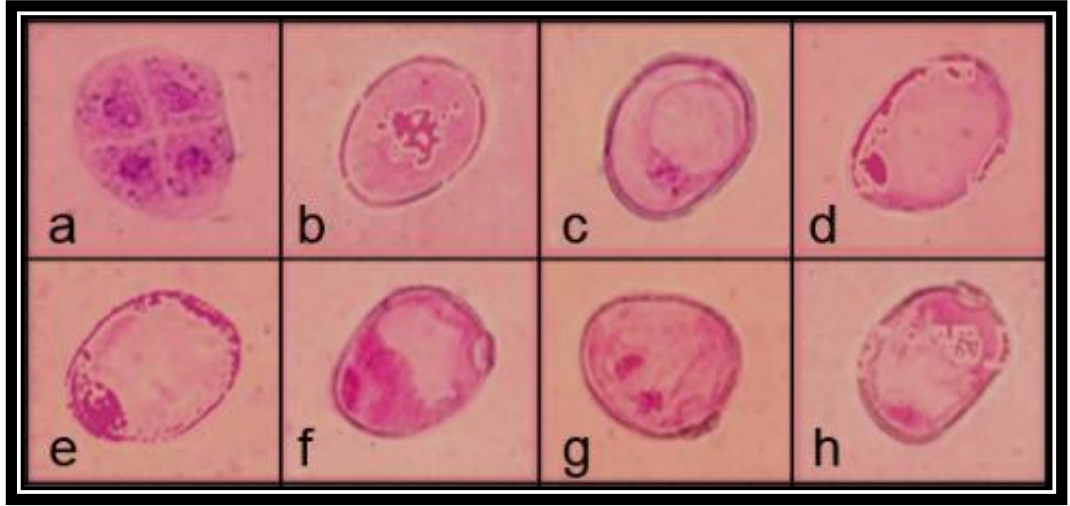
Şekil 3.11 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne (Yenimahalle/Ankara) ait seralarda; anter kültürü çalışmalarında kullanılan donör bitkilerin ekimi (Orijinal)

3.3.3 Başakların hasat edilmesi

Donör bitkinin elde edildiği dönem olan mikrospor gelişim evresi başarıyı belirleyen en önemli faktörlerden birisidir (Lörz vd. 1988). Mikrosporların gelişme dönemi Szarejko ve Kasha, (1991)'nin önerdiği gibi (Şekil 3.12) yapılmış ve farklı morfolojik karakterler arasında bayrak yaprak, başak ve bitki boyu gibi özelliklere bakılarak bir korelasyon kurulmuştur.

Huang ve Sunderland (1982) ve Powell (1988) anter kültürü için uygun aşamadaki arpa başağını seçmek üzere sitolojik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada başağın orta kısmında bulunan çiçeklerdeki anterleri, lam üzerine bir damla asetokarmin damlatarak hafif parçalamış ve sonra üzerine lamel kapatmışlardır. Denemede kullanılan başakların ortasındaki anterler asetokarmin boyasıyla boyanmıştır ve mikroskop ile incelenmiştir.

Asetokarmin hazırlanışı; 55 ml saf su ile 45 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak kaynatılmış ve 1 g karmin ilave edilerek filtre edilmiştir.



Şekil 3.12 Arpada mikrospor gelişme safhalarının şematik görüntüsü (Szarejko ve Kasha 1991)

a. tetrad, b. erken tek çekirdek, c. erken-orta tek çekirdek, d. orta tek çekirdek, e. orta-geç tek çekirdek, f. geç tek çekirdek, g. anafaz, h. iki çekirdek.

Ayrıca, TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) (Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Germany) solüsyonu ile boyanarak anterlerin canlılığı da tespit edilmiştir. TTC solüsyonu için öncelikle 0,71 gr sodyum fosfat (NaH_2PO_4) tartılıp 100 ml'ye tamamlanarak buffer hazırlanmıştır. Daha sonra 0,48 gr TTC tartılarak 20 ml MS sıvı besin ortamında çözdürülmüş ve 40 ml buffer eklenerek solüsyon hazır hale getirilmiştir (Towill ve Mazur, 1975). Anter kültürü için uygun aşamada olan başaklardan seçilen anterler TTC solüsyonuna konulmuş ve karanlık bir alanda yaklaşık yarım saat kadar bekletilmiştir. Kırmızı (Formazan oluşturan) renk alanlar canlı, renk değiştirmeyenler ise cansız olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13). Elde edilen sonuçlara göre en fazla kırmızı renk alan başaklar anter kültürü için uygun bulunmuş olup, çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.13 Biyoteknoloji Araştırma Merkezi laboratuvarında Aydanhanım çeşidine ait anterlerde uygulanan canlılık testi sonucu anterler üzerindeki kırmızı renkli formazan oluşumu

Seçilecek olan başaklar arasında morfolojik gözlem yapılmış olup, bayrak yaprağın altındaki yaprak ile arasındaki mesafe baz alınmış, bu aralığın 3-6 cm olmasına dikkat edilmiştir (Şekil 3.14). Belirtilen şekildeki başaklar için en iyi zaman olan sabahın erken saatleri (07:00-08:00) olarak belirlenmiştir (Pauk vd. 2003).

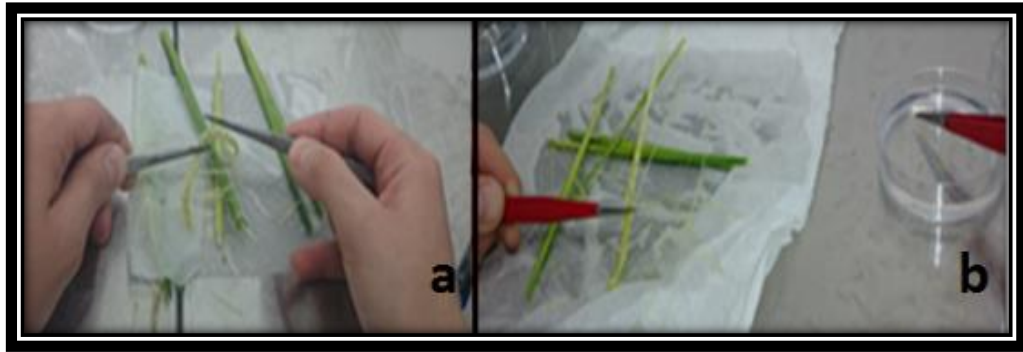
Güneş doğduktan yaklaşık 2-3 saat sonra başaklar alttaki ilk boğumdan ya da ikinci boğumdan makasla kesilerek içi saf su dolu behere alınmıştır. Başakların üzeri nem kaybının önlenmesi amacıyla şeffaf bir poşet ile kapatılmış ve laboratuvar koşullarına getirilmiştir.



Şekil 3.14 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne (Yenimahalle/Ankara) ait seralarda; arpa'da anter kültürü için orta tek çekirdek aşamasındaki başlangıç materyalinin seçilmesi (Orijinal)

3.3.4 Sterilizasyon

Belirlenen aşamadaki gametleri bulunduran başaklar, % 70'lik etanol ile yüzeysel dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra steril koşullarda başakçıkların içerisinden zarar vermeden çıkartılan erkek ve dişi gametler, önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş besi ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Biyoteknoloji Araştırma Merkezi laboratuvarında (Yenimahalle/Ankara); a. Steril kabinde % 70 etanol muamelesi ile yüzey sterilizasyon işlemi b. anterlerin uygun besiyerine yerleştirilmesi (Orijinal)

3.3.5 Ön muamele

Arpa anter kültürü çalışmalarında, stres uygulamalarının gametofitik gelişmeyi engellediği ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Cistue vd. 1999). Stres uygulamaları arasında ise en etkili olanının soğuk ön uygulamaları olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Powell 1988, Szarejko ve Kasha 1991, Lezin vd. 1996).

İlk yöntem olarak; metabolik şeker yerine geçen mannitol kullanılmış ve karbonhidrat eksikliği denenmiştir.

0,7 M Mannitol; 64,8 gram mannitol tartılmış ve 250 ml su içerisinde 50°C sıcaklıkta çözünmesi sağlanmıştır. Öte yandan 8 gr/l Sea Plaque Agarose tartılarak 250 ml su içerisine eklenmiş ve otoklavlanmıştır. Çözünen mannitol solüsyonu filtre sterilizasyon yöntemi ile steril hale getirilmiş ve otoklavdan çıkarılan agar çözeltisi ile karıştırılarak 6 cm boyutundaki petrilere dökülmüştür.

Öncelikli olarak çıkarılan anterler 0,7 M mannitol içeren besiyerine alınmıştır. İnatçı genotiplerle çalışıldığı zaman mannitol konsantrasyonu 1-1,5 M'a kadar çıkarılabilir (Cistue vd. 2003). Her başaktan ortalama 30 anter çıkarılmış ve karanlıkta 24 °C'de kültüre alınmıştır. Bu ortamda 4 gün beklemiş anterlerin mannitolü absorbe etmesi sağlanmıştır.

İkinci yöntem olarak; mannitol yoğunluğu 0,3'e düşürülmüştür.

0,3 M Mannitol; 54,6 gram mannitol tartılarak 1000 ml su içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon filtre sterilizasyon yöntemiyle steril hale getirilmiş ve kullanılacağı anda 6 cm boyutundaki Petrilere dökülmüştür. Her başaktan ortalama 30 anter çıkarılmış ve sıvı besiyerinde anterler 4 °C'de, 4 gün karanlıkta bekletilmiştir (Kasha vd. 2003).

Üçüncü yöntem olarak; seçilen başaklar 9 cm lik petri kaplara bir miktar su eklenerek konulmuştur. Petri kapları parafilm ile sarılmış ve 21 gün +4 °C’de karanlıkta kullanılabilecek kadar saklanmıştır. Szarejko ve Kasha’nın belirlediği protokole göre su içerisinde 21 gün bekletilen başakların sterilizasyonu yapıldıktan sonra anterler BAC3 başlangıç besiyerine alınmıştır.

3.3.6 Stok çözeltilerin hazırlanması

Cistue vd. (2003)’nin protokolüne göre; denemeler için stok solüsyonları hazırlandıktan sonra +4 °C’de bekletilmiş ve her 15 gün sonra tazelenmiştir. Öncelikle -20 °C’de muhafaza edilmek üzere mikrostok çözeltisi hazırlanmıştır. -20 °C’de solüsyonlar 3 ay kadar saklanabilmektedir.

1. Mikrostok çözeltisi

Çizelge 3.2 Mikrostok Çözeltisi

Mikrostok bileşimler	mg/l
H ₃ BO ₃	620
NaMoO ₃ .2H ₂ O	25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5
MnSO ₄ .H ₂ O	1690
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5
KI	83

Hazırlanan stok solüsyonu 50 ml ‘de çözündürülmüş ve 2 ml’lik ependorflara konularak -20 °C’de depolanmıştır. Daha sonra kallus oluşturma ve rejenerasyon ortamında kullanılmak üzere 2. stok solüsyonu hazırlanmıştır.

2. FHG stok solüsyonu

Çizelge 3.3 FHG stok solüsyonu

FHG stok solüsyonu bileşikler	g/l
KNO ₃	7,6
NH ₄ NO ₃	0,66
KH ₂ PO ₄	0,68
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,70
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,480
FeNa(EDTA) ₂	0,16
Myo İnositol	0,4
Glutamin	2,92
Mikrostok (Çizelge 3.2'den)	2 ml
Tiamin	10 ml

Bütün kimyasallar hassas terazi ile tartılmış ve 2 litreye su ile tamamlanmış ve yalnız 1 litresine glutamin eklenmiştir. Vitamin solüsyonu olarak tiamin HCL kullanılmıştır.

3.3.7 Anterlerin besi ortamına aktarılması

Bu çalışmada, 0,7 M mannitol ön uygulamasından alınan anterler için öncelikle FHG (değiştirilmiş bir MS ortamıdır) adı verilen besiyeri hazırlanmıştır (Murashige ve Skoog 1962). Hızlı bozulmadan sakınmak amacıyla sukrozun yerini maltoz almıştır. Yüksek oranda glutamin içerir ve amonyum nitrat miktarı azaltılmıştır. Ficoll Type 200 ortamına yüksek moleküler ağırlıklı bir polisakkarit olan Ficoll; embriyo ve mikrosporların gelişimini teşvik amacıyla litreye 200 gram olacak şekilde eklenmiştir. Fhg stok solüsyonundan (Çizelge 3.3) 500 ml alınmış ve içerisine 62 gr maltoz ve 10 ml BAP ilavesi yapılarak karıştırılmıştır. Ficoll ve hazırlanan diğer solüsyon birleştirilerek PH'sı 5,8'e ayarlanmış ve filtre sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. 0,7 M mannitol ön uygulamasından alınan 15'er adet anter, 1,5 ml ficoll içeren FHG ortamına (Hunter 1988) ait 30×10 mm'lik petri kutulara (Bio Nuclear Diagnostics Inc.Toronto, ON) aktarılmıştır. Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmış ve 21 °C'de karanlıkta bekletilmiştir. 12-14 gün sonra embriyoların daha hızlı gelişebilmesi için 1,5 ml 400 gram/litre ficoll 400 ilave edilmiştir.

0,3 M Mannitol'de bekletilen anterler ise Kasha vd. (2003) tarafından belirlenen protokole göre önceden hazırlanmış ve filtre sterilizasyonu yapılmış sıvı FHG besiyerine alınmıştır. Bu ortama 1 mg/l BAP ilavesi yapılmıştır (Çizelge 3.4). Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmış ve 24 °C'de karanlıkta bekletilmiştir. Yaklaşık 1 ay kadar bu ortamda bekletilen anterlerde gelişim gözlenmiştir.

Daha sonra, saf su içerisinde 21 gün bekletilen başaklardan alınan anterler Szarejko ve Kasha (1991)'e göre hazırlanan BAC3 ortamına aktarılmıştır (Çizelge 3.5). Her 3 farklı ön uygulamadan alınan anterler 24 °C'de karanlıkta kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.4 Kasha vd. (2003)'de belirtilen yöntemle göre kullanılan protokol

Makro elementler	İndüksiyon ortamı (mg/l)	Rejenerasyon ortamı (mg/l)	Köklendirme ortamı (mg/l)
KN ₃	1900	1900	1900
NH ₄ N ₃	165	164	164
MgSO ₄ .H ₂ O	370	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	370	370
KH ₂ P ₄	170	170	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440
Demir kaynağı			
FeNa2EDTA	40	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27,85	20
Na2EDTA	-	37,25	20
Micro tuzlar			
HB ₃	6,2	7,5	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	15,5	40	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	10	8,6
KI	0,87	2,5	0,83
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,25	-	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0, 25	-

Çizelge 3.4 Kasha vd. (2003)'de belirtilen yönteme göre kullanılan protokol (devam)

Vitaminler			
Myo-Inositol	100	100	100
Piridoksin HCl	-	-	0,4
Tiamin HCl	0,4	0,4	0,4
Nicotinic asit	-	0,5	0,4
Ascorbic asit	-	1	0,4
Glutamin	730	800	750
Biotin	-	-	0,4
Karbonhidratlar			
Maltoz	61,000	36,000	-
Sukroz	-	-	20,000
Büyüme düzenleyicileri			
NAA	-	-	-
BAP	1	0,8	-
IAA	-	0,5	1
Kinetin	-	0,5	-
Diğer organik bileşikler			
Casein hidrolizat	-	300	-
Phytigel	-	700	-
Agar	-	3,000	6,000
pH	5,6±0.1	5,9±0.1	5,8±0.1

3.3.8 Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması

Kallus; organize olmamış şekilsiz dokulardan oluşan hücre topluluklarına verilen isimdir. Bitki türlerine göre kallus oluşum süresi değişir (Sahijram ve Bahadur 2015). Arpada genellikle yaklaşık 1 aydan sonra anterlerden kallus gelişimi gözlenmiştir. Anterlerden gelişen kalluslar 1-2 cm çapına ulaştıktan sonra hazırlanan besi ortamı

üzerine aktarılmışlardır. Elde edilen kalluslar 3 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır.

0,7 M Mannitol ön muamelede bekletme sonucunda oluşan kalluslar için rejenerasyon ortamı hazırlanmıştır. Buna göre; 3 gr phytagel tartılmış 500 ml su içeren şişeye eklenerek otoklavlanmıştır. Daha sonra glutamin içermeyen 500 ml'lik FHG stok solüsyonuna (Çizelge 3.3) 30 gr maltoz, 1 mg/l BAP ve 0,5 mg/l IAA eklenerek karıştırılmış ve PH'sı 5,8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyon filtre sterilizasyonu yöntemi ile steril edilmiş ve phytagel ile karıştırılarak 6 cm'lik petrilere dökülmüştür. Sağlıklı görünen kalluslar rejenerasyon ortamına aktarılmış, her genotipten kallus gelişim durumuna göre 2-3 kez kallus eksplantları alt kültüre alınmıştır Kallusların bulunduğu petriler 16 saat ışık fotoperiyodunda ($50 \text{ minimol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) % 50 nemin bulunduğu iklim dolaplarında 25 °C'de tutulmuştur.

Kasha vd. (2003)'e göre hazırlanan protokolde 0,8 mg/l BAP ilavesi yapılarak filtre sterilizasyonu ile besiyeri hazırlığı tamamlanmış (Çizelge 3.4) ve 6 cm'lik petrilere dökülmüştür. Agarla katılaştırılmış ortamın PH'sı 5.9'a ayarlanmıştır. Elde edilen kalluslar Re Medium adı verilen ortama aktarılmış ve 2 hafta kadar bitkicik oluşturma kadar bekletilmiştir.

Çizelge 3.5 Szarejko ve Kasha (1991)'de belirtilen yönteme göre kullanılan protokol

Makro elementler	BAC3 başlangıç ortamı (mg/l)	BAC3 Yenileme Ortamı	BAC3 rejenerasyon ortamı (mg/l)
KN0 ₃	2,600	2,600	2,600
NH ₄ N0 ₃	200	200	200
(NH ₄) ₂ S0 ₄	400	400	400
KH ₂ P0 ₄	170	170	170
NaH ₂ P0 ₄ .H ₂ 0	150	150	150
CaCl ₂ .2H ₂ 0	600	600	600
MgS0 ₄ .7H ₂ 0	300	300	300
Demir kaynağı FeNa2EDTA	40	40	40
Micro tuzlar			
HB0 ₃	5	5	5
MnS0 ₄ .4H ₂ 0	5	5	5
ZnS0 ₄ .7H ₂ 0	2	2	2
KI	0,8	0,8	0,8
Na ₂ Mo0 ₄ .2H ₂ 0	0,25	0,25	0,25
CuS0 ₄ . 5H ₂ 0	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ 0	0,025	0,025	0,025
Diğer inorganik bileşikler			
KHC0 ₃	50	50	50
AgN0 ₃	10	10	10
Vitaminler			
Myo-Inositol	2,000	-	100
Piridoksin HCl	0,5	0,5	0,5
Tiamin HCl	1	1	1
Nicotinic asit	0,5	0,5	0,5
Ascorbic asit	1	1	1

Çizelge 3.5 Szarejko ve Kasha (1991)'de belirtilen yönteme göre kullanılan protokol(devam)

Organik asitler			
Citric asit	10	-	-
Pyruvic asit	10	-	-
Karbonhidratlar			
Maltoz	60,000	30,000	-
Sukroz	-	-	30,000
Büyüme düzenleyicileri			
NAA	2	2	-
BAP	1	1	-
IAA	-	-	0,5
Kinetin	-	-	0,5
Diğer organik bileşikler			
Casein hidrolizat	300	300	300
Ficoll	300	300	-
Gelrite TM	3,2	3,2	3,000
Agar	-	-	7
pH	6,2±0.1	6,2±0.1	6,2±0.1

Szarejko ve Kasha (1991)'e oluşan kalluslar rephlenishment adı verilen yenilenme ortamına aktarılmıştır. 2 mg/ml NAA, 1 mg/ml BAP hormonları ilavesiyle hazırlanan bu ortam 3,2 gr gelrite ile katılaştırılmış (Çizelge 3.5), 24 °C' de 16 saat ışık fotoperiyodunda % 70-80 nem bulunan büyüme odalarında kültüre alınmıştır. Embriyoların gelişmesi ve burdan bitki üretimi 10-18 gün içerisinde olmuştur.

3.3.9 Kalluslardan gelişen bitkiciklerin köklendirme ortamına aktarılması ve vernalizasyona tabi tutulması

Kalluslardan bir kısmı yeşil bitkicik, bir kısmı albino bitkicik oluştururken bazı kalluslar bitkiciğe dönmemiştir. Gelişen yeşil ve albino bitkiciklerin sayısı

kaydedilmiştir. Yeşil bitkicikler, köklendirme amacıyla hazırlanan besiyerlerine alınmıştır. Albino bitkicikler ise sayımları yapıldıktan sonra atılmıştır.

Hunter (1988)'a göre rejenerasyon ortamında gelişen yeşil bitkiler içerisinde 2,15 gr MS, 5 ml Tiamin (stok), 20 gr sukroz, 1 gr casein, 0,1 gr myo-inositol ve 2 ml NAA bulunan ve 3 gr phytigel ile karıştırılarak hazırlanan köklendirme ortamına alınmış ve 24 °C de 16 saat ışık fotoperiyoda ayarlı iklim dolapları içerisinde tutulmuşlardır.

Kasha vd. (2003)'e göre PLL adı verilen köklendirme ortamı; 1 mg/ml NAA içeren besiyeri 6 gr agar ile katılaştırılmış ve PH'sı 5.8'e ayarlanmıştır (Çizelge 3.4). Yeşil bitkicikler PLL ortamına aktarılmış ve kök gelişimini tamamlaması sağlanmıştır.

Szarejko ve Kasha 1991'e göre hazırlanan köklendirme ortamına 0,5 mg/l Kinetin ve 0,5 mg/l IAA ilavesi yapılmıştır. Agar ile katılaştırılan ortamın PH'sı $6,2 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır (Çizelge 3.5). Bu ortama aktarılan bitkicikler 24 °C de 16 saat ışık fotoperiyoda ayarlı iklim dolapları içerisinde tutulmuşlardır.

Vernalizasyon için vejetatif devre; arpada, düşük güneşlenme ve sıcaklık, yüksek nemlilik olan aylarda gerçekleşir. Serin iklim tahılları özellikle arpaya ait bütün çeşitleri kardelenme ve çimlenme sonu arasında, belli düşük sıcaklıkta (1-5 °C) belli süre (5-60 gün), kalıp vernalize olmalılarıdır. Tahıllar gerekli düşük sıcaklığı alamadıkları takdirde generatif gelişme (sapa kalkma) evresine geçemezler (Yürür 1994). Vernalizasyon istegi serin iklim tahıllarının yetistirilebilmesini ve yetistirileceği bölgede kullanılacak çeşidi belirleyen temel faktördür.

Her 3 yöntem için de bitkicikler köklendirme ortamına aktarıldıktan yaklaşık 10 gün sonra magentalar/petriler vernalizasyon ihtiyaçlarını karşılamak üzere +4 °C'de 16 ışık saat fotoperiyoda ayarlı iklim dolaplarında 4-5 hafta kadar tutulmuşlardır.

3.3.10 Kök gelişimini tamamlayan bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması (aklimatizasyon)

Vernalizasyon ihtiyacı ve kök gelişimini tamamlayan bitkicikler dış koşullara alıştırılmak üzere seraya alınmıştır. Bitkicikler öncelikle serada küçük saksılara şaşırtılmış ve nem kaybını önlemek üzere üzerleri poşetlerle kapatılmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne (Yenimahalle/Ankara) ait seralarda; iklim odasından alınan bitkiciklerin dış koşullara alıştırılma aşamaları (Orijinal)

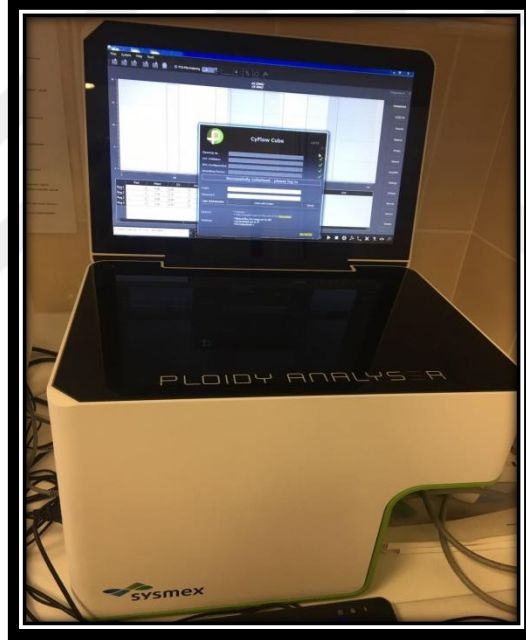
3-4 gün sonra üzerleri açılmış ve köklerin daha rahat gelişebilmesi için büyük saksılara aktarılmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne (Yenimahalle/Ankara) ait seralarda kök gelişimini tamamlayan bitkiciklerin büyük saksılara aktarım aşamaları

3.4 Bitkilerde Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi

Bitkilerdeki ıslah çalışmalarında ve performans değerlendirmelerinde ploidi kavramı hayati öneme sahiptir. Ploidi canlılardaki genom kopyasıdır ve katlarına göre haploid (n), diploid ($2n$), triploid ($3n$), tetraploid ($4n$) ve/veya poliploid ($\approx n$) gibi latince sayılarla adlandırılırlar. (Thompson vd. 1997). Bitkilerde genellikle ploidi düzeyi belirlenmede iki yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilki kromozom sayısının mikroskop yardımıyla belirlenmesi diğeri ise plody analyserin kullanılmasıdır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Biyoteknoloji Araştırma Merkezi laboratuvarında (Yenimahalle/Ankara) kullanılan Ploidy analyser cihazı (orijinal -Sysmex CyFlow Ploidy Analyser).

Bu çalışmada örneklerin ploidi düzeyleri Ploidy analyser cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

Saksılarda 3-4 yapraklı hale gelen bitkilerde ploidi tespiti yapılmıştır. Bunun için genç yapraklardan 1 cm^2 lik örnekler alınarak petri kabının içine konulmuştur. Örnek üzerine 0.4 ml Cystain UV ploidi (Sysmex) solüsyonu konularak jilet ile parçalanmıştır.

Solüsyon 30 µm çapındaki naylon filtreden (Sysmex) geçirilerek üzerine 1.6 ml boyama solüsyonu (DAPI) eklenmiştir. Örneklerin 2 dakika karanlıkta inkübe edilmesinden sonra Ploidi analyzer cihazında (Sysmex) ploidi seviyeleri tespit edilmiştir.

3.4.1 Haploid bitkilerde kromozom katlaması

Haplidi tekniğinin temelini kromozom katlanması ve % 100 homozigot saf hatların geliştirilmesi oluşturmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2000). Kromozom katlamada en yaygın olarak kullanılan kimyasal kolkisinidir. Kolkisin, kromozom katlaması için çalışmalarda kullanılan en yaygın kimyasal maddedir. Bu madde güz çiğdeminin (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; renksiz, alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen; sıcak suda ve eterde suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kolkisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Köksal 1999). Anter kültürü tekniği kullanılarak elde edilen arpa bitkilerinde spontan kromozom katlanma değeri çok yüksek (% 87) dir. Kromozom katlanmasını sağlamak adına herhangi bir kimyasal uygulamasına gerek yoktur.(Jahne, ve Lörz 1995).

Tohum tutan bitkilerin oranına göre % diploidleşme oranını bulmak için, tohum bağlayan bitkilerin toplam bitki sayısı içindeki oranı bulunmuştur.

$$\% \text{ Diploidleşme Oranı} = \frac{\text{Tohum bağlayan bitki sayısı}}{\text{Toplam bitki sayısı}} \times 100$$

formülü ile belirlenmiştir.

3.5 Sitolojik İnceleme Yöntemleri

3.5.1 Kromozom sayımları

Kök uçlarının elde edilmesi: Çeşitler ve melez kombinasyonlardan elde edilen tohumlar 24 ± 1 °C’de çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumların kökleri, 1 cm uzunluğa geldiğinde kök uçlarından örnekleri alınmıştır.

3.5.2 İlk işlem (Prefiksasyon)

Elde edilen kök uçlarına uygulanan ilk işlem olarak bilinen prefiksasyonun amacı kromozomları incelenebilecek düzeyde tutmaktır.

Bu işlem iğ ipliklerinin oluşumunu durdurmuş, kromozomların güvenilir bir şekilde sayılması sağlanmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak α -monobromonaftalin çözeltisi kullanılmıştır. İstenilen uzunluğa gelen kök uçları α -monobromonaftalin çözeltisinde 4 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra fiksasyon, hidroliz ve boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

İkinci ön işlem olarak buzlu suda bekletme yöntemi denenmiştir. Soğuk su tahıllarda hücre bölünme esnasında metafaz safhasının belirgin hale getirilmesini ve böylece kromozomların metafaz aşamasında görülmesinde kolaylık sağlamaktadır (Akçelik vd. 2012). Bu amaçla tez kapsamındaki arpa türlerinin kök uçları içi buzla kaplı ependorf tüplere konulmuştur. Daha sonra, ependorf tüpleri başka buzlu bir kaba yerleştirerek $+4$ °C’de 1 gün bekletilmiştir.

3.5.3 Fiksasyon

Fiksasyonun amacı; protoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri yok ederek mikroskopik kesit hazırlanıncaya kadar karşılaşılabilecek reaktiflere karşı dirençli kılmaktır.

Tespit sıvısının, hücreler üzerinde hızlı bir sertleştirme etkisinin olması ve bunun yanı sıra sıvının dokulara mümkün olduğunca hızlı girmesini sağlamak amacıyla bu işlem yapılmıştır. Bu amaçla materyaller α -monobromonaftalin çözeltisi ve soğuk sudan çıkartılmıştır. Buradan alındıktan sonra mitozun fiksasyonu için kökler 3 kısım etil alkol (absölü alkol C_2H_5-OH):1 kısım glacial asetik asit (CH_3-COOH) çözeltisinde 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Asetik asit/alkol çözeltisi istenilen fazları yakalamak için kullanılmıştır.

3.5.4 Hidroliz

Hidroliz için zaman, sıcaklık derecesi, hidrolizde kullanılan HCl'in konsantrasyonu önemlidir. Dokuların hücrelerini birbirinden ayrılması ve daha iyi gözlenebilmesi için Feulgen ile boyanmadan önce hidroliz işlemleri yapılmıştır. 1 N HCl içerisine konulan kök uçlarının yumuşaması için 60 °C'deki su banyosu içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kök uçları saf su ile 5 dk yıkanmıştır.

3.5.5 Kök uçlarının boyanması

Hidroliz aşamasından sonra kök uçları, hazırlanan feülgen boyası ile karanlıkta 2 saat oda sıcaklığında bekletilerek boyanmıştır. Boyanmış kök ucu örneklerinden preparatlar hazırlanarak aseto-karmin boya ile mitotik metafaz döneminde mikroskopta inceleme yapılmıştır.

Feulgen boyasının hazırlanması;

1. 1 gr fuksin bazic tartılmış, havanda ezilmiştir.
2. Tartılan fuksin bazik 500 ml'lik erlenmayere konulmuştur.
3. Başka bir erlenmayerde 200 ml damıtık su hazırlanıp karıştırarak boyaya eklenmiş ve kaynatılmıştır.
4. 50 °C'ye kadar soğuması için manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır.
5. Karışıma 20 ml 1 N HCl ilave edilmiş,

6. Filtre kağıdı (Whatmann No:1) ile süzölmüştür.
7. Daha sonra 2 gr $K_2S_2O_4$ (Potasyum metabisülfıt) eklenerek karıştırılmış,
8. 1 gece karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiş,
9. Etrafı alüminyum folyo ile sarılı cam bir şişe ile buzdolabına kaldırılmıştır.

Aseto-karmin boyasının hazırlanması;

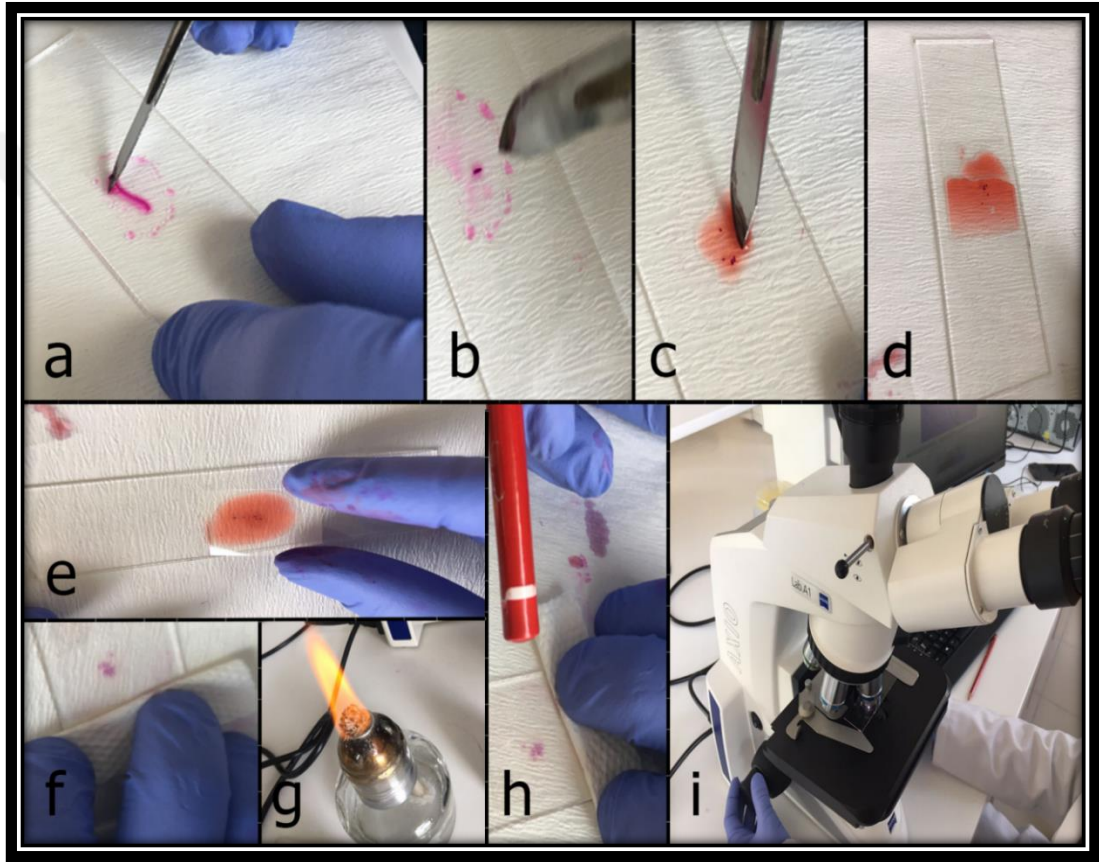
1. % 45'lik 45 ml asetik asit, bir kapta bulunan 55 ml distile su içine konmuş,
2. Başka bir kapta kaynayan sıcak su içine bu kap yerleştirilmiş ve 10 dakika kaynatılmıştır.
3. Isınan %45'lik asetik asit içine, tartılan 1 g karmin boya yavaş yavaş ve karıştırılarak eklenmiş,
4. Boya eklenen solüsyon 10 dakiea karıştırılarak ısıtılmıştır.
5. Daha sonra hızlı bir şekilde soğutmak için, içine balık konmuş olan solüsyon kabı, soğuk su dolu bir kaba yerleştirilmiş ve oda sıcaklığına gelinceye kadar karıştırılmıştır.
6. Filtre edilip koyu renkli 100 ml'lik kapaklı kaba konarak buzdolabında saklanmıştır.

3.5.6 Preparatların hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi

Preperat hazırlık aşaması;

1. Buzdolabında feulgen boya içerisinde çalışılacak miktardaki kök ucu pens yardımıyla alınmış ve içerisinde saf su bulunan petriye konulmuştur.
2. Kök ucu su içerisinde yaklaşık 10 dakika bekletildikten sonra pens yardımıyla filtre kâğıdı üzerine alınmış, suyun uzaklaştırılması sağlanmış ve lama aktarılmıştır.
3. Mikropipet yardımıyla 20 µl aseto-karmin çekilerek örneğin üzerine bırakılmıştır.
4. Pipetaj yapılarak örneğin boyayı absorbe etmesi sağlanmıştır.
5. Daha sonra örneğin uç kısmındaki daha koyu boyanmış kısa bölge (kök ucu) bistüri yardımıyla kesilmiş ve diğer kısım uzaklaştırılmıştır.
6. Ardından bistüri yardımıyla kök ucu ufak parçalara ayrılmıştır.

7. 45 °'lik açı ile lamel, lamın üzerine kapatılmış ve hava kabarcığı önlenmiştir.
8. Üzerine filtre kâğıdı ile sıkıca bastırılarak, mikroskopta gözlenmesi istenmeyen 3 boyutlu görüntü giderilmiş ve hücrelerin parçalanıp, kromozomların birbirinden ayrılması için kurşun kalemin tersiyle örneklerin (filtre kağıdının üzerinden) üzerine vurularak preparat ezilmiştir.
9. Hazırlanan preparat mikroskopta öncelikle 10x'lik küçük büyütmede daha sonra sırasıyla, 20x, 40x'lik büyültmelerde incelenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Double haploid bitkilerin kök uçlarında kromozom icelemesi

a. feulgen boyası ile muamele edilmiş 1 cm boyutundaki kök ucu, b. incelenmek üzere kök ucunun keskin bisturi yardımıyla kesilmesi, c. kesilen kök ucunun asetokarmin boyasıyla muamele edilmesi ve parçalanması, d, e. mikroskopta incelemek üzere lamın üzerine lamel kapatılması ve f. fazla boyanın temizlenmesi, g. kök ucu hücrelerinin yumuşaması için kısa süre (5-10 saniye) ateş üzerine tutulması, h. kalem ile yavaş yavaş vurarak hücrelerin ezilmesi, i. mikroskopta kromozomların gözlemlenmesi (Orişinal)

3.6 Çeşitler ve Melezlerinin Bazı Morfolojik zellikleri

Tarm-92, Bülbül-89, Aydanhanım, Zeynelağa, Akar eşitleri ve *Hordeumspontaneum* türü ile bunların resiprokal melezlerinden elde edilen bitkilerde; bitki boyu, başak boyu ve bayrak yaprak boyu incelenmiştir. Bu morfolojik özellikler; 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık, 24 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 16 saat ışık fotoperiyodunda, % 70-80 nem bulunan sera koşularında llmştir.

3.6.1 Bitki boyu (cm)

Her saksıda, anter kültürü aşamasına ulaşmış her türden 10 bitkide, Toprak yüzeyinden basağın en st noktasına (kılçık hariç) kadar olan uzunluk esas alınarak cm olarak ölçülüp ortalama yükseklik hesaplanmıştır.

3.6.2 Başak boyu (cm)

Her saksıda, anter kültürü aşamasına ulaşmış her türden 10 bitkide, başak boyu cm olarak ölçülüp ortalama değerler hesaplanmıştır.

3.6.3 Bayrak yaprak boyu (cm)

Her saksıda, anter kültürü aşamasına ulaşmış her türden 10 bitkide, bayrak yaprak boyu cm olarak ölçülüp ortalama değerler hesaplanmıştır.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm parametrelerle ilgili istatistiksel değerlendirmeler SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ortalama değerler ile varyans analizi yapılmış, farklılıkların önem düzeyi F testine göre belirlenmiştir. Ortalamaların farklılık gruplandırılması için Duncan testi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi, araştırmada; 5 çeşit, 1 yabancı tür ve 30 melez kombinasyonunun anter kültürüne tepkileri incelenmiştir.

Çeşitler, yabancı tür ve bunlardan elde edilen resiprokal melezlerine ait bazı morfolojik özellikler sera koşullarında ölçülmüştür. Buna göre bitki boyu, başak boyu ve bayrak yaprak boyu cm cinsinden hesaplanarak ortalamaları alınmıştır.

4.1 Tarm-92 Çeşidi ve Melezlerine ait Bazı Morfolojik Özellikler

Tarm-92 çeşidinin boyu $91,0 \pm 0,6$ iken melezlerin boyları $70,0 \pm 0,4$ - $87,0 \pm 0,9$ arasında değişmiştir. En uzun bitki boyu Tarm-92 çeşidine aittir (Çizelge 4.1). Tarm-92 çeşidinin başak boyu $8,5 \pm 0,8$ iken melezlerin başak boyları $6,0 \pm 0,4$ - $8,5 \pm 0,9$ arasında değişmiştir. Tarm-92 $\times$ Zeynelağa melezi, Tarm-92 çeşidiyle aynı başak boyuna sahip olup, diğer melezler daha kısa kalmıştır. Tarm-92 çeşidinin bayrak yaprak boyu $22,5 \pm 0,7$ iken melezlerin boyları $16,0 \pm 0,1$ - $21,5 \pm 0,9$ arasında değişmiştir. Tarm-92 $\times$ Bülbül-89 ve Tarm-92 $\times$ Akar melezleri $21,5 \pm 0,3$ bayrak yaprak boyuna sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1 Tarm-92 çeşidi ve melezlerin bitki boyu (cm), başak boyu (cm) ve bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri

Genotip	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
Tarm-92	$91,0 \pm 0,6$	$8,5 \pm 0,8$	$22,5 \pm 0,7$
Tarm-92 $\times$ Bülbül-89	$80,0 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,9$	$21,5 \pm 0,3$
Tarm-92 $\times$ Aydanhanım	$70,0 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,9$	$17,5 \pm 0,7$
Tarm-92 $\times$ Zeynelağa	$87,0 \pm 0,9$	$8,5 \pm 0,9$	$19,5 \pm 0,2$
Tarm-92 $\times$ Akar	$86,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$21,5 \pm 0,9$
Tarm-92 $\times$ <i>H. spontaneum</i>	$76,0 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,4$	$16,0 \pm 0,1$

$\pm$ Standart hata

4.1.1 Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları çizelge 4.2’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler ve muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık görülmüştür.

Bu sonuçlara bakıldığında; kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından Genotipler × Muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli etkileşim olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı ön muamele uygulamalarının Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	256,56	41,98**	1030,86	58,55**	15,90	26,01**
Muameleler	2	452,66	74,07**	6577,97	373,66**	96,50	157,90**
Genotipler× Muameleler	10	57,86	9,46**	756,70	42,98**	5,30	8,67**
Hata	36	6,11		17,60		0,61	
Düzeltilmiş toplam	53						

**p<0.01

Kallus oluşum oranı (%): Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu (% 7) Tarm-92 × Akar ve Tarm-92 × Bülbül-89 (% 3) melezlerinde izlenmiştir

(Çizelge 4.3). Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* melezinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizde; 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre en fazla kallus oluşumu (% 15) Tarm-92 $\times$ Bülbül-89 ve en az kallus oluşumu Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* (% 4) melezlerinde izlenmiştir (Şekil 4.1).

Karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre % 15 kallus oranı ile en fazla kallus Tarm-92 $\times$ Bülbül-89 melezinde elde edilebilmiş, en az kallus oranı ise % 2 ile Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* melezinde izlenmiştir.

Tarm-92 çeşidinde her üç muamele arasında kıyaslama yapılırsa kallus oluşum oranı % 5 - % 30 arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Sürgün oluşum oranı (%): Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az sürgün oluşumu (% 33,30) Tarm-92 $\times$ Zeynelağa ve Tarm-92 $\times$ Akar (% 14,28) izlenmiştir (Çizelge 4.3). Tarm-92 $\times$ Aydanhanım ve Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre en fazla sürgün oluşumu (% 75) Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* melezinde en az Tarm-92 $\times$ Aydanhanım (% 41,40) melezinde izlenmiştir.

Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla ve en az sürgün oluşumu (% 46,44) Tarm-92 $\times$ Bülbül-89 ve Tarm-92 $\times$ Aydanhanım (% 16,60) izlenmiştir. Tarm-92 $\times$ *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

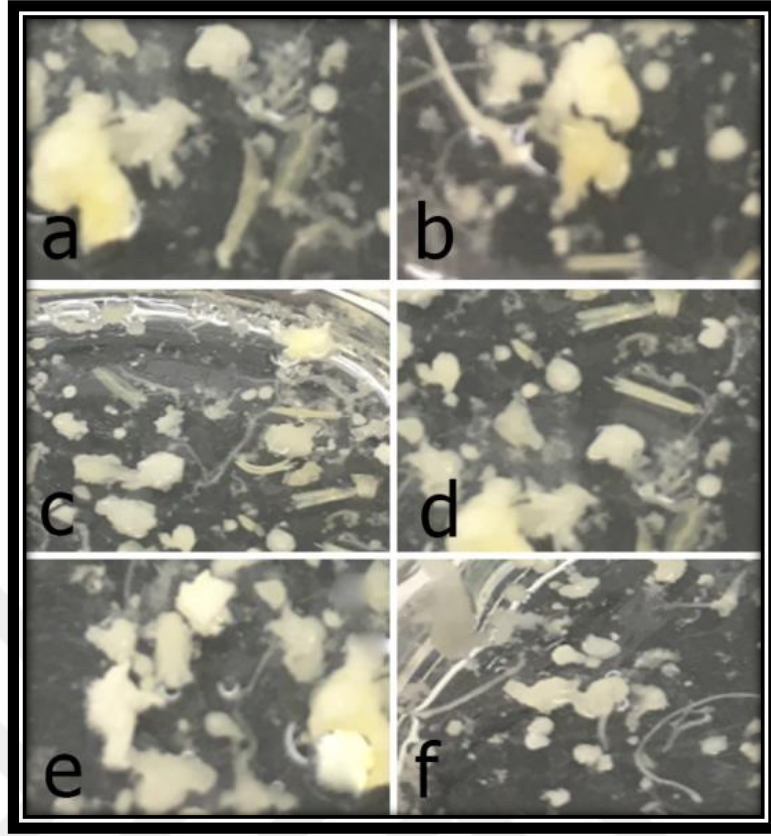
Tarm-92 çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa sürgün oluşum oranı % 25 - % 40 arasında değişerek, en yüksek değere 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre kök oluşumu Tarm-92 × Bülbül, Tarm-92 × Akar melezlerinde 1'er adet olarak izlenmiştir (Çizelge 4.3). Tarm-92 × Aydanhanım, Tarm-92 × Zeynelağa ve Tarm-92 × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (8 adet) Tarm-92 × Bülbül ve Tarm-92 × *H. spontaneum* (1 adet) melezlerinde izlenmiştir.

Tarm-92 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C'de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (2 adet) Tarm-92 × Bülbül-89, Tarm-92 × Akar ve Tarm-92 × Zeynelağa (1 adet) izlenmiştir. Tarm-92 × Aydanhanım ve Tarm-92 × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Tarm-92 çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kök oluşumu 1 ile 8 adet arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Şekil 4.1 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 25 gün sonra a. Tarm-92 çeşidi, b. Tarm-92 × Bülül-89 c. Tarm-92 × Aydanhanım d. Tarm-92 × Zeynelağa e. Tarm-92 × Akar f. Tarm-92 × *H. spontaneum* genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Çizelge 4.3 Farklı ön muamele uygulamalarının Tarm-92 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)**			Sürgün oluşum oranı (%)**			Köklenen bitki sayısı (adet)**		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
Tarm-92	5.00c	30.00a	20.00a	40.00a	33.33e	25.00c	2.00a	8.00a	1.00b
Tarm-92 × Bülbül-89	3.00e	15.00b	15.00b	33.11b	66.40b	46.44a	1.00b	8.00a	2.00a
Tarm-92 × Aydanhanım	4.00d	12.00d	6.00d	0.00d	41.40d	16.60d	0.00c	4.00b	0.00c
Tarm-92 × Zeynelağa	6.00b	14.00c	8.00c	33.30b	66.60b	25.00	0.00c	4.00b	1.00b
Tarm-92 × Akar	7.00a	10.00e	8.00c	14.28c	50.00c	37.33b	1.00a	4.00b	2.00a
Tarm-92 × <i>H. spontaneum</i>	0.00f	4.00f	2.00e	0.00d	75.00a	0.00e	0.00c	1.00c	0.00c

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2 Bülbül-89  eşidi ve Melezlerine ait Bazı Morfolojik  zellikler

Bülbül-89  eşidinin boyu $72,0 \pm 0,1$ iken melezlerin boyları $70,0 \pm 0,5$ - $85,0 \pm 0,6$ arasında değişmiştir ( izelge 4.4). Bülbül-89  eşidinin başak boyu $9,0 \pm 0,1$ iken melezlerin boyları $6,5 \pm 0,1$ - $8,0 \pm 0,8$ arasında değişmiştir. Bülbül-89  eşidinin bayrak yaprak boyu $23,0 \pm 0,6$ iken melezlerin boyları $18,0 \pm 0,4$ - $23,5 \pm 0,9$ arasında değişmiştir. Bülbül-89 $\times$ Zeynelağa melezinin bayrak yaprak boyu ($23,5 \pm 0,8$), Bülbül-89 ($23,0 \pm 0,6$)  eşidine göre daha uzundur.

Çizelge 4.4 Bülbül-89  eşidi ve melezlerin bitki boyu (cm), başak boyu (cm) ve bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik  zellikleri

Genotip	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
Bülbül-89	$72,0 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,1$	$23,0 \pm 0,6$
Bülbül-89 $\times$ Tarm-92	$84,0 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$22,0 \pm 0,7$
Bülbül-89 $\times$ Aydanhanım	$83,0 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,7$	$20,0 \pm 0,8$
Bülbül-89 $\times$ Zeynelağa	$70,0 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,3$	$23,5 \pm 0,8$
Bülbül-89 $\times$ Akar	$70,0 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,7$	$18,0 \pm 0,4$
Bülbül-89 $\times$ <i>H. Spontaneum</i>	$85,0 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,8$	$21,0 \pm 0,9$

$\pm$ Standart hata

4.2.1 Bülbül-89  eşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

Bülbül-89  eşidi ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları  izelge 4.5’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler, muameleler ve genotipler $\times$ muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık g r lm şt r.

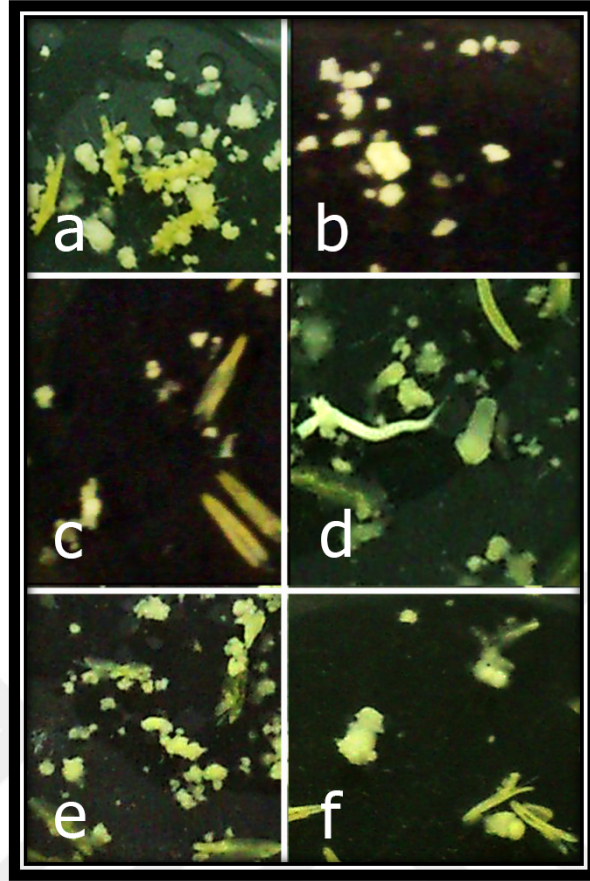
Çizelge 4.5 Farklı ön muamele uygulamalarının Bülbül-89 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	103,10	45,26**	1304,92	20,42**	3,36	9,09**
Muameleler	2	146,00	64,09**	10520,37	164,62**	7,72	20,85**
Genotipler × Muameleler	10	18,40	8,07**	720,91	11,28**	3,72	10,05**
Hata	36	2,27		63,90		0,37	
Düzeltilmiş toplam	53						

**p<0.01

Kallus oluşum oranı(%): Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu (% 2) Bülbül-89 × Tarm-92 ve Bülbül-89 × Zeynelağa (% 1) izlenmiştir (Çizelge 4.6). Bülbül-89 × Aydanhanım, Bülbül-89 × Akar ve Bülbül-89 × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla kallus oluşumu (% 8) Bülbül-89 × Tarm-92 ve Bülbül-89 × Akar melezlerinde gözlenirken; en az kallus oluşumu Bülbül-89 × *H. spontaneum*(% 2) izlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 1 ay sonunda a. Bülbul-89 b. Bülbul-89 × Tarm-92 c. Bülbul-89 × Aydanhanım d. Bülbul-89 × Zeynelağa e. Bülbul-89 × Akar f. Bülbul-89 × *H. spontaneum* genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Bülbul-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla kallus oluşumu (% 12) Bülbul-89 × Tarm-92, Bülbul-89 × Aydanhanım melezlerinde, en az kallus oluşumu ise Bülbul-89 × Akar (% 1) melezinde görülmüştür. Bülbul-89 × *H. spontaneum* melezinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Bülbul-89 çeşidinde her üç muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kallus oluşum oranı % 4 - % 11 arasında değişerek, en yüksek değer 0,7 M mannitolde bekletme ön muamalesi sonucu elde edilmiştir.

Sürgün oluşum oranı (%): Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre hiç sürgün elde edilmemiştir(Çizelge 4.6).

0,7 M Mannitol ön uygulamasına göre en yüksek değer (% 80) Bülbül-89 × Zeynelağa melezinde iken en az sürgün oluşum oranına Bülbül-89 × Tarm-92 ve Bülbül-89 × Aydanhanım (% 25) melezlerinde rastlanmıştır.

Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla sürgün oluşumu (% 50) Bülbül-89 × Zeynelağa ve en az sürgün oluşumu Bülbül-89 × Tarm-92 (% 19,33) izlenmiştir. Bülbül-89 × Aydanhanım, Bülbül-89 × Akar ve Bülbül-89 × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Bülbül-89 çeşidinde her üç muameleler arasında kıyaslama yapılırsa sürgün oluşum oranı % 0 - % 35,7 arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucunda köklenmiş bitki eldesi gerçekleşmemiştir (Çizelge 4.6).

Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla kök oluşumu (4 adet) Bülbül-89 × Tarm-92 ve en az kök oluşumu Bülbül-89 × Aydanhanım (1 adet) izlenmiştir (Çizelge 4.5). Bülbül-89 × Akar ve Bülbül-89 × *H. Spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu görülmemiştir.

Bülbül-89 çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla kök oluşumu (3 adet) Bülbül-89 × Akar ve en az kök oluşumu Bülbül-89 × Tarm-92 ve Bülbül-89 × Zeynelağa (1 adet)

izlenmiştir. Bülbül-89 $\times$ Aydanhanım ve Bülbül-89 $\times$ *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Bülbül-89  e idinde her üç muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kök oluşumu 0 ile 0,67 adet arasında de i erek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol  n uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Çizelge 4.6 Farklı ön muamele uygulamalarının Bülbül-89 çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)**			Sürgün oluşum oranı (%)**			Köklenen bitki sayısı (adet)**		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
Bülbül-89	4.00a	11.00a	10.00c	0.00	35.70c	20.00b	0.00	0.67c	0.33c
Bülbül-89 × Tarm-92	2.00b	8.00b	12.00a	0.00	25.00e	19.33b	0.00	4.00a	1.00b
Bülbül-89 × Aydanhanım	0.00d	4.00d	12.00a	0.00	25.00e	0.00c	0.00	1.00c	0.00
Bülbül-89 × Zeynelağa	1.00c	5.00c	2.00d	0.00	80.00a	50.00a	0.00	2.00b	1.00b
Bülbül-89 × Akar	0.00e	8.00b	1.00e	0.00	68.00b	0.00c	0.00	0.00d	3.00a
Bülbül-89 × <i>H. spontaneum</i>	0.00e	2.00e	0.00f	0.00	50.00c	0.00c	0.00	0.00d	0.00c

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir

4.3 Aydanhanım Çeşidi ve Melezlerine ait Bazı Morfolojik Özellikler

Aydanhanım çeşidinin bitki boyu $98,0\pm0,8$ iken melezlerin boyları $76,0\pm0,4$ - $85,0\pm0,9$ arasında değişmiştir. 3 adet melezde bitki boylarında Aydanhanım çeşidine göre kısılma görülmüştür (Çizelge 4.7). Aydanhanım çeşidinin başak boyu $8,5\pm0,9$ iken melezlerin başak boyları $6,5\pm0,5$ - $9,2\pm0,5$ arasında değişmiştir. Aydanhanım $\times$ Tarm-92 melezinin başak boyu, Aydanhanım çeşidine göre daha uzun olmuşken diğer melezler daha kısa kalmıştır. Aydanhanım çeşidinin bayrak yaprak boyu $22,0\pm0,7$ iken melezlerin bayrak yaprak boyları $15,0\pm0,1$ - $20,0\pm0,1$ arasında değişmiş olmakla birlikte en uzun bayrak yaprak boyuna da Aydanhanım çeşidi sahiptir.

Çizelge 4.7 Aydanhanım çeşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri

Genotip	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
Aydanhanım	$98,0\pm0,8$	$8,5\pm0,9$	$22,0\pm0,7$
Aydanhanım $\times$ Tarm-92	$80,0\pm0,5$	$9,2\pm0,5$	$19,0\pm0,7$
Aydanhanım $\times$ Bülbül-89	$76,0\pm0,4$	$7,2\pm0,4$	$20,0\pm0,1$
Aydanhanım $\times$ Zeynelağa	$85,0\pm0,9$	$6,5\pm0,5$	$19,5\pm0,5$
Aydanhanım $\times$ Akar	$84,0\pm0,6$	$7,0\pm0,8$	$15,0\pm0,6$
Aydanhanım $\times$ <i>H. spontaneum</i>	$80,0\pm0,5$	$7,2\pm0,6$	$15,5\pm0,7$

$\pm$ Standart hata

4.3.1 Aydanhanım çeşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları çizelge 4.8’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler, muameleler ve genotipler $\times$ muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık görülmüştür.

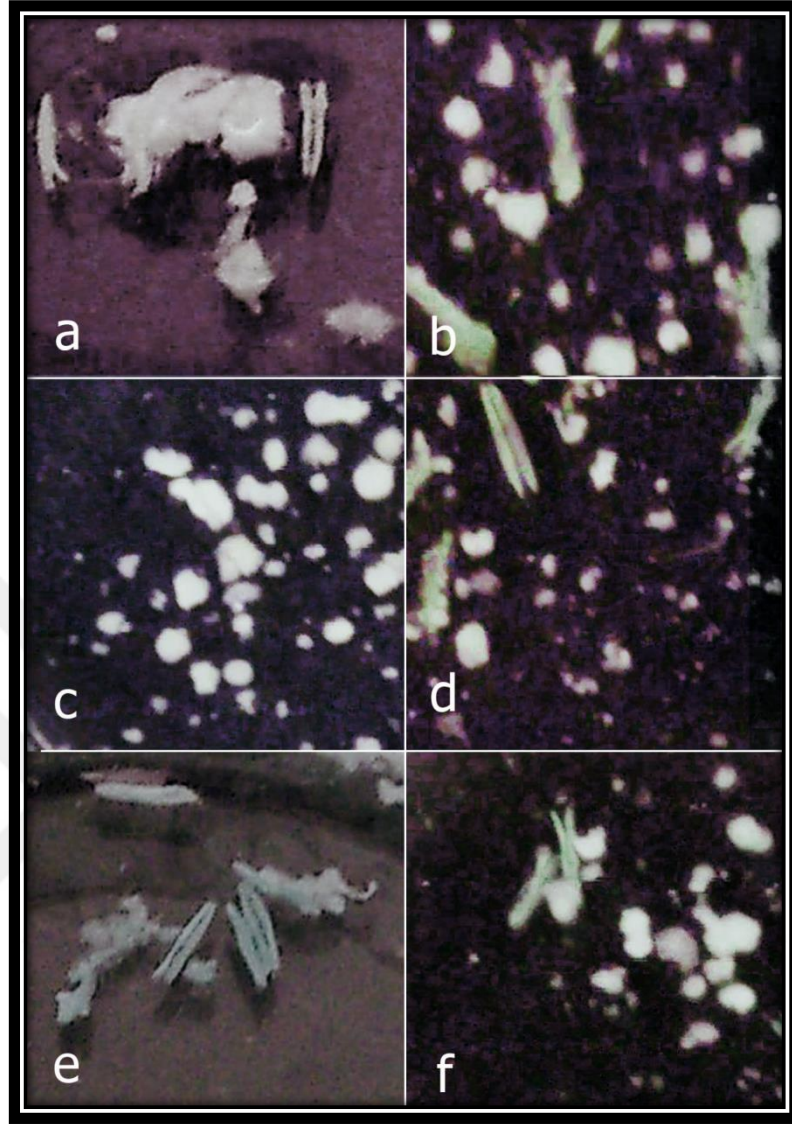
Çizelge 4.8 Farklı ön muamele uygulamalarının Aydanhanım çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	96,267	52,509**	286,519	13,454**	13,867	12,480**
Muameleler	2	130,667	71,273**	712,463	33,455**	28,667	25,800**
Genotipler × Muameleler	10	29,867	16,291**	179,374	8,423**	5,067	4,560**
Hata	36	1,833		21,296		1,111	
Düzeltilmiş Toplam	53						

** $p < 0.01$

Kallus oluşum oranı(%): Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu (%6) Aydanhanım × Akar ve Aydanhanım × Tarm-92 (% 1) izlenmiştir (Çizelge 4.9). Aydanhanım × *H. spontaneum* melezinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla kallus oluşumu (% 18) Aydanhanım × Bülbül-89 ve Aydanhanım × *H. spontaneum* (% 3) melezinde gözlenmiştir (Şekil 4.3).



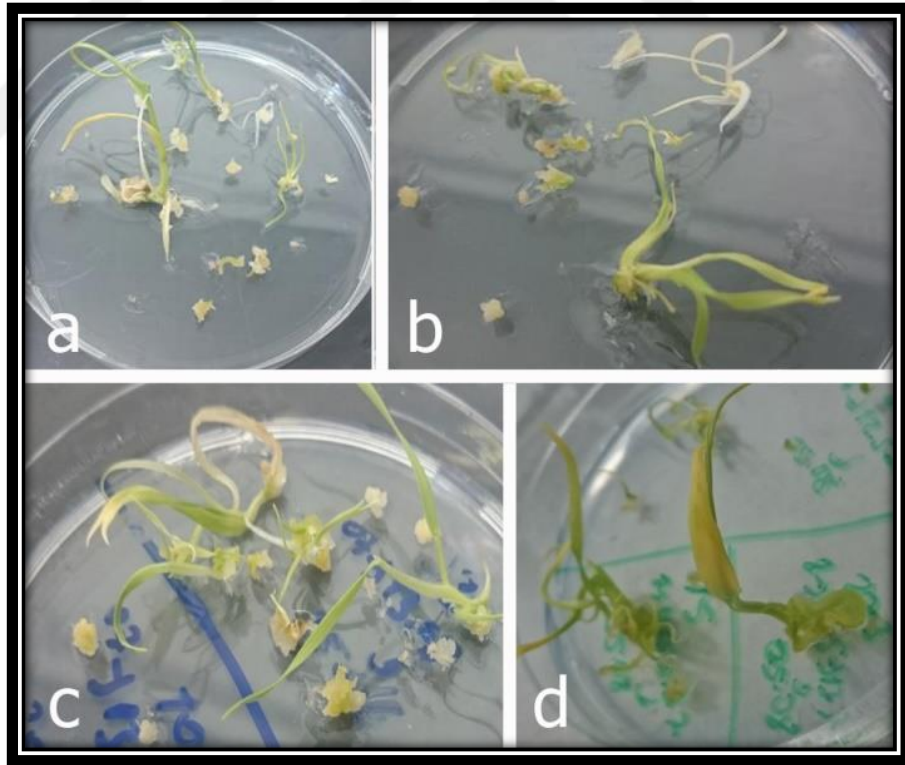
Şekil 4.3 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 28 gün sonra (a) Aydanhanım (b) Aydanhanım × Tarm-92 (c) Aydanhanım × Bülbül-89 (d) Aydanhanım × Zeynelağa (e) Aydanhanım × Akar (f) Aydanhanım × *H.spontaneum* genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu (% 12) Aydanhanım × Bülbül-89 ve Aydanhanım × *H. spontaneum* (% 1) melezinde görülmüştür.

Aydanhanım çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kallus oluşum oranı % 2 - % 4 arasında değişerek, en yüksek değerler 0,7 M Mannitol ön uygulaması ve +4 °C’de karanlıkta bekletme ön muamalesi sonucu elde edilmiştir.

Sürgün oluşum oranı (%): Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre (% 16,67) Aydanhanım × Bülbül-89 melezinden en fazla sürgün elde edilirken, Aydanhanım × Akar (% 1,33) melezinden en az sürgün oluşumu görülmüştür (Çizelge 4.9). Aydan H. × *spontaneum* melezinden ise hiç sürgün elde edilememiştir.

0,7 M Mannitol ön uygulamasına göre en yüksek değer (%33) Aydan H. × *spontaneum* melezinde iken en az sürgün oranına Aydanhanım × Akar (%4) melezinde rastlanmıştır (Şekil 4. 3).



Şekil 4.4 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden a. Aydanhanım b. Aydanhanım × Tarm-92 c. Aydanhanım ×Bülbül-89 d. Aydanhanım × Zeynelağa genotiplerinde elde edilen sürgün görüntüleri

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre Aydanhanım × Tarm-92 ve Aydanhanım × Bülbül-89 (% 16,67) melezleri en yüksek sürgün oranına sahipken Aydanhanım × Akar (%2) melezi en az sürgün vermiştir. Aydan H. × *spontaneum* melezinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Aydanhanım çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa sürgün oluşum oranı üç muamale için de (% 16,67) aynı sonucu vermiştir.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucunda köklenmiş bitki eldesi (% 1) Aydanhanım × Bülbül-89 ve Aydanhanım × Zeynelağa melezlerinde aynı şekilde gerçekleşmiştir. Aydanhanım × Tarm-92, Aydanhanım × Akar ve Aydanhanım × *H. spontaneum* melezlerinde ise kök eldesi gerçekleşmemiştir (Çizelge 4.9).

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (8 adet) Aydanhanım × Bülbül-89 ve Aydanhanım × Akar ve Aydan H. × *spontaneum* (1 adet)’da izlenmiştir.

Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (2 adet) Aydanhanım × Bülbül-89 ve Aydanhanım × Tarm-92 (1 adet) izlenmiştir. Aydanhanım × Zeynelağa, Aydanhanım × Akar ve Aydan H. × *spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir

Aydanhanım çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kök oluşumu 0 ile 2 adet arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Çizelge 4.9 Farklı ön muamele uygulamalarının Aydanhanım çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)			Sürgün oluşum oranı (%)			Köklenen bitki sayısı (adet)		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
Aydanhanım	2.00c	4.00e	4.00c	16.67a	16.67c	16.67a	0.00b	2.00b	1.00b
Aydanhanım × Tarm-92	1.00d	6.00c	2.00d	0.00d	22.00b	16.67a	0.00b	2.00b	1.00b
Aydanhanım × Bülbül-89	2.00c	18.00a	12.00a	16.67a	22.00b	16.67a	1.00a	8.00a	2.00a
Aydanhanım × Zeynelağa	3.00b	10.00b	5.00b	7.67b	16.67c	6.67b	1.00a	2.00b	0.00c
Aydanhanım × Akar	6.00a	5.00d	2.00d	1.33c	4.00d	2.00c	0.00b	1.00c	0.00c
Aydanhanım × <i>H. spontaneum</i>	0.00e	3.00f	1.00e	0.00d	33.00a	0.00d	0.00b	1.00c	0.00c

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir

4.4 Zeynelağa Çeşidi ve Melezlerine aAit Bazı Morfolojik Özellikler

Zeynelağa çeşidinin boyu $85,0\pm0,5$ iken melezlerin boyları $70,0\pm0,4$ - $77,0\pm0,5$ arasında değişmiştir. Bütün melezlerde Zeynelağa çeşidine göre bitki boyu bakımından kısalma görülmektedir (Çizelge 4.10). Zeynelağa çeşidinin başak boyu $6,5\pm0,2$ iken melezlerin boyları $6,5\pm0,7$ - $7,5\pm0,8$ arasında değişmiştir. Zeynelağa $\times$ Akar melezi, Zeynelağa çeşidiyle aynı boyda olup diğer melezlerin başak boyları daha uzun olmuştur. Zeynelağa çeşidinin bayrak yaprak boyu $16,0\pm0,7$ iken melezlerin boyları $16,0\pm0,2$ - $22,0\pm0,6$ arasında değişmiştir. Zeynelağa $\times$ Tarm-92 melezi, Zeynelağa çeşidi ile aynı bayrak yaprak boyuna sahiptir. Zeynelağa $\times$ Aydanhanım melezi ise en uzun bayrak yaprak boyuna sahiptir.

Çizelge 4.10 Zeynelağa çeşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri

Genotip	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
Zeynelağa	$85,0\pm0,5$	$6,5\pm0,2$	$16,0\pm0,7$
Zeynelağa $\times$ Tarm-92	$76,0\pm0,4$	$7,0\pm0,6$	$16,0\pm0,2$
Zeynelağa $\times$ Bülbül-89	$75,0\pm0,8$	$7,2\pm0,9$	$17,0\pm0,9$
Zeynelağa $\times$ Aydanhanım	$77,0\pm0,5$	$7,5\pm0,8$	$22,0\pm0,6$
Zeynelağa $\times$ Akar	$74,0\pm0,8$	$6,5\pm0,7$	$18,0\pm0,8$
Zeynelağa $\times$ <i>H. spontaneum</i>	$70,0\pm0,4$	$7,0\pm0,5$	$21,0\pm0,9$

$\pm$ Standart hata

4.4.1 Zeynelağa çeşidi ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları çizelge 4.11’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler, muameleler ve Genotipler $\times$ Muameleler interaksyonu arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık görülmüştür.

Çizelge 4.11 Farklı ön muamele uygulamalarının Zeynelağa çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	48,700	16,233**	3435,278	22,174**	11,100	24,975*
Muameleler	2	190,500	63,500**	1908,222	12,317**	39,500	88,875*
Genotipler × Muameleler	10	22,300	7,433**	1231,133	7,947**	8,300	18,675*
Hata	36	3,000		154,926		0,444	
Düzeltilmiş toplam	53						

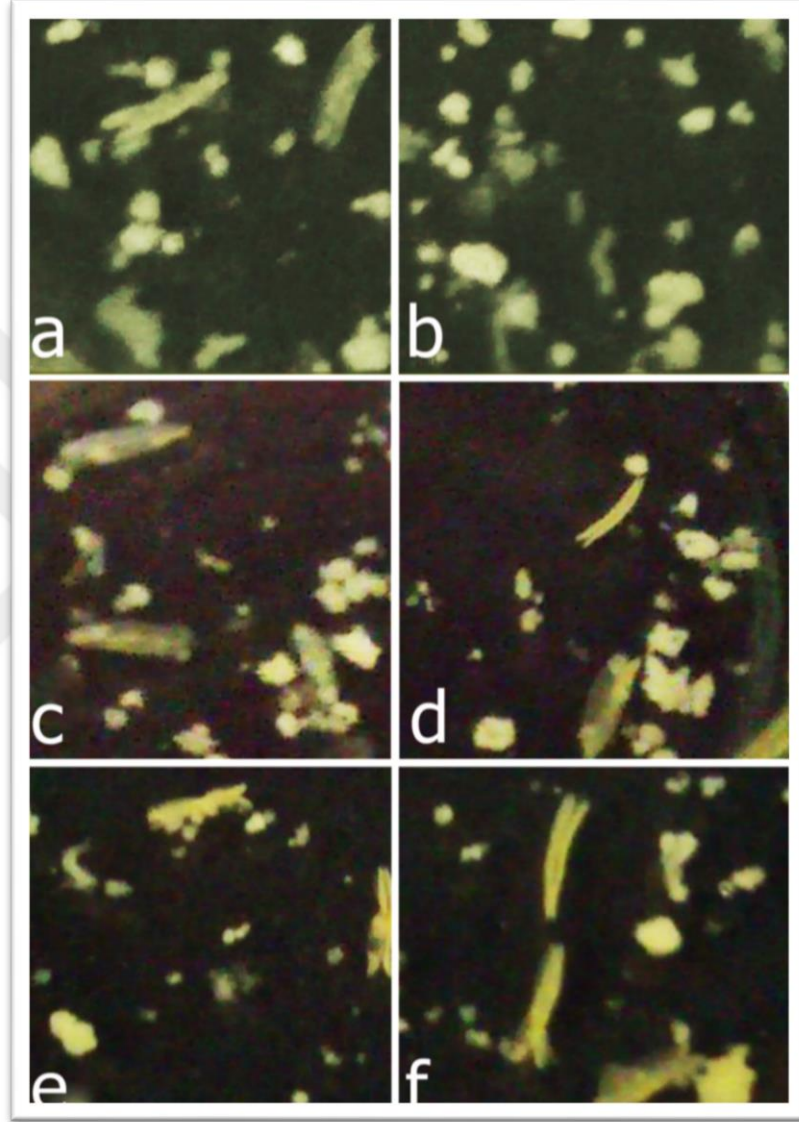
** $p < 0.01$

Kallus oluşum oranı(%): Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu (% 3) Zeynelağa × Akar ve Zeynelağa × Tarm-92, Zeynelağa × Bülbül-89, Zeynelağa × Aydanhanım (% 2) izlenmiştir (Çizelge 4.12). Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre Zeynelağa × Tarm-92 (% 15) melezinde en yüksek kallus oranı elde edilirken Zeynelağa × *H. spontaneum* (% 2) en az kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre en fazla kallus oluşumu (% 15) Zeynelağa × Aydanhanım melezinde iken Zeynelağa × *H. spontaneum* (% 1) melezinde en az kallus sayısı elde edilmiştir.

Zeynelağa çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kallus oluşum oranı % 0 - % 8 arasında değişerek, en yüksek değere 0,3 M mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Şekil 4.5 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 24 gün sonra a. Zeynelağa b. Zeynelağa × Tarm-92, c. Zeynelağa × Bülbül-89, d. Zeynelağa × Aydanhanım, e. Zeynelağa × Akar f. Zeynelağa × *H. spontaneum* genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Sürgün oluşum oranı (%): Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre % 50 oranıyla Zeynelağa × Tarm-92 ve Zeynelağa × Bülbül-89 melezleri en yüksek sürgün değerine sahiptir (Çizelge 4.12).

En az sürgün oluşumu ise % 33 değeriyle Zeynelağa × Akar melezinde elde edilmiştir. Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde ise hiç sürgün elde edilememiştir.

Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az sürgün oluşumu (% 62) Zeynelağa × Aydanhanım ve Zeynelağa × Akar (% 40) izlenmiştir. Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde ise sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre sırasıyla en fazla sürgün oluşumu % 60 oranıyla Zeynelağa × Bülbül-89 melezine ait iken en az sürgün oluşumu % 15,34 oranıyla Zeynelağa × Aydanhanım melezinde gözlenmiştir. Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde ise hiç sürgün oluşumu izlenmemiştir.

Zeynelağa çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa sürgün oluşum oranı %0-%75 arasında değişerek, en yüksek değere karanlıkta 0,3 M mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla oluşumu (1 adet) Zeynelağa × Bülbül-89 ve Zeynelağa × Akar melezinde izlenmiştir. Zeynelağa × Tarm-92, Zeynelağa × Aydanhanım ve Zeynelağa × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.12).

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (8 adet) Zeynelağa × Bülbül- 89 ve Zeynelağa × Akar (2 adet) izlenmiştir. Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde ise kök oluşumu gözlenmemiştir.

Karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre Zeynelağa × Tarm-92, Zeynelağa × Bülbül-89, Zeynelağa × Aydanhanım, Zeynelağa × Akar melezlerinde 1’er

adet köklenen bitki elde edilirken, Zeynelağa $\times$ *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Zeynelağa çeşidinde her üç muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kök oluşumu 0 ile 2 adet arasında değişmiş, en yüksek değere karanlıkta 0,3 M mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Çizelge 4.12 Farklı ön muamele uygulamalarının Zeynelağa çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)**			Sürgün oluşum oranı (%)**			Köklenen bitki sayısı (adet)**		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
Zeynelağa	8.00a	6.00d	000f	75.00a	33.00e	0.00e	2.00a	1.00e	0.00b
Zeynelağa × Tarm-92	2.00c	15.00a	6.00b	50.00b	60.00b	33.00c	0.00c	5.00b	1.00a
Zeynelağa × Bülbül-89	2.00c	12.00b	5.00c	50.00b	58.67c	60.00a	1.00b	8.00a	1.00a
Zeynelağa × Aydanhanım	2.00c	8.00c	7.00a	0.00d	62.00a	15.34d	0.00c	3.00c	1.00a
Zeynelağa × Akar	3.00b	5.00d	3.00d	33.00c	40.00d	33.00b	1.00b	2.00d	1.00a
Zeynelağa × <i>H. spontaneum</i>	0.00d	2.00e	1.00e	0.00d	0.00e	0.00e	0.00c	0.00f	0.00b

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.5 Akar eşidi ve Melezlerine ait Bazı Morfolojik Özellikler

Akar eşidinin boyu $93,0\pm0,4$ iken melezlerin boyları $75,0\pm0,5$ - $90,0\pm0,1$ arasında değişmiş olup melezler arasındaki en uzun boya sahip olduğu belirlenmiştir (izelge 4.13). Akar eşidinin başak boyu $8,0\pm0,9$ iken melezlerin boyları $6,5\pm0,3$ - $8,5\pm0,2$ arasında değişmiştir. Akar $\times$ Tarm-92 melezinde başak boyunun, Akar eşidi ve diğer mezlere oranla daha uzun olduğu görölmüştür. Akar eşidinin bayrak yaprak boyu $22,0\pm0,9$ iken melezlerin boyları $21,0\pm0,5$ - $23,0\pm0,6$ arasında değişmiştir. Akar $\times$ Tarm-92 ve Akar $\times$ Zeynelağa melezlerinde bayrak yaprak boylarının, Akar çeşidine göre daha uzun olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13 Akar eşidi ve melezlerin Bitki boyu (cm), Başak boyu (cm) ve Bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri

Popölasyon	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
Akar	$93,0\pm0,4$	$8,0\pm0,9$	$22,0\pm0,9$
Akar $\times$ Tarm-92	$89,0\pm0,6$	$8,5\pm0,2$	$23,0\pm0,6$
Akar $\times$ Bülbül-89	$87,0\pm0,3$	$8,2\pm0,4$	$21,0\pm0,5$
Akar $\times$ Aydanhanım	$90,0\pm0,1$	$8,0\pm0,7$	$22,5\pm0,8$
Akar $\times$ Zeynelağa	$88,0\pm0,7$	$6,5\pm0,3$	$23,0\pm0,6$
Akar $\times$ <i>H. Spontaneum</i>	$75,0\pm0,5$	$7,0\pm0,8$	$21,0\pm0,8$

$\pm$ Standart hata

4.5.1 Akar eşidi ve melezlerinde anter költürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

Akar eşidi ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları izelge 4.14’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler ve muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık görölmüştür. Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından Genotipler $\times$ Muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli etkileşim görölmüştür.

Çizelge 4.14 Farklı ön muamele uygulamalarının Akar çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	59,57	22,65**	1939,46	20,14**	16,16	24,25**
Muameleler	2	418,74	159,23**	7958,16	82,65**	113,16	169,75**
Genotipler × Muameleler	10	21,67	8,24**	867,96	9,01**	9,16	13,75**
Hata	36	2,63		96,27		0,66	
Düzeltilmiş toplam	53						

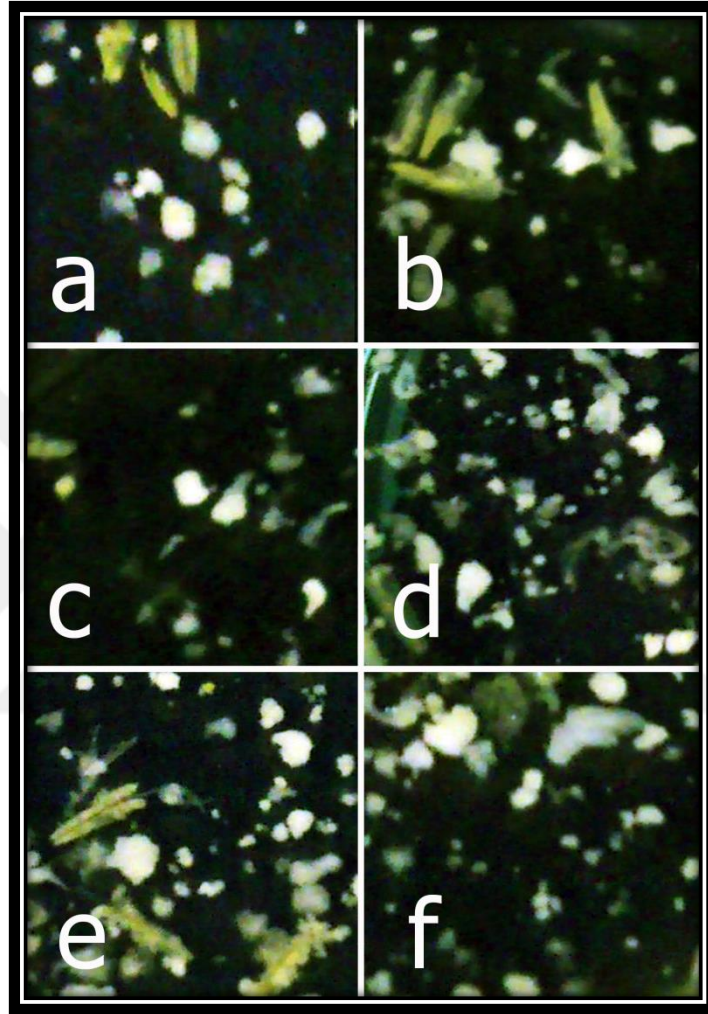
**p<0.01

Kallus oluşum oranı(%): Akar çeşidi ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kallus oluşumu Akar × Tarm-92 (% 3), Akar × Zeynelağa (%3) ve Akar × Aydanhanım (% 1) izlenmiştir (Çizelge 4.15). Akar × *H. spontaneum* melezinde ise hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre Akar × Aydanhanım melezinde % 18 oranıyla en yüksek kallus oranı elde edilmiş, Akar × *H. spontaneum* melezinde ise % 3 oranıyla en az kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6).

Karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre Akar × Aydanhanım melezinde % 7 oranıyla en yüksek kallus sayısı elde edilirken en az kallus oluşumu Akar × *H. spontaneum* (% 2) melezinde izlenmiştir.

Akar çeşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kallus oluşum oranı % 2-10 arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Şekil 4.6 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 35 gün sonunda a. Akar çeşidi, b. Akar × Tarm-92, c. Akar × Bülbül-89 d. Akar × Aydanhanım e. Akar × Zeynelağa f. Akar × *H. spontaneum* genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Sürgün oluşum oranı (%): Akar çeşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre Akar × Tarm-92 ve Akar × Zeynelağa melezlerinde % 33,00 oranında sürgün elde edilmiştir (Çizelge 4.15). Buna karşın Akar × Bülbül-89, Akar × Aydanhanım ve Akar × *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Akar eşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol  n uygulaması sonucuna göre Akar   Aydanhanım melezinde %83 sürgün elde edilirken, Akar   Bülbül-89 melezinde % 27 oranıyla en az sürgün oluşumu gözlenmiştir. Sürgün oluşumunda yeşil bitki rejenerasyonu albino bitki rejenerasyonuna oranla daha yüksektir.

Karanlıkta +4  C’de 21 gün bekletme  n uygulamasına göre sırasıyla en fazla ve en az sürgün oluşumu (% 28) Akar   Aydanhanım ve (% 20) Akar   Zeynelağa melezinde izlenmiştir. Akar   Bülbül-89 ve Akar   *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Akar eşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa sürgün oluşum oranı %40-%60 arasında değişerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol  n uygulaması sonucunda rastlanmıştır.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): Akar eşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde 0,3 M Mannitol  n uygulaması sonucuna göre Akar   Tarm-92 melezinde 1 adet köklenen bitki elde edilmiştir (izelge 4.15). Akar   Bülbül-89, Akar   Aydanhanım, Akar   Zeynelağa, Akar   *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol  n uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla ve en az kök oluşumu (10 adet) Akar   Aydanhanım ve Akar   *H. spontaneum* (1 adet) izlenmiştir.

Akar eşidi ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4  C’de 21 gün bekletme  n uygulamasına göre Akar   Tarm-92 ve Akar   Aydanhanım melezlerinde 1’er adet köklenen bitki elde edilmiştir. Akar   Bülbül-89, Akar   Akar ve Akar   Zeynelağa ve Akar   *H. spontaneum* melezlerinde ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir.

Akar eşidinde her üç Muameleler arasında kıyaslama yapılırsa kök oluşumu 1 ile 5 adet arasında değışerek, en yüksek değere 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda rastlanmıştır.



Çizelge 4.15 Farklı ön muamele uygulamalarının Akar çeşidi ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)			Sürgün oluşum oranı (%)			Köklenen bitki sayısı (adet)		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
Akar	2.00ab	10.00d	5.00b	50.00a	60.00b	40.00a	1.00a	5.00c	2.00a
Akar × Tarm-92	3.00a	12.00c	4.00bc	33.00b	66.00b	25.00c	1.00a	7.00b	1.00b
Akar × Bülbül-89	2.00ab	8.00e	3.00c	0.00c	27.00c	0.00d	0.00b	3.00c	0.00c
Akar × Aydanhanım	1.00b	18.00a	7.00a	0.00c	83.00a	28.00b	0.00b	10.00a	1.00b
Akar × Zeynelağa	3.00a	16.00b	5.33b	33.00b	31.00c	20.00c	0.00b	3.00c	0.00c
Akar × <i>H. spontaneum</i>	0.00c	3.00f	2.00d	0.00c	66.00b	0.00d	0.00b	1.00d	0.00c

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.6 *H. spontaneum* türü ve melezlerine ait bazı morfolojik özellikler

H. spontaneum türünün boyu $76,0 \pm 0,6$ iken melezlerin bitki boyları $74,0 \pm 0,6$ - $82,0 \pm 0,9$ arasında değişmiş olduğu gözlenmiştir. *H. spontaneum* $\times$ Tarm-92 melezinin boyu diğer melezler arasında en uzun olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16). *H. spontaneum* türünün başak boyu $7,4 \pm 0,7$ iken melezlerin başak boyları $6,5 \pm 0,5$ - $7,5 \pm 0,6$ arasında değişmiştir. *H. spontaneum* $\times$ Aydanhanım melezinde başak boyunun, *H. spontaneum* türü ve diğer mezlere oranla daha uzun olduğu görülmüştür. *H. spontaneum* türünün bayrak yaprak boyu $22,0 \pm 0,9$ iken melezlerin boyları $16,0 \pm 0,6$ - $24,0 \pm 0,3$ arasında değişmiştir. *H. spontaneum* $\times$ Tarm-92 melezi en uzun bayrak yaprak boyuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. *H. spontaneum* $\times$ Aydanhanım melezinde ise bayrak yaprak boyu en kısa olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.16 *H. spontaneum* türü ve melezlerin bitki boyu (cm), başak boyu (cm) ve bayrak yaprak boyu (cm) ile ilgili morfolojik özellikleri

Popülasyon	Bitki boyu (cm)	Başak boyu (cm)	Bayrak yaprak boyu (cm)
<i>H. spontaneum</i>	$76,0 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,7$	$22,0 \pm 0,9$
<i>H. spontaneum</i> $\times$ Tarm-92	$82,0 \pm 0,9$	$6,8 \pm 0,5$	$24,0 \pm 0,3$
<i>H. spontaneum</i> $\times$ Bülbül-89	$80,0 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,4$	$20,0 \pm 0,2$
<i>H. spontaneum</i> $\times$ Aydanhanım	$75,0 \pm 0,9$	$7,5 \pm 0,6$	$16,0 \pm 0,6$
<i>H. spontaneum</i> $\times$ Zeynelağa	$74,0 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,6$	$19,0 \pm 0,5$
<i>H. spontaneum</i> $\times$ Akar	$76,0 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,5$	$19,0 \pm 0,5$

$\pm$ Standart hata

4.6.1 *H. spontaneum* türü ve melezlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi

H. spontaneum türü ve melezlerine ait kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı ile ilgili varyans analizi sonuçları çizelge 4.17’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından genotipler ve muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşum oranı, sürgün

oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından Genotipler×Muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli etkileşim görülmüştür.

Çizelge 4.17 Farklı Ön muamele uygulamalarının *H. spontaneum* türü ve melezlerinde haploid bitki oluşum etkilerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Köklenen bitki sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Genotipler	5	6,56	14,77**	4459,46	50,32**	0,40	7,20**
Muameleler	2	30,16	67,87**	2672,66	30,16**	3,50	63,00**
Genotipler × Muameleler	10	3,36	7,57**	4109,46	46,37**	0,90	16,20**
Hata	36	0,44		88,61		0,05	
Düzeltilmiş toplam	53						

** $p < 0.01$

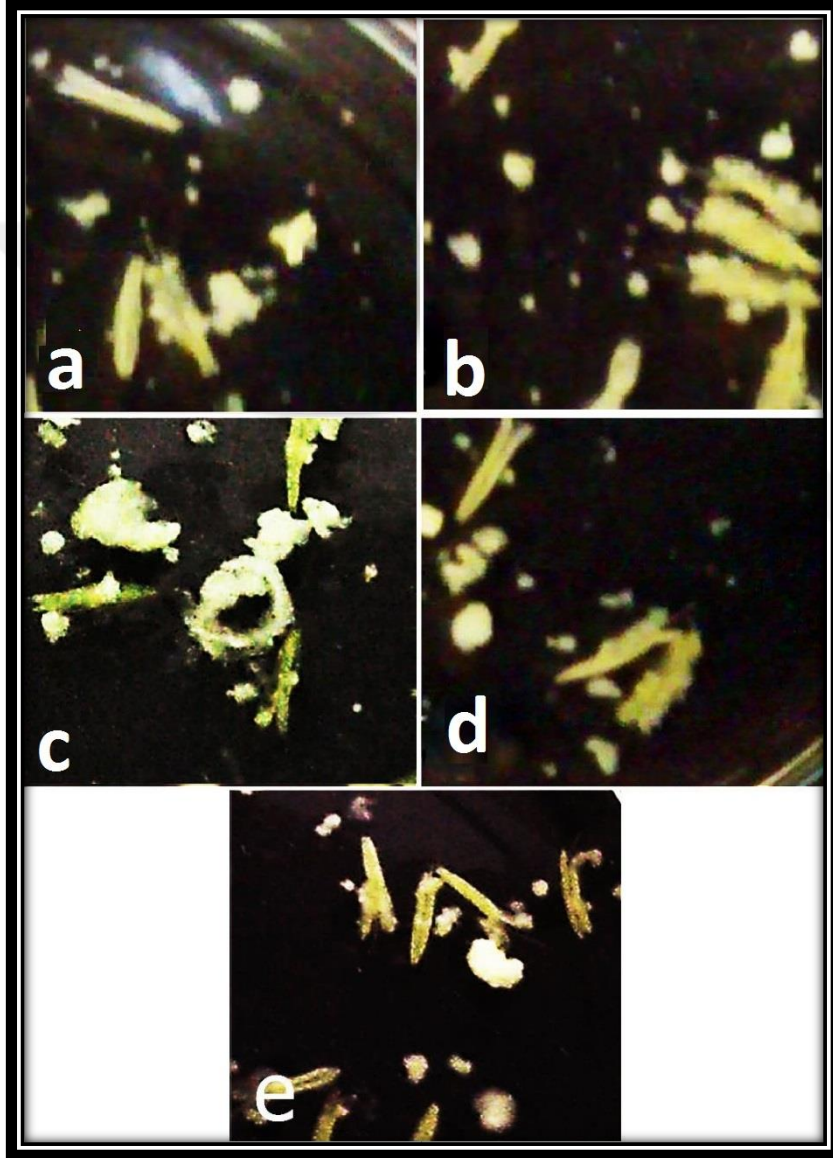
Kallus oluşum oranı(%): *H. spontaneum* yabani türü ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre *H. spontaneum* × Bülbül-89 ve *H. spontaneum* × Aydanhanım melezlerinde % 1 oranında kallus oluşumu görülmüştür (Çizelge 4.18). *H. spontaneum* × Tarm-92, *H. spontaneum* × Zeynelağa ve *H. spontaneum* × Akar melezlerinde ise hiç kallus oluşumu izlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre sırasıyla en fazla kallus oluşumu (% 5) *H. spontaneum* × Tarm-92 melezinde az kallus oluşumu *H. spontaneum* × Zeynelağa (% 1) melezinde gözlenmiştir (Şekil 4.7).

H. spontaneum türü ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre *H. spontaneum* × Bülbül-89 melezinde % 2

oranında kallus elde edilmiştir. *H. spontaneum* × Tarm-92, *H. spontaneum* × Aydanhanım, *H. spontaneum* × Zeynelağa ve *H. spontaneum* × Akar melezlerinde ise %1 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir.

H. spontaneum türünde her üç muamelelerde de hiç kallus oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.7 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden 28 gün sonunda a. *H. spontaneum* × Tarm- 92 b. *H.spontaneum* × Bülbül-89 c. *H.spontaneum* × Aydanhanım d. *H.spontaneum* × Zeynelağa e. *H.spontaneum* × Akar genotiplerinde elde edilen kallus oluşumları

Sürgün oluşum oranı (%): *H. spontaneum* türü ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre *H. spontaneum* × Aydanhanım melezinde % 100 sürgün oluşumu elde edilmiştir (Çizelge 4.18). *H. spontaneum* × Tarm-92, *H. spontaneum* × Bülbül-89, *H. spontaneum* × Zeynelağa ve *H. spontaneum* × Akar melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre *H. spontaneum* × Akar melezinde % 75 oranında sürgün oluşumu gözlenmiştir. En az sürgün oluşumu ise % 20 oranıyla *H. spontaneum* × Tarm-92 melezinde elde edilmiştir.

H. spontaneum türü ve melezlerine ait yapılan istatistik analizinde karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre *H. spontaneum* × Zeynelağa melezinde % 100 sürgün oluşumu gözlenirken *H. spontaneum* × Bülbül-89 melezinde % 50 sürgün oluşumu elde edilmiştir. *H. spontaneum* × Tarm-92, *H. spontaneum* × Aydanhanım ve *H. spontaneum* × Akar melezlerinde ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

H. spontaneum türünde her üç muameleler arasında kıyaslama yapıldığında hiç sürgün elde edilemediği görülmüştür.

Köklenen Bitki Sayısı (adet): *H. spontaneum* türü ve melezlerine ait yapılan Duncan testine göre 0,3 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre melez hatlarda hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.18).

Yapılan istatistik analizinde 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre *H. spontaneum* × Akar melezinden 2 adet köklenmiş bitki elde edilmiştir, *H. spontaneum* × Tarm-92, *H. spontaneum* × Aydanhanım ve *H. spontaneum* × Zeynelağa melezlerinde ise 1’er adet bitki elde edilebilmiştir. *H. spontaneum* × Bülbül-89 melezinde köklenmiş bitki eldesi gerçekleşmemiştir.

Karanlıkta +4 °C’de 21 gün bekletme ön uygulamasına göre *H. spontaneum* × Bülbül-89 melezinden 1 adet bitki elde edilebilmiş, diğer melezlerden bitki elde edilememiştir.

H. spontaneum türünde her üç muamelelerde de köklenmiş bitki eldesi gerçekleşmemiştir.



Çizelge 4.18 Farklı ön muamele uygulamalarının *H. spontaneum* türü ve melezlerinde oluşum etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)**			Sürgün oluşum oranı (%)**			Köklenmiş bitki eldesi (adet)**		
	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C	Mannitol		+4 °C
	0,3M	0,7M		0,3M	0,7M		0,3M	0,7M	
<i>H. spontaneum</i>	0.00b	0.00e	0.00c	0.00	0.00f	0.00c	0.00	0.00c	0.00b
<i>H. spontaneum</i> × Tarm-92	0.00b	5.00a	1.00b	0.00	20.00e	0.00c	0.00	1.00b	0.00b
<i>H. spontaneum</i> × Bülbül-89	1.00a	3.00c	2.00a	0.00	33.00d	50.00b	0.00	0.00c	1.00a
<i>H. spontaneum</i> × Aydanhanım	1.00a	4.00b	1.00b	100.0	50.00c	0.00c	0.00	1.00b	0.00b
<i>H. spontaneum</i> × Zeynelağa	0.00b	1.00d	1.00b	0.00	66.00b	100.00a	0.00	1.00b	0.00b
<i>H. spontaneum</i> × Akar	0.00b	4.00b	1.00b	0.00	75.00a	0.00c	0.00	2.00a	0.00b

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7 Tescilli eşitler ve Melezlerde Anter Kültürü Uygulamaları

Optimizasyon alışmasında 0,3 M Mannitol n uygulaması, 0,7 M Mannitol n uygulaması ve +4  C'de karanlıkta başakları bekletme denemeleri kurulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde en etkili n uygulamanın 0,7 M Mannitol n uygulaması olduğu grlmştr. Bu sebeple kurulan diğer denemelerde 0,7 M Mannitol n uygulaması ile çalışmalara devam edilmiştir.

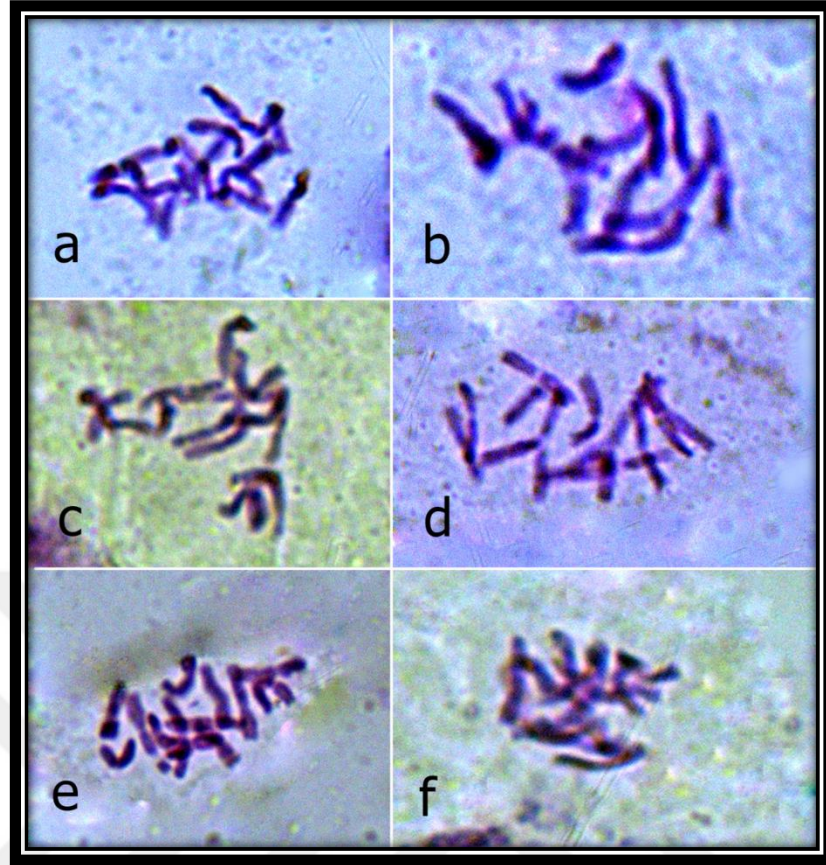
4.7.1 Tarm-92 eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

Tarm-92 eşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler izelge 4.19'da verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250'şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün sayısı, köklenen bitki oranı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en yüksek değerler Tarm-92   Aydanhanım melezinde gözlenmiştir. Sürgün oluşum oranı bakımından en yüksek değerin Tarm-92   Bülbül-89 melezinde elde edildiği grlmştr (şekil 4.8). Bütün parametrelere göre en düşük değerler ise Tarm-92   *H. spontaneum* melezinde rastlanmıştır.



Şekil 4.8 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra; Tarm-92 çeşidi, Tarm-92 × Bülül-89, Tarm-92 × Aydanhanım, Tarm-92 × Zeynelağa, Tarm-92 × Akar, Tarm-92 × *H. spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 0,7 M Mannitol ön uygulaması ön muamelesi sonucu elde edilen a. Tarm-92 çeşidi b. Tarm-92 × Bülbul-89 c. Tarm-92 × Aydanhanım d. Tarm-92 × Zeynelağa e. Tarm-92 × Akar f. Tarm-92 × *H. spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü ($2n=14$)

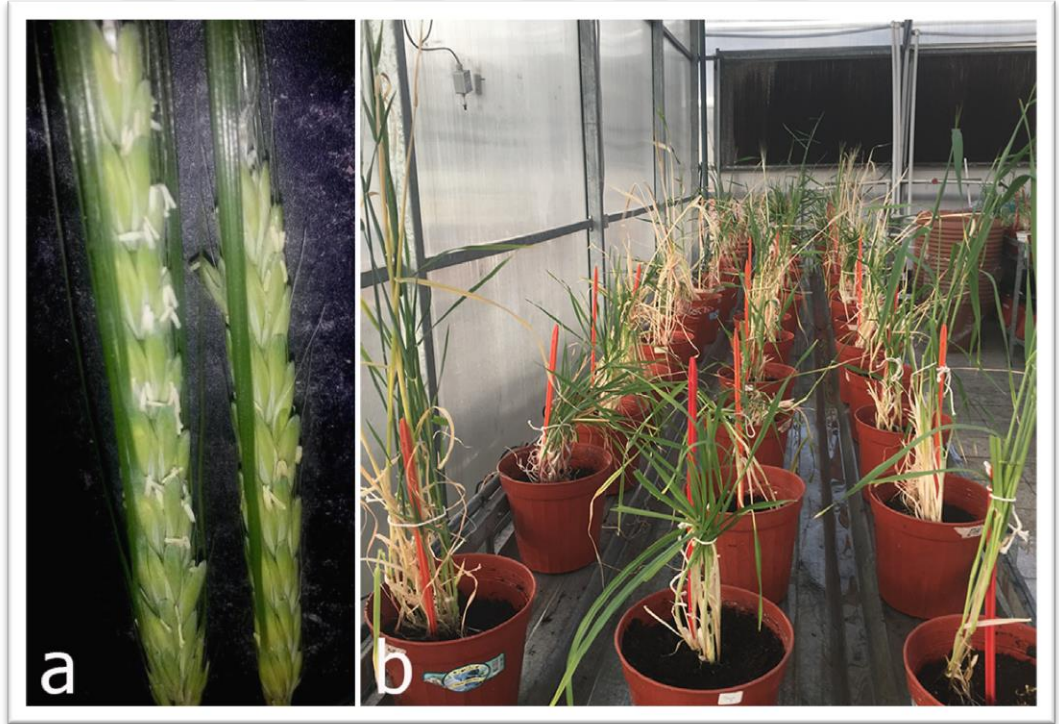
Çizelge 4.19 Tarm-92 çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
Tarm-92	12,00c	30.00d	33,30e	10.00e	80,00c	8.00e	87,50b	7.00f
Tarm-92 × Bülbül-89	18,40b	46.00c	69,50a	32.00b	81,25c	26.00b	84,60c	22.00b
Tarm-92 × Aydanhanım	23,20a	58.00a	65,50b	38.00a	94,70a	36.00a	97,22a	35.00a
Tarm-92 × Zeynelağa	9,20d	23.00e	65,20b	15.00d	80,00c	12.00d	83,33c	10.00d
Tarm-92 × Akar	19,20b	48.00b	45,80c	22.00c	90,90b	20.00c	75,00d	15.00c
Tarm-92 × <i>H. spontaneum</i>	4,00e	10.00f	40,00d	4.00f	50,00d	2.00f	50,00e	1.00g

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

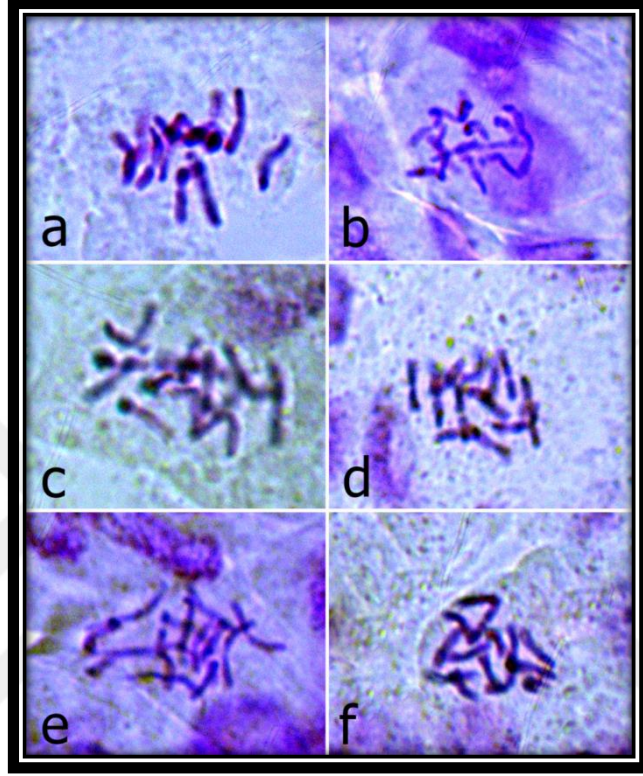
4.7.2 Bülbül-89 eşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

Bülbül-89 eşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler izelge 4.20’de verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250’şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün oluşum oranı, sürgün sayısı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en yüksek değerler Bülbül-89 × Tarm-92 melezinde gözlenmiştir. Köklenen bitki oranı bakımından en yüksek değerin Bülbül-89 × Aydanhanım melezinde elde edildiği grlmştr. Kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün oluşum oranı, sürgün sayısı, köklenen bitki sayısı ve diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en düşük değerler Bülbül-89 × *H. spontaneum* melezinde rastlanmıştır. Diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı incelendiğinde ise en düşük değer Bülbül-89 × Aydanhanım melezinde grlmştr (şekil 4.10).



şekil 4.10 0,7 M Mannitol n uygulamasına tabi tutulan anterlerden a. Bülbül-89 eşidi
b. Bülbül-89 eşidi, Bülbül-89 × Tarm-92, Bülbül-89 × Aydanhanım, Bülbül-89 × Zeynelağa, Bülbül-89 × Akar, Bülbül-89 × *H. spontaneum* genotiplerinde double haploid bitkilerin sera koşullarına alıştırılması

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 0,7 M Mannitol ön muamelesi sonucu elde edilen a. Bülbul-89 çeşidi b. Bülbul-89 × Tarm-92 c. Bülbul-89 × Akar d. Bülbul-89 × Zeynelağa e. Bülbul-89 × Aydanhanım f. Bülbul-89 × *H. spontaneum* genotillerine ait double haploid bitki kromozomlarının şematik görüntüsü ($2n=14$)

Çizelge 4.20 Bülül-89 çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün Sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
Bülül-89	12,00b	18.00e	55,50d	10.00e	80,00c	8.00e	75,00c	6.00d
Bülül-89 × Tarm-92	18,40a	46.00a	78,20ba	36.00a	88,80b	32.00a	93,75a	30.00a
Bülül-89 × Akar	13,20c	33.00b	75,75c	25.00b	88,00b	22.00b	45,45d	10.00b
Bülül-89 × Zeynelağa	11,20b	28.00c	57,10d	16.00d	75,00d	12.00d	83,33b	10.00b
Bülül-89 × Aydanhanım	10,40c	26.00d	76,90a	20.00c	90,00a	18.00c	44,44e	8.00c
Bülül-89 × <i>H. spontaneum</i>	3,20d	8.00f	37,5e	3.00f	66,66e	2.00f	50,00d	1.00e

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7.3 Aydanhanım çeşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

Aydanhanım çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler çizelge 4.21’de verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250’şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün oluşum oranı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı bakımından en yüksek değerler Aydanhanım × Tarm-92 melezinde gözlenmiştir. Aydanhanım × Bülbül-89 melezine ait parametreler incelendiğinde en yüksek veriler sürgün sayısı, köklenen bitki oranı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısında rastlanmıştır (Şekil 4.12).

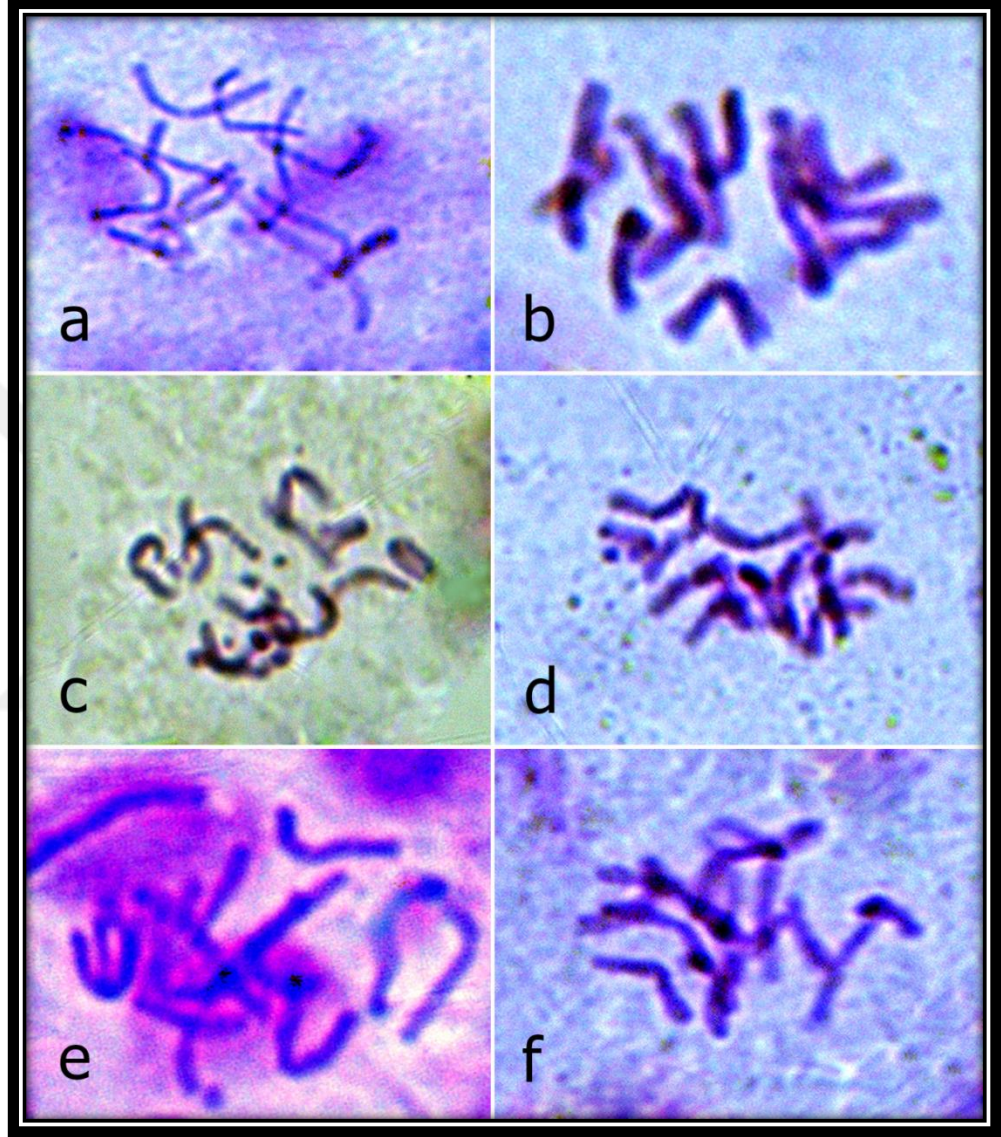
Kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün sayısı, köklenen bitki sayısı ve diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en düşük değerler Aydanhanım × *H. spontaneum* melezinde rastlanmıştır.

Sürgün oluşum oranı bakımından en düşük değer % 46,60 oranı ile Aydanhanım çeşidinde izlenmiştir. Aydanhanım × Zeynelağa melezinde; köklenen bitki oranı ve diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı açısından en düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.12 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra; Aydanhanım çeşidi, Aydanhanım × Tarm-92, Aydanhanım × Bülbül-89, Aydanhanım × Zeynelağa, Aydanhanım × Akar, Aydanhanım × *H.spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 0,7 M Mannitol ön muamelesi sonucu elde edilen a. Aydanhanım b. Aydanhanım × Tarm-92 c. Aydanhanım × Bülbül-89 d. Aydanhanım × Zeynelağa e. Aydanhanım × Akar f. Aydanhanım × *H. spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü ($2n=14$)

Çizelge 4.21 Aydanhanım çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturmalarına ait veriler

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün Sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
Aydanhanım	12,00c	30,00c	46,60e	14,00c	85,71b	12,00c	83,33b	10,00c
Aydanhanım × Tarm-92	19,20a	48,00a	62,50b	30,00b	86,66b	26,00b	92,30a	24,00b
Aydanhanım × Bülbül-89	16,00b	40,00b	80,00a	32,00a	93,75a	30,00a	83,33b	25,00a
Aydanhanım × Zeynelağa	7,20e	18,00e	55,50c	10,00d	40,00e	4,00e	50,00d	2,00e
Aydanhanım × Akar	11,20d	28,00d	50,00d	14,00c	71,42c	10,00d	80,00c	8,00d
Aydanhanım × <i>H. spontaneum</i>	3,20f	8,00f	50,00d	4,00e	50,00d	2,00f	50,00d	1,00f

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7.4 Zeynelağa çeşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

Zeynelağa çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler çizelge 4.22’de verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250’şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi kallus oluşum oranı, kallus sayısı ve köklenen bitki sayısı bakımından en yüksek değerler Zeynelağa × Tarm-92 melezinde gözlenmiştir.

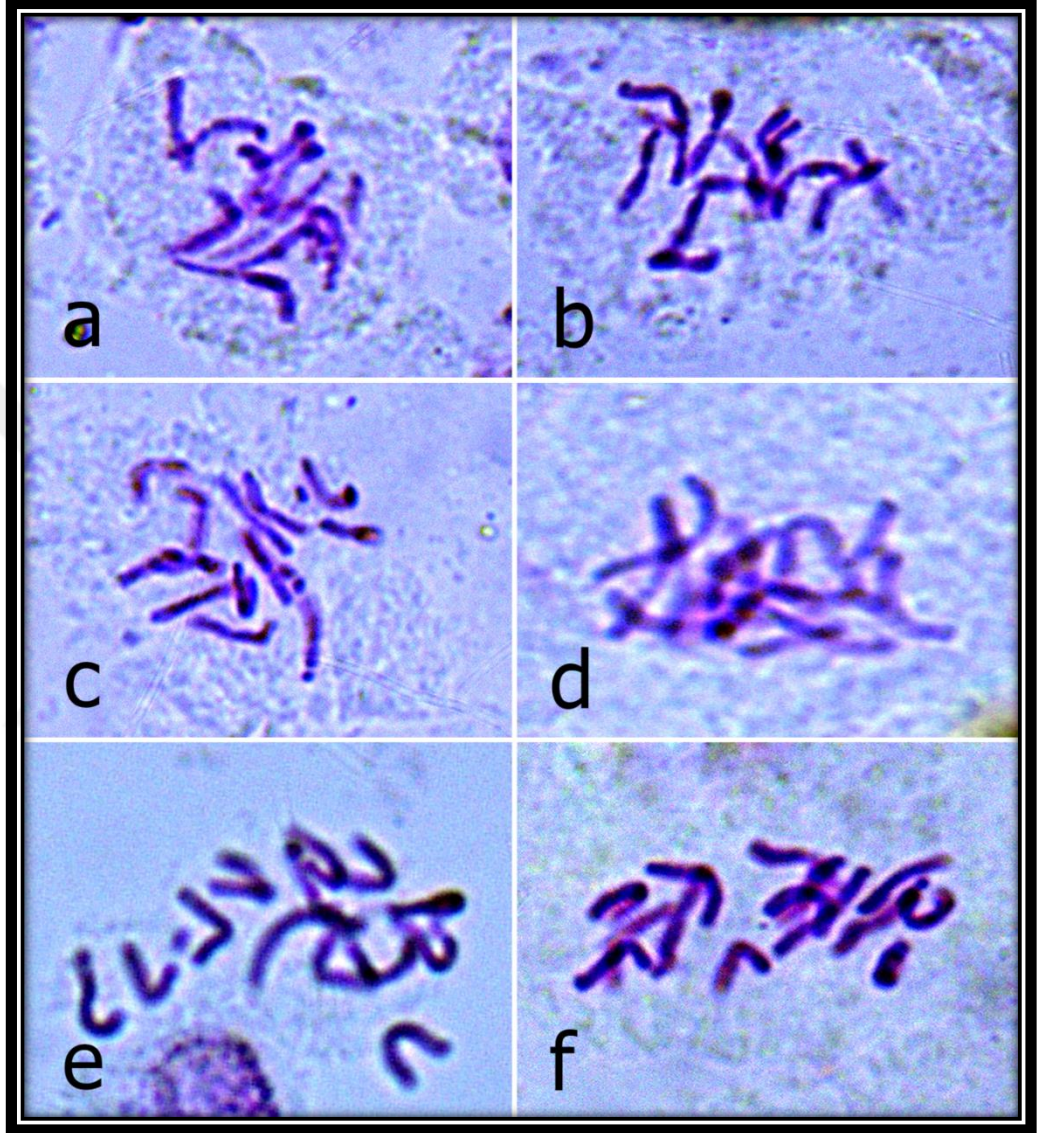
En yüksek köklenen bitki oranının (%100) Zeynelağa çeşidi ve Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinden elde edildiği görülmüştür. Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki oranı ise en yüksek Zeynelağa × *H. spontaneum* melezinde izlenmiştir (Şekil 4.14).

Kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün oluşum oranı, sürgün sayısı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en düşük veriler Zeynelağa× *H. spontaneum* melezinden elde edilmiştir.



Şekil 4.14 0,7 M Mannitol ön muamelesinden sonra; Zeynelağa çeşidi,, Zeynelağa × Tarm-92, Zeynelağa × Bülbül-89, Zeynelağa × Aydanhanım, Zeynelağa × Akar, Zeynelağa × *H. spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitkilerin sera koşullarında alıştırılması

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15)



Şekil 4.15 0,7 M Mannitol ön muamelesi sonucu elde edilen a. Zeynelağa çeşidi b. Zeynelağa × Tarm-92 c. Zeynelağa × Bülbül-89 d. Zeynelağa × Aydanhanım e. Zeynelağa × Akar f. Zeynelağa × *H. spontaneum* genotiplerine ait double haploid bitki kromozomlarının şematik görüntüsü ($2n=14$)

Çizelge 4.22 Zeynelağa çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
Zeynelağa	11,20c	28.00c	42,85c	12.00d	100,00a	12.00b	83,33b	10.00b
Zeynelağa × Tarm-92	18,80a	47.00a	63,80b	30.00a	83,33b	25.00a	80,00c	20.00a
Zeynelağa × Bülbül-89	10,00d	25.00d	64,00b	16.00b	75,00d	12.00b	83,00b	10.00b
Zeynelağa × Aydanhanım	15,20b	38.00b	39,40d	15.00c	80,00c	12.00b	83,00b	10.00b
Zeynelağa × Akar	4,80e	12.00e	83,30a	10.00e	60,00e	6.00c	83,00b	5.00c
Zeynelağa × <i>H. spontaneum</i>	2,40f	6.00f	16,60e	1.00f	100,00a	1.00d	100,00a	1.00d

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7.5 Akar çeşidi ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

Akar çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler çizelge 4.23’de verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250’şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi Akar çeşidinde; kallus oluşum oranı, kallus sayısı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en yüksek değerlere rastlanmıştır. Sürgün sayısı (12 adet) Akar çeşidi, Akar $\times$ Tarm-92 ve Akar $\times$ Aydanhanım melezlerinde diğer mezlere oranla daha yüksek bir değer göstermiştir. Köklenen bitki oranı bakımından en yüksek değer Akar $\times$ Tarm-92 melezinde (% 83,33) görülmüştür (Şekil 4.16).

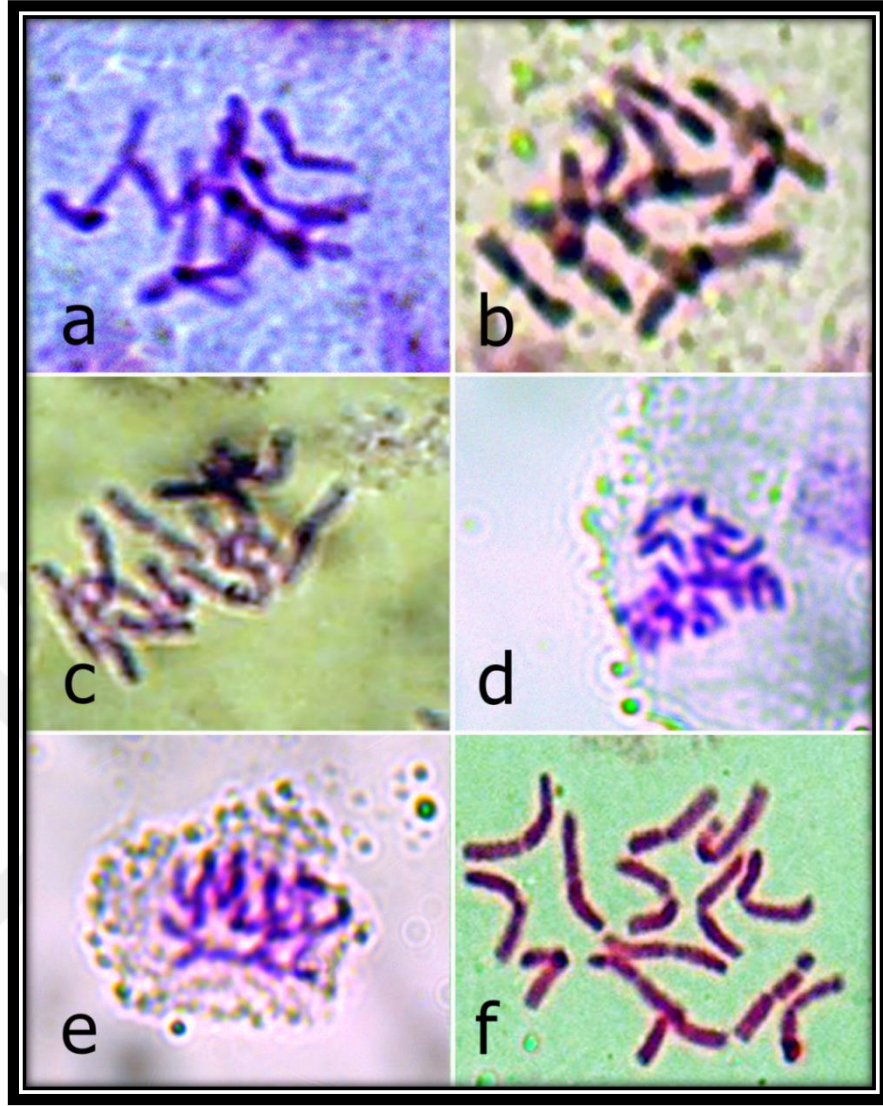
Akar $\times$ Aydanhanım melezinde sürgün oluşum oranı Akar çeşidi ve diğer mezlere göre daha yüksek orana sahip olmuştur.

Akar $\times$ *H. spontaneum* melezinde ise kallus oluşum oranı, kallus sayısı, sürgün oluşum oranı, sürgün sayısı, köklenen bitki oranı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı, Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en düşük değerler bulunduğu görülmüştür.



Şekil 4.16 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tutulan anterlerden; Akar çeşidi, Akar × Tarm-92, Akar × Bülbül-89, Akar × Aydanhanım, Akar × Zeynelağa, Akar × *H. spontaneum* genotiplerinde double haploid bitkilerin sera koşullarına alıştırılması

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17)



Şekil 4.17 0,7 M Mannitol ön muamelesi sonucu elde edilen a. Akar çeşidi b. Akar × Tarm-92 c. Akar × Bülbül-89 d. Akar × Aydanhanım e,f. Akar × Zeynelağa genotiplerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü (2n= 14)

Çizelge 4.23 Akar çeşidi ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları

Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün Sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
Akar	10.00a	25.00a	48,80e	12.00a	100.00a	12.00a	83,33a	10.00a
Akar × Tarm-92	7.60b	12.00d	63,10b	12.00a	83,33b	10.00b	80,00b	8.00b
Akar × Bülbül-89	7.20b	18.00b	55,50d	10.00b	75,00d	8.00b	62,50c	5.00c
Akar × Aydanhanım	7.20b	18.00b	66,66a	12.00a	80,00c	8.00b	62,50c	5.00d
Akar × Zeynelağa	5.60c	14.00c	57,10cc	8.00c	60,00e	5.00c	60,00d	3.00d
Akar × <i>H. spontaneum</i>	2.00d	5.00e	0.00f	0.00d	0.00f	0.00d	0.00e	0.00e

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7.6 *H. spontaneum* türü ve melezlerine ait diploidleşme sonuçları

H. spontaneum türü ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait veriler çizelge 4.24'de verilmiştir. Her popülasyon için double haploid bitkilerin oluşumu aşamasında 250'şer adet anter kullanılmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi *H. spontaneum* türünde; kallus oluşum oranı, kallus sayısı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından en yüksek değerlere rastlanmıştır. Sürgün sayısı (12 adet) *H. spontaneum* türü ve *H. spontaneum* × Tarm 92 melezinde diğer mezlere oranla daha yüksek bir değer göstermiştir. *H. spontaneum* × Tarm 92 melezi %66,66 oranı ile en yüksek köklenen bitki oranına sahip olmuştur. *H. spontaneum* × Bülbül-89 melezi diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı bakımından en yüksek değere (%100) rastlanmıştır. Sürgün oluşum oranı incelendiğinde en yüksek değer *H. spontaneum* × Aydanhanım melezinden elde edildiği gözlenmiştir. *H. spontaneum* × Aydanhanım melezinde diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı ve diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından hiçbir sonuç alınamamıştır. Yine aynı şekilde *H. spontaneum* × Zeynelağa melezinde köklenen bitki oranı, köklenen bitki sayısı, diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı ve diploidleşme ve tohum bağlayan bitki sayısı bakımından hiçbir sonuç alınamamıştır. *H. spontaneum* × Akar melezinde ise hiçbir parametreye göre sonuç alınamamıştır.

Anter kültürü çalışmalarından elde edilen double haploid bitkilere ait tohumlar hasat edildikten sonra kromozom analizi yapmak üzere köklendirmeye tabi tutulmuştur. Kök ucu incelenen hücrelerde katlanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 0,7 M Mannitol ön muamelesi sonucu elde edilen a. *H. spontaneum* türü b. *H. spontaneum* × Tarm-92 c. *H. spontaneum* × Bülbül-89 genotiplerine ait double haploid bitki kromozomların şematik görüntüsü (2n=14)

Çizelge 4.24 *H. spontaneum* türü ve melezlerinin katlanmış bitki oluşturma etkilerine ait sonuçları

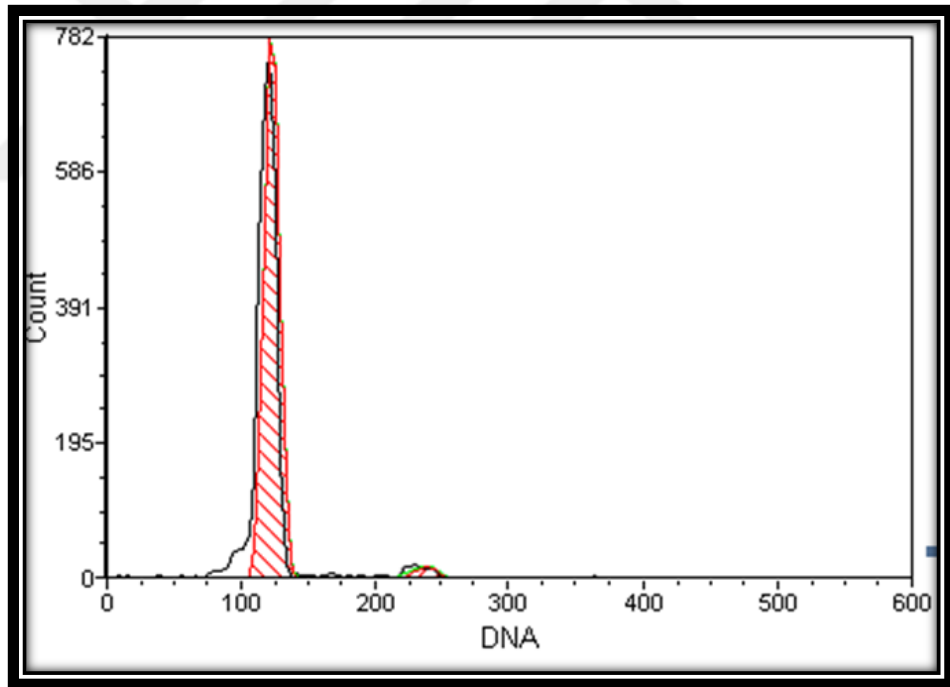
Genotip	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün Sayısı (adet)	Köklenen bitki oranı (%)	Köklenen bitki sayısı (adet)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki oranı (%)	Diploidleşme ve Tohum bağlayan bitki sayısı (adet)
<i>H. spontaneum</i>	3,20a	8.00a	37,50c	3.00a	100.00a	3.00a	66,66b	2.00a
<i>H. spontaneum</i> × Tarm 92	2,80b	7.00b	42,80b	3.00a	66,66b	2.00b	50,00c	1.00b
<i>H. spontaneum</i> × Bülbül-89	2,40b	6.00c	33,30d	2.00b	50,00c	1.00c	100,00a	1.00b
<i>H. spontaneum</i> × Aydanhanım	1,60bc	4.00e	50,00a	2.00b	50,00c	1.00c	0.00d	0.00c
<i>H. spontaneum</i> × Zeynelağa	2,00b	5.00d	20,00e	1.00c	0.00d	0.00d	0.00d	0.00c
<i>H. spontaneum</i> × Akar	0.00d	0.00f	0.00f	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00c

**Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre 0.01 düzeyinde önemlidir.

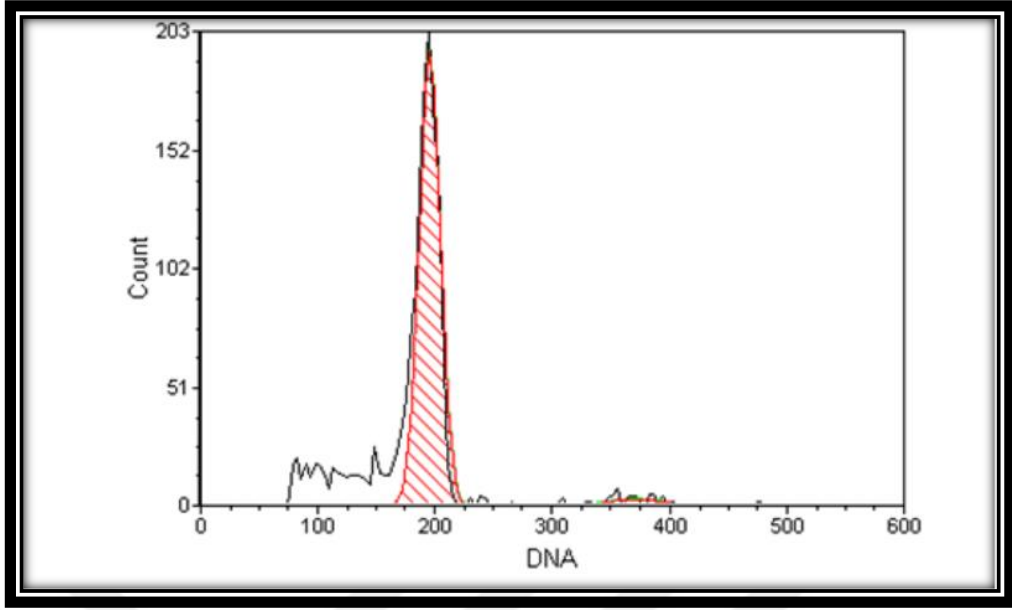
4.8 Yapılan Sitolojik Çalışmalar

4.8.1 Bitkilerde Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi

Çalışmada 5 kültür çeşidi, 1 yabani tür ve bunlardan elde edilen melez kombinasyonlarında ploidi düzeylerini belirlemek amacıyla Ploidy analyser cihazı kullanılmıştır. Çıkan sonuçlar kromozom sayımları ile örtüşmüştür. Spontan katlanma gerçekleştiği ispatlanmıştır. Anter kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen bitkilerden çok az sayıda haploid bitki oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 4.19). Arpa bitkisinde spontan katlanma oranı (% 87) çok yüksek olduğundan dolayı bu çalışmada da spontan katlanma gerçekleşmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19 Haploid kromozom sayısına sahip bitkiden elde edilen ploidi görüntüsü



Şekil 4.20 Double haploid bitkilerden elde edilen ploidi görüntüsü

5. TARTIŞMA

Geniş yayılış alanı ve kullanıma sahip olmasına rağmen, arpa bitkisinin, farklı biyotik ve abiyotik stres faktörleri verimini düşürmektedir (Um vd. 2007, Bankina ve Gaile 2009).

Bu olumsuzlukların engellenebilmesi için tane kalitesi yüksek, hastalık ve zararlılara dayanıklılık bakımından üstünlük gösteren arpa çeşitlerinin ıslah edilmesi çok önem kazanmaktadır (Anonim 2017).

Klasik ıslah yolu ile bir arpa çeşidinin ıslah edilmesi hem çok uzun zaman gerektirmekte hem de yoğun bir emek istemektedir (Poehlman 1987).

Bu kapsamda klasik ıslah ile koordineli olarak yapılabilecek biyoteknolojik yöntemlerden; özellikle anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi ile %100 saf, homozigot hatlara ulaşılabilmesi yeni bir çeşit ıslah edilebilmesinde önemli kazanç sağlamaktadır (Ellialtıoğlu 2001).

Optimizasyon: Bu tez kapsamında 5 tescilli arpa çeşidi ve 1 yabancı tür arasında resiprokal melezleme yapılmıştır. Elde edilen melezlerden anter kültürü çalışmaları için öncelikle tetrad oluşum aşamasını belirlemek üzere her başağın üst, orta ve son kısımlarından anterler kültüre alınmıştır (Szarejko ve Kasha 1991). Ancak, orta kısımlarında bulunan başakçıklara ait çiçeklerden alınan anterler, haploid bitki üretimi için en uygun olduğu görülmüştür (Huang ve Sunderland 1982, Powell 1988).

Daha sonra, optimizasyon amacıyla elde edilen ana çeşitler ve melez tohumlarına ait anterler, 3 farklı ön muameleye [0,3 M Mannitol (Kasha vd. 2003); 0,7 M Mannitol (Cistue vd. 2003); ve +4 °C’de, 21 gün karanlık (Szarejko ve Kasha 1991); tabi tutulmuştur. Al- Ashkar (2013), yaptığı bir çalışmada 5 farklı ekmeklik buğday çeşidinde 4 farklı besiyeri kullanmış ve genotipler arasında önemli genetik varyasyonlar belirlemiştir.

Bu çalışmada çeşitler ve bunlardan elde edilen melezlerde bitki boyu, başak boyu ve bayrak yaprak boyu gözlemleri alınmıştır. Elde edilen bulgulara göre Tarm-92, Bülbül-89, Aydanhanım, Zeynelağa ve Akar çeşitlerinde bitki boyunun, mezlere göre daha uzun olduğu belirlenmiştir. *H. spontaneum* türünde ise *H. spontaneum* × Tarm-92 melezinin en uzun bitki boyuna sahip olduğu saptanmıştır.

Başak boyları incelendiğinde; en uzun başak boyu Tarm-92, Tarm-92 × Zeynelağa, Bülbül-89 çeşidi, Aydanhanım × Tarm-92, Zeynelağa × Aydanhanım, Akar × Tarm-92, *H. Spontaneum* türünün en uzun başak boyuna sahip olduğu gözlenmiştir.

Bayrak yaprak boyları bakımından Tarm-92, Bülbül-89 × Zeynelağa, Aydanhanım, Zeynelağa × Aydanhanım, Akar × Tarm-92, Akar × Zeynelağa, *H. spontaneum* × Tarm-92 melezlerinin daha uzun başak boyuna sahip olduğu belirlenmiştir.

Farklı ön muamele uygulamalarının haploid bitki oluşumunda çeşitler ve melezler üzerindeki etkilerine ait analizler yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre; bütün çeşitler, *H. spontaneum* türü ve bunlara ait melezlerde; genotipler × muameleler arasında 0,01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli etkileşimler görülmüştür. Benzer şekilde, Snape ve Simpson (1981) *Hordeum bulbosum*'un double haploid bitki oluşumunda genotipler × muameleler arasında etkileşimler görmüşlerdir.

Sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından yapılan Duncan analizine göre ortalamalar arasındaki farkın bütün çeşitler, *H. spontaneum* türü ve melezlerinde 0.01 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Kallus oluşum oranı bakımından en yüksek değer; Tarm-92 çeşidinde (%30) 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucunda elde edilmiştir. Bunu sırasıyla Aydanhanım (%18), Akar × Aydanhanım (%18), Zeynelağa × Tarm-92 (%15), Bülbül-89 (%14) ve *H.spontaneum* × Tarm-92 (%5) izlemiştir. Kallus oluşturmeyen genotipler hariç, optimizasyon çalışmasında kallus oluşum oranı bütün ön uygulamalar içinde %1 ile %30 arasında değişmiştir. Al-Ashkar (2013), test ettiği buğday genotipleri arasında

önemli genetik varyasyonlar gözlenmesi ile kallus oranları % 4,67 ile 9,42 arasında değişmiştir.

Çetin Özkan ve Khawar (2015) yaptıkları bir çalışmada Tarm-92 ve Aydanhanım çeşitlerinin ve bunlardan elde edilen melezlerin anter kültürüne tepkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre kültür çeşitlerinde % 20'lik bir başarı sağlanırken melezlerde bu başarı % 90'a kadar çıkmıştır.

Sürgün oluşum oranları incelendiğinde en yüksek değerin 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucuna göre %83 oranı ile Akar × Aydanhanım melezinden elde edildiği bitkilerde sayısal olarak bitki rejenerasyonun arttığı ve albino bitki oluşumunun azaldığı görülmüştür. Benzer şekilde, Cistue vd. (1994)'nin yaptıkları bir çalışmada da arpa bitkisinde 8 g/l agar ile katılaştırılan ortamda 0,7 M Mannitol ön uygulamasına tabi tuttukları anterlerde bölünen mikrospor sayısının ve bitki rejenerasyonun artışı, albino bitki oluşumunun ise azalmasını görmüşlerdir.

En fazla köklenen bitki sayısı (adet) Akar × Aydanhanım melezinde (10); 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucu elde edilmiştir. Tarm-92 çeşidi, Tarm-92 × Bülbül-89, Aydanhanım × Bülbül-89, Zeynelağa × Bülbül-89 melezlerinde ise 0,7 M Mannitol ön uygulamasına göre 8 adet köklenmiş bitki eldesinin gerçekleştiği saptanmıştır. Daha önce yapılmış arpada double haploid çalışmalarında da Mannitol uygulamasının bitki kök oluşumlarında olumsuz etkileri görülmemiştir (Cistue vd. 2003).

Bu sonuçlara göre; en fazla kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve köklenen bitki sayısı 0,7 M Mannitol ön uygulaması sonucu elde edildiği belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 0,3 M Mannitol ön uygulaması ve +4 °C'de, 21 gün karanlıkta bekletme ön uygulaması izlemiştir. Cistué vd. (1999) model olarak kullanılan arpanın Igri çeşidi ve anter kültürüne tepkisi az olan çeşitlerde, ön uygulamalar ve besiyerinin içeriğinin double haploid bitki üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre; Mannitol ön uygulamasının bazı düşük tepki veren çeşitler için soğuk ön uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Kruczkowska vd. (2002), biri androjenetik potansiyeli yüksek Igri çeşidi olmak üzere 3 arpa çeşidinde 21 gün; 4 °C'de bekletme sonucunda,

embriyoid/kallus oluşum oranını artırmıştır, 0,3 M mannitol n uygulaması ise, double haploid bitki rejenerasyon için olumlu etki etmiştir.

Deneme başlangıcı: Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bir sonraki çalışmalarda 0,7 M Mannitol n uygulaması ile tüm denemelere devam edilmiştir. Tüm genotipler (Ana ve baba bitkiler ile melezleri) karşılaştırıldığında; kallus oluşum oranı en yüksek Tarm-92 $\times$ Aydanhanım (% 23,20) melezinde gözlenmiştir. Sırasıyla Aydanhanım $\times$ Tarm-92 (% 19,20), Zeynelağa $\times$ Tarm-92 (% 18,80) ve Bülbül-89 $\times$ Tarm-92 (% 18,40) melezlerinde de yüksek oranda kallus oluşumu kaydedilmiştir. Kallus sayısı bakımından da en yüksek değer Tarm-92 $\times$ Aydanhanım melezinde (58 adet) gözlenmiştir.

Sürgün oluşum oranları incelendiğinde en yüksek oranın Zeynelağa $\times$ Akar (% 83,30) melezinden elde edildiği belirlenmiştir. En fazla (36 adet) sürgün Bülbül-89 $\times$ Tarm-92 melezi ile elde edilmiştir.

Köklenen bitki oranı incelendiğinde en fazla kök oluşumu Zeynelağa eşidi ve Zeynelağa $\times$ *H.spontaneum* melezinden (% 100) elde edildiği grlmştr. En fazla köklenen bitki sayısı Tarm-92 $\times$ Aydanhanım (36 adet) melezinde gözlenmiştir. Zeynelağa $\times$ *H. Spontaneum* ve *H.spontaneum* $\times$ Bülbül-89 melezleri (% 100) diploidleşme ve tohum bağlayan bitki oranı bakımından en yüksek değere sahip bulunmuşlardır. Tarm-92 $\times$ Aydanhanım melezinde % 97,22 ile yüksek oranda diploidleşme ve tohum bağlama değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Luckett ve Smithard (1995) anter kültüründe besin ortamı içeriğinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 3 çeşit için farklı ortam denemeleri kurmuşlardır. Bir çeşitte en fazla haploid embriyo oluşumu ve onlardan elde edilen bitki sayısı sağlanırken, diğer çeşitte hiçbir sonuç alınamamıştır. Araştırmacılar, bu çalışmada elde ettiği sonuçları gibi genotipe göre besin ortam içeriğinin optimize edilmesi gerektiği belirtmişlerdir.

En fazla diploidleşme ve tohum bağlayan bitkiler Tarm-92 $\times$ Aydanhanım (35 adet) melezinden elde edilmiştir. Tarm-92 eşidi ve Aydanhanım eşidinin verimleri oldukça

yüksek olduğundan dolayı en fazla tohum bağlayan bitki sayısı da Tarm-92 × Aydanhanım melezlerinden elde edilmiştir.

Elde edilen bitkilerin büyük çoğunluğunda spontan Double Haploid bitki oluşumu gözlenmiştir. Bu nedenle herhangi bir kimyasal uygulamasına ihtiyaç kalmamıştır.



6. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında Türkiye’de bulunan 5 tescilli arpa çeşidi ve 1 yabancı tür kullanılmış ve bunlar arasında resiprokal melezleme yapılmıştır.

Bütün çalışmalar sera koşullarında yürütülmüştür.

Bu çalışmada, tarla koşullarında başakların sabah erken saatte alınması en iyi sonucu verdiği gibi sera koşullarında da benzer sonuç alındığı belirtilmiştir.

Çalışmada kullanılan donör bitkilerin elde edildiği dönem olan mikrospor gelişim evresini belirlemek amacıyla anterler asetokarmin ile boyanmış ve orta tek çekirdek (mid-uni nucleat) safhası belirlenmiştir.

Uygun aşamada olan başaklar % 70’lik ethanol ile steril edilmiştir.

Steril edilen başakcıkların içerisinde çıkarılan anterler 3 farklı protokole göre uygun stres koşullarını belirlemek amacıyla 3 farklı ön muamale (0,3 M Mannitol; 0,7 M Mannitol ve +4 °C’de, 21 gün karanlık ortamına alınmıştır.

İstatistiki analiz sonucu incelendiğinde 0,7 M Mannitol ön uygulamasının kullanılan çeşitlerin ve melezlerin çoğunluğu için en iyi sonucu verdiği gözlenmiştir.

Ancak; Bülbül-89 × Tarm-92 melezinde ve Zeynelağa çeşidinde + 4 °C’de 21gün bekletme sonucunda kallus oluşum oranlarının diğer ön uygulamalara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca Zeynelağa çeşidinde 0,3 M Mannitol ön muamelesi sonucunda sürgün oluşu oranı ve köklenen bitki sayısı bakımından diğer ön muamelelere göre daha yüksek değer vermiştir.

H. spontaneum × Aydanhanım melezinde en yüksek sürgün oluşum oranı; 0,3 M Mannitol ön uygulamasından elde edilirken *H. spontaneum* × Zeynelağa melezinde 4 °C’de 21 gün bekletme sonucunda elde edilmiştir.

Elde edilen verilere göre; ön uygulamalar arasındaki fark genotip etkisine bağlanabilir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi genotiptir.

Tüm çalışmalarda ön bekletmeler karanlıkta ve sürgün gelişmeleri 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda yapılmıştır.

Elde edilen kök uçlarına uygulanan prefiksasyon ile kromozomlar incelenebilecek düzeyde tutulmuştur. Arpa bitkisi için buzlu suda bekletme en uygun prefiksasyon olarak belirlenmiştir. Fiksasyon, hidroliz ve boyama aşamalarından sonra kromozom görüntüleri binoküler mikroskop (Carl Zeiss Lab.A1 Axio) ile alınmıştır.

Örneklerin ploidi düzeyleri *Ploidy analyser* (Sysmex CyFlow Ploidy Analyser) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen bitkilerde spontan katlanma görüldüğünden herhangi bir kimyasal uygulamasına gerek görülmemiştir.

H. spontaneum × Bülbül-89 ve Zeynelağa × *H. spontaneum* melezlerinde % 100 spontan katlanma gerçekleşmiştir. Spontan katlanma oranı; sırasıyla Tarm-92 × Aydanhanım (% 97,22), Bülbül-89 × Tarm-92 (% 93,75), Aydanhanım × Tarm-92 (% 92,30) melezlerinde ve Akar (% 83) çeşidinde izlenmiştir.

7. ÖNERİLER

Hordeum spontaneum türü, abiotik ve biyotik stresler (başta hastalıklara dayanıklılık olmak üzere yatmaya ve tuza dayanıklılık, yüksek protein içeriği gibi özellikler) bakımından kültür arpaları ile melezlemelerde istenilen genetik varyabilite kaynağı olabilmektedir. Bu sebeple bu çalışmada elde edilen melezlerin ve katlanmış bitkilerin daha sonraki ıslah ve moleküler çalışmalar için çok önemli olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Hordeum spontaneum türü ve melezlerinden toplamda 4 katlanmış bitki eldesi gerçekleştirilmiştir. Bu sayısı artırabilmek için türe özgü ayrı bir protokol oluşturulabilir.

Türkiye’de ıslah programların güçlendirmek adına arpa bitkisinde double haploid oluşum frekansını artırmak üzere yeni protokolların geliştirilmesi ön plana çıkartılmalıdır.

Bu çalışmada, tarla koşullarında başakların sabah erken saatte alınması en iyi sonucu verdiği gibi sera koşullarında da benzer sonuç alındığı belirtilmiştir.

Kök ucundan kromozom sayımı yapılırken çoğu literatürde ön muamale olarak belirtilen α -monobromonaftalin çözeltisi yerine buzlu suda bekletme en uygun ön işlem olarak önerilmektedir.

Arpada anter kültürü tekniği ile double haploid bitki eldesi ülkemiz için çok önemlidir. Daha önce yerel koşullarda, yapılan araştırmalarda yalnız kallus oluşumu rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile melezler arasında akrabalık ve genetik mesafelerin belirlenmesi için moleküler çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Mevcut gözlemler Türkiye deki arpa çeşitleri için hem yenidir hem de arpa ıslahı üzerinde önemli katkılar sağlayacaktır.

Yapılan çalışma sonuçları ile 2li, 3lü ve daha kompleks hibridlerin double haploid bitki üretiminde kullanılması önerilmektedir.

Gelecekte, farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı dirençliliğin kazandırılması için haploid bitkilerin transgenik çalışmalarda kullanılması önerilmektedir.

Düşük androgenik tepkiye sahip önemli genotiplerin anter kültürü çalışmalarında; başarılı sonuçlar verecek duruma getirilebilmesi için, bu genotiplerin embriyo oluşturma kapasitesi yüksek genotiplerle melezlenmesi önerilmektedir.

Ayrıca, bu çalışmada kullanılmamış arpa çeşitlerinin ıslah programlarında anter kültüründen etkin bir şekilde yararlanılabilmesi için, uygun ön muameleler, besi yeri ve kültür koşullarının saptanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Acosta, I. 2015. Regulation of stamen maturation in barley and Arabidopsis. Max Planck Institute For Plant Breeding Research. Köln.
- Akar, T., Sayim, I., Ergun, N., Aydogan, S., Sipahi, H., Avci, M., Dusunceli, F., Guler, S., Sanal, T., Ayranci, R., Kahraman, T., Ince, T., Aydın, N., Kendal, E. and Engin, A., 2008, Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium, 5-10 April 2008, Alexandria, Egypt, Improvement of candidate malting barley cultivars for diverse agro-ecologies of Turkey, 443-446.
- Anonim. 2016. Türkiye İstatistik Kurumu Tarım Alanları İstatistikleri Raporu. Erişim Tarihi: 12 Mart 2017.
- Anonim. 2016a. Türkiye İstatistik Kurumu Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünlerin Alan ve Üretim Miktarları İstatistikleri Raporu. Erişim Tarihi: 12 Mart 2017.
- Anonymous. 2008. The Anatomy of a Barley Spike online, The Brewers The Market Guide, <http://www.brewingtechniques.com/bmg/schwarzb.html>. Erişim Tarihi: 15 Mart 2017.
- Anonymous. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2014. FAO. faostat.fao.org. Erişim Tarihi: 15 Mart 2017.
- Anonymous. 2017. Barley Grain Ventral online, The Maltsters Association Of Great Britain, <http://www.ukmalt.com/barley-identification>. Erişim Tarihi: 14 Mart 2017.
- Atalay, İ. 1994. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Badr, A., Muller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W. and Salamani, F. 2000. On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), Molecular Biology and Evolution. Vol.17, No.4.
- Bankima, B. and Gaile Z. 2009. Evaluation of barley disease development depending on varieties, Agronomy Res., 7: 198–203.
- Baum, M., Grando, S., Backes, G., Jahoor, A. and Ceccarelli, S. 2003. QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross ‘Arta’ x *H. spontaneum* 41-1. Theor. Appl. Genet. 107, 1215-1225.
- Bennett, M.D., Bhandol, P. and Leitch, I.J. 2000. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses-807 New Estimates, Annals of Botany. Vol.86, P.859-909.
- Bilgen, G. 1996. Yedi arpa melezinde bazı agronomik özelliklerin genetik analizleri. ANADOLU, J. of Aarı. 6 (2) 1996, 69 – 83. Mara.

- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. and Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the jimson weed, "*Datura stramonium*". Science. 1922 Jun 16;55(1433):646-7.
- Briggs, D.E. 1978. Barley. Chapman&Hall, London, 612 p.
- Brown, A.H.D., Zohary, D. Nevo, E. 1978, Outcrossing rates and heterozigosity in natural populations of and *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. Heredity 41:49-62.
- Cai, Q., Szarejko, I., Polok, K. and Maluszynski, M. 1992. The Effect of Sugars and Growth Regulators on Embryoid Formation and Plant Regeneration from Barley Anther Culture, Plant Breeding, 109: 218-226.
- Çelik, S. 2003. *Centaurea L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna ait türlerin ekolojik özellikleri.* Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.
- Çeliksaş, N. ve Hatipoğlu, R. 1997. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Anter Kültüründe Genotip, Soğuk Uygulama Süresi ve Besi Ortamı 2,4-D İçeriğinin Etkisi, Ç. Ü. Z. F. Dergisi, 12 (2): 163-172.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M. and Romagosa I. 1994. Production of large number of double haploid plants from barley anther pretreated with high concentrations of mannitol, Plant cell reports, 13, 709-712.
- Cistué, L., Cuesta-Marcos, A., Chao, S., Echávarri, B., Chutimanitsakun, Y., Corey A., Filichkina, T., Garcia-Mariño, N., Romagosa, I. and Hayes, P.M. 2011. Comparative mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes. Theor Appl Genet. 2011 May;122(7):1399-410.
- Cistué, L., Ramos, A. and Castillo, A.M. 1999. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley double haploids from model and low responding cultivars, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 55: 159-166.
- Dağüstü, N. 2002. Factors Affecting the Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). Biotechnology&Biotechnological Equipment.
- Daniel, G. 1993. Anther Culture in Rye: Improved Plant Regeneration Using Modified MS-Media, Plant Breeding, 110, 259-261.
- Dizkırıcı, A., Kaya, Z. Guren, H.E. 2010. Budak, H., Barley germplasms developed for scald disease re and sistence exhibited a high level of genetic diversity based on SRAP markers, Turk J Biol 34: 271-279.
- Doğramacı-Altuntepe, M., Peterson, T.S. and Juhar, P.P. 2001. Anther Culture-Derived Regenerants of Durum Wheat and Their Cytological Characterization, J. Hered., 92: 56-64.

- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K. 2001, Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Haploid Bitki Üretimi, M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya,137-189.
- Emiroğlu, E., Gürel, A. 1993. Bitki ıslahında modern biyoteknoloji. Short Course, The Biotechnology Revaluation. February 8-12, 1993. Organized by Ege Univ. Biotech. Cent-and Fac. of Agr. Dept. of Crop Sci., İzmir, 103-110.
- Evrensel C. 2010, Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Doku Kültürlerinde Transpozon Analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-80.
- Fadel, F. and Wenzel, G. 1990, Medium-Genotype-Interaction on Androgenetic Haploid Production in Wheat, Plant Breeding, 105: 278-282.
- Feuillet, C., Langridge, P. and Waugh, R. 2008. Cereal breeding takes a walk on the wild side, Trends in Genetics 24: 24-32.
- Flehinghaus, T., Deimling, S., Geiger H.H., 1991, Methodical Improvements in Rye Anther Culture. Plant Cell Reports, 10: 397-400.
- Foroughi-Wehr, B. and Mix, G. 1979. In-Vitro Response of *Hordeum vulgare*. Anthers Cultured from Plants Grown Under Different Environments, Environmental and Experimental Botany, 19: 3.
- Forster, B.P., Ellis, R.P., Thomas, W.T.B., Newton, A.C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R.A., Bahri, M.H. and Ben- Salem M. 2000. The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. Journal of Experimental Botany, 51: 19-27.
- Forster, B.P., Russell, J.R., Ellis, R.P., Handley, L.L., Robinson, D., Hackett, C.A., Nevo, E., Waugh, R., Gordon, D.C., Keith, R. and Powell, W. 1997. Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley a strategy using maps, markers and the wild species. New Phytologist, 137, 141-147.
- Foster, B.P., Touraev, A. and Jain, S.M. 2009. Advances in Haploid Production in Higher Plants, 12 110.
- Giles, B.E. Bengtsson, B.O. 1988.Variation in anther size in wild barley (*Hordeum vulga* and *re ssp. spontaneum*). Hereditas, 108 : 199-205.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497-498.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. and Gallagher, E. 2010, Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products, Comprehensive reviews in food science and food safety, 9 (3), 318-328.
- Gustafson, M. and Claesson, L. 1988. Resistance to powdery mildew in wild barley. Hereditas, 108: 231-237.

- Haque, M. and Islam, S.M.S. 2014 Application of cold pretreatment and optimisation of media for enhancement of anther culture response in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes derived from Bangladesh. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 22(1), 127–136.
- Harlan, J.R. and Zohary, D. 1966. Distribution of wild wheats and barley. *Science* 153:1074-1080.
- Harlan, J.R. and Zohary, D. 1966. Distribution of wild wheats and barley. *Science* 153:1074-1080.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi, Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın, Adana, 1-178.
- Ho, K.M. J and ones, G.E. 1980, Mingo barley, *Can J Plant Sci*, 60:279–280.
- Hoekstra, S., Bergen, Van S., Brouwershaven, Van I.R., Schilperoort, R.A. Wang, M. 1997. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, c and alcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Sci*. 126: 211-218.
- Huang, B. and Sunderland, N. 1982. Temperature-stress Pretreatment in Barley Anther Culture. *Ann. Bot.*, 49: 77-88.
- Hunter, C.P. 1988. In: Plant Regeneration from Microspore-derived Embryoids and Plants of *Hordeum vulgare* L. PhD. Thesis, Wye College, University of London.
- Immonen, S. 1999. Androgenetic Green Plants from Winter Rye (*Secale cereale* L.) of Diverse Origin, *Plant Breeding*, 118, 319-322.
- Ivandic, V., Hackett, C.A., Zhang, Z.J., Staub, J.E., Nevo, E., Thomas, W.T.B. and Foster, B.P. 2000. Phenotypic responses of wild barley to experimentally imposed water stress. *J. of Exp. Bot.*, 51: 2021-2029.
- Ivandic, V., Hackett C.A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W.T.B. and Foster, B.P. 2002. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Mol. Biol.* 48: 511-527.
- Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A.M., Sangwan, R.S., Devaux, P. and Clément, C. 2006. Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism, *Plant Cell Rep.*, 25:375-381.
- Jaradat, A.A. 1991. Grain protein variability among populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*) from Jordan. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 164-168.
- Johansen, D.A. 1934. Haploids in *Hordeum vulgare*. - *Proc. Nat. Ac. Sci.* 20: 98-100.

- Kahrizi, D., Mahmoodi, S., Bakhshi Khaniki G. and Mirzaei, M. 2011. Effect of genotype on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L. Biharean Biologist 5(2): pp.132-134.
- Kao, K.N., Saleem, M., Abrams, S., Pedras, M., Horn, D. and Mallard, C. 1991. Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada, S7N OW9, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. Plant Cell Rep. 1991 Mar;9(11):595-601. doi: 10.1007/BF00231796.
- Karahocagil, P. and Ege H. 2008. Barley agricultural economics research institute of ministry of agriculture and rural affairs, Republic of Turkey, (<http://www.aeri.org.tr/pdf/bks/6-8.pdf> Accessed 02 July 2008 In Turkish).
- Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R. and Shim, Y.S. 2003. Barley isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. and Szarejko, I. (eds). Doubled Haploid Production in crop plants: A Manual. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp 43-47.
- Khush, G.S. and Virmani, S.S. 1996. Haploids in plant breeding. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Dordrecht: Kluwer, Vol. 1, pp. 11–33.
- Knudsen, S., Due, I.K. and Andersen, S.B. 1989. Components of Response in Barley Anther Culture, Plant Breeding, 103, 241-246.03-309.
- Komatsuda, T., Li, W.B., Takaiwa, F. Oka, S. 1999, High resolution map around the *vrsl* locus controlling two- and 1 and 00 six-rowed spike in barley, *Hordeum vulgare*, Genome 42: 248-253.
- Kruczkowska, H., Pawłowska, H. Skucińska, B. 2002. Influence of anther pretreatment on the efficiency of andro and genesis in barley, J. Appl. Genet., 43(3): 287-296.
- Kuhlmann, U. Foroughi-Wehr, B. 1989. Production of doubled haploid lines in frequenc and ies sufficient for barley breeding programs. Plant Cell Rep. 1989 Feb;8(2):78-81. doi: 10.1007/BF00716843.
- Lazaridou, T. B., Lithourgidis, A. S., Kotzamanidis, S.T and Roupakias, D.G. 2005. Anther Culture Response of Barley Genotypes to Cold Pretreatments and Culture Media. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 52, No. 5, 2005, pp. 696–699.
- Lazaridou, T., Sistanis, I., Lithourgidis, A., Ambrus, H. and Roupakias, D. 2011.. Response to in-vitro anther culture of F₃ families originating from high and low yielding F₂ barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. AJCS 5(3):265-270 ISSN:1835-2707.
- Lezin, F., Sarrafi, A. and Alibert, G. 1996. The Effects of Genotype, Ploidy Level and Cold Pretreatment on Barley Anther Culture Responsiveness, Cereal- Research-Communications, 24: 1, 7-13.

- Luckett, D.J. and Smithard, R.A. 1995. A comparison of several published methods for barley anther, Plant Cell Reports, 14:763-767.
- Molina-Cano J.L., Moralejo M., Igartua E. and Romagosa I. 1999. Further evidence supporting Morocco as a centre of origin of barley. Theoretical and Applied Genetics, 98: 913-918.
- Morrell, P.L., Lundy, K.E. and Clegg, M.T. 2003. Distinct geographic patterns of genetic diversity are maintained in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp *spontaneum*) despite migration. Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 100 (19): 10812-10817.
- Moseman, J.G., Nevo, E. and El-Morsidy, M.A. 1990. Reactions of *Hordeum spontaneum* to infection with two cultures of puccinia hordei from Israel and United States. Euphytica, 49:169-175.
- Muntzing, A. 1938. A. Note on heteroploid twin plants from eleven genera. – Hereditas 24:487-491. doi:10.1111/j.1601-5223.1938.tb03222.x.
- Neale, D.B., Saghai-Maroo, M.A., Allard, R.A., Zhang, Q. and Jergensen R.A. 1988. Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley. Genetics 120: 1105-1110.
- Nevo, E., Zohary, D., Brown, A.H.D. and Haber, M. 1979. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. Evol. 33, 815-833.
- Nishikawa, T., Salomon, B., Komatsuda, T., von Bothmer, R. and Kadowaki, K. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using three chloroplast DNA sequences, Genome 45:1157-1166.
- Olsen, F.L. 1987. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effect of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources, Corlherg RPS Commun., 52: 393-404.
- Pandey, M.D. 2006. Molecular Assessment of Genetic Diversity and Population Differentiation of Hulled Barley (*Hordeum vulgare* L.) Landraces From The Himalayas of Nepal and its Relevance for Barley Breeding, Justus-Liebig Universität, Doktorarbeit, Göttingen, 1-3.
- Pochard, E. and R. Dumas de Vaulx. 1979. Haploid partenogenesis in *Capsicum annuum* L., p.455-472. In: J.G. Hawkes (ed.). The biology and taxonomy of the solanaceae. Acad. Press, London.
- Powell, W. 1988. The Influence of Genotype and Temperature Pretreatment on Anther Culture Response in Barley (*Hordeum vulgare* L.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12: 291-297.

- Roberts-oehlschlager, S.I. and Dunwell, J.M. 1990. Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 20, 235-240.
- Robinson, D., Handley, LL., Scrimgeour, CM., Gordon, D., Forster, BP. and Eills, RP. 2000. Using stable isotope natural abundances ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) genotypes. *J Exp Bot* 51:41-50.
- Sarı, N. 1994. Karpuzda Işınlanmış Polen Uyartımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 242 s.
- Savaşkan, Ç., Szarejko, I. and Toker, M.C. 1999. Callus Production and Plant Regeneration from Anther Culture of Some Turkish Barley Cultivars, *Turkish Journal of Botany*, 23, 359-365.
- Schulze J. 2007, Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron, *Fruit vegetable Cereal Sci Biotech*, 1:64-79.
- Slama-Ayed, O., De Buyser, J., Picard, E., Trifai, Y. and Amara, HS. 2009. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *Durum* Desf.). *J. Plant Breed and Crop Sci.* 2:30-38.
- Snape, J.W. and Simpson, E. 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. *Theor Appl Genet.* 1981 Mar;60(2):123-8. doi: 10.1007/BF00282430.
- Sriskandarajah, S., Sameri, M., Lerceteau-Köhler, E. and Westerbergh, A. 2015. Increased Recovery of Green Doubled Haploid Plants from Barley Anther Culture. *Crop Science*. Vol. 55 No. 6, p. 2806-2812.
- Szarejko, I. and Kasha, K. J. 1991. Induction of anther culture derived double haploids in barley, *Cereal Res. Commun.*, 19 (1-2): 212-237.
- Tanno, K., Taketa, S., Takeda, K. and Komatsuda, T. 2002, A DNA marker closely linked to the *vrs1* locus (row-type gene) indicates multiple origins of sixrowed cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor Appl Genet* 104: 54-60.
- Thomas, W.T.B., Forster, B.P. and Gettersson, B. 2003. Doubled haploids in breedings. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, Eds: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, Dordrecht/Boston/London, pp 337–350.
- Um M. O., Park T., Kim Y. J., Seo H. Y., Kim J. G., Kwon S. Y., Kwak S. S., Yun D. J. Y and un S. J. 2007. Particle bombardment-mediated transformation of barley with an Arabidopsis NDPK2cDNA. *Plant Biotech Rep* 1: 71–77.

- Uysal, M.E. and Yıldırım, A.F. 2003, Konya İlinde Kışlık ve Yazlık Ekilen Arpa Çeşitlerinde Yaprakbiti (Homoptera:Aphidoidea) Populasyon Gelişimi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. Vol.17, No.32.
- Vanhala, T.K. 2004. Exploring And Mapping Genetic Variationin Wild Barley, *HordeumSpontaneum*. 2004. Wageningen University, Postdoktora Tezi, Amsterdam, 4-5.
- Van-Rijn, C. 2001. A physiological and genetic analysis of growth characteristics in *Hordeum spontaneum*. Thesis/Dissertation.
- Viciant, C.M., Kalendar, R. and Schulman, A.H. 2005. Variability, Recombination and Mosaic Evolution of The Barley BARE-1 Retrotransposon. Journal of Molecular Evolution. Vol.61, P.275–291.
- Volis, S., Mendlinger, S. and Orlovsky, N. 2000. Variability in phenotypic traits in core and peripheral populations of wild barley *Hordeumspontaneum* Koch. Hereditas, 133: 235-247.
- Volis, S., Mendlinger, S., Turuspekov, Y. and Esnazarov, U. 2002. Phenotypic and allozyme variation in Mediterranean and desert populations of wild barley, *Hordeumspontaneum* Koch. Evolution 56: 1403-1415.
- Von Bothmer, R. 1992. The wild species of Hordeum. In Shewry PR (ed) Barley genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Wallingford, CAB International, pp 2-17.
- Yıldırım, M.B., Yıldırım, Z. ve Çaylak, Ö. 1990. Patateste Anter Kültürü Yoluyla Haploid Elde Edilmesi, Doğa Tr. J. of Agriculture and Forestry Tübitak, 14, 543-554.
- Ziauddin, A., Marsolaïs, A., Simion, E. and Kasha, K.J. 1992. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). Plant Cell Rep. 1992 Sep;11(10):489-98.
- Zohary, D. 1969, The progenitors of wheat and barley in relation to domestication and agricultural dispersal in the old world. In Ucko PJ, Dimbleby GW (eds) The domestication and exploitation of plants and animals, General Duckworth and Co. Ltd., London, pp 47-66.
- Zohary, D. and Hopf, M. 1988, Domestication of plants in the old world. Oxford: Clarendon Press.
- Zohary, D. and Hopf, M. 2000. Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley Clarendon Press, Oxford.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülden CETİN ÖZKAN

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 22.03.1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mustafa Kemal Süper Lisesi (2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri A.B.D (2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri A.B.D
(Eylül 2009-Aralık 2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü - Proje elemanı (2007-2008)

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü - Proje elemanı (2008-2009)

Ulusoy Tohumculuk - Ziraat Mühendisi (2010-2011)

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü - Ziraat Mühendisi (2011-)

Ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. **Çetin Özkan G.**, Khawar KM. 2017. Submerging Faba Beans in Water Improve in vitro Rooting of Micropropagated Shoots. Journal of Applied Biological Sciences 11 (1): 01-04, 2017. ISSN: 1307-1130, E-ISSN: 2146-0108. (Zoological Record)

Ulusal ve uluslararası kongrelerde sunulmuş bildiri ve posterler

1. **Çetin, G.**, Mokhtarzadeh, S., Hajyzadeh, M., Khawar, K.M., Ozcan, S. 2011. Bakla (*Vicia faba* L.)'nın embriyo eksenı eksplantlarından in vitro koşullarda adventif surgun rejenerasyonu. 1. Ulusal Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-29 Nisan 2011, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi, Eskisehir.
2. Hajyzadeh M, Mokhtarzadeh S, Ahmad HA, **Çetin G**, Khawar KM, Ozcan S. 2011. Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) Gokce cesidinin plumula ucu eksplantından in vitro koşullarda surgun rejenerasyonu. 1. Ulusal Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-29 Nisan 2011, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi, Eskisehir.
3. Koyuncu N, Salantur A, Uğur B.P, **Özkan G.Ç.** 2014. Kışlık Buğday ve Arpa Çeşitlerinin Vernalizasyon İhtiyaçlarının Kontrollü Koşullarda Sağlanması. Türkiye 5. Tohumculuk Kongresi, Diyarbakır. 19-21 Ekim 2014.
4. Özkan **Çetin G.**, Khawar KM. 2015. Bazı Arpa Çeşitlerinin Anter Kültürüne Tepkisinin Araştırılması. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Troia Kültür Merkezi, Çanakkale. 7-10 Eylül 2015.
5. Özkan **Çetin G.**, Khawar KM. 2015. Bazı Arpa Genotiplerinde Farklı Ön Uygulamaların Anter Kültürüne Etkisinin Araştırılması. 18. Biyoteknoloji Kongresi, Dedeman Otel, Konya. 18-19 Aralık 2015.
6. **Çelik Özer G.**, Çetin Özkan G., HAJYZADEH M, Khawar, K.M., Aydoğan, A., Gürbüz A. 2015. Nohutta Anter Kültürü Tekniğinin Uygulanabilirliğinin Araştırılması. 18. Biyoteknoloji Kongresi, Dedeman Otel, Konya. 18-19 Aralık 2015.
7. **Özkan Çetin G.**, Khawar KM. 2017. Effects of different anther dimensions on anther culture of Barley (*Hordeum vulgare* L.). 2nd International Balkan Agriculture Congress. 16-18 Mayıs 2017. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.

8. **Çelik Özer G.**, Çetin Özkan G., HAJYZADEH M., Aydoğan, A. 2017. Influence of different stress and concentration conditions on double haploid planting process in Chickpea. 2nd International Balkan Agriculture Congress. 16-18 Mayıs 2017. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
9. Koyuncu N., Çalışkan M., Özkan **Çetin G.**, Çetinkaya S., Karaoğlu C., Özcan S. F., Çelik Özer G., Ertekin Öner F. 2017. Micropropagation of Turkish hazelnut cultivar “Palaz”. 2nd International Balkan Agriculture Congress. 16-18 Mayıs 2017. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
10. Çetin Özkan G., Koyuncu N., **Çelik Özer G.**, Özcan F. S., Yaman H., Ertekin Öner F., Demir S., Şahin E.S. 2017. Effects of antioxidants to tissue browning problems of hazelnut cultures. IX International Congress on Hazelnut. 15-19 Ağustos 2017. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
11. **Çelik Özer G.**, Koyuncu N., Çetin Özkan G., Ertekin Öner F., Özcan F. S., Yaman H., Uslu T., Vanlıoğlu Maraş F. 2017. Effects of antibiotic and fungicide usage during sterilization of hazelnut shoots. IX International Congress on Hazelnut. 15-19 Ağustos 2017. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi.